

**T.C.**  
**ERCIYES ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**Fizyoloji Anabilim Dalı**

**RHO/RHO-KİNAZ'IN FASUDİL İLE İNHİBİSYONUNUN**  
**HİPOKAMPAL SİNAPTİK PLASTİSİTE ÜZERİNE OLAN**  
**ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Hazırlayan**  
**Hatice SARAY**

**Danışman**  
**Prof.Dr.Nurcan DURSUN**

**Yüksek Lisans Tezi**

**TEMMUZ 2019**

**KAYSERİ**

**T.C.  
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
Fizyoloji Anabilim Dalı**

**RHO/RHO-KİNAZ'IN FASUDİL İLE OLAN İNHİBİSYONUNUN  
HİPOKAMPAL SİNAPTİK PLASTİSİTE ÜZERİNE OLAN  
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Hazırlayan**

**Hatice SARAY**

**Danışman**

**Prof. Dr. Nurcan DURSUN**

**Bu çalışma: Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi  
tarafından TYL-2018-8502 kodlu proje ile desteklenmiştir.**

**Temmuz 2019**

**KAYSERİ**

## **BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK**

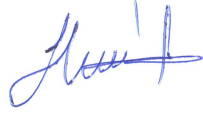
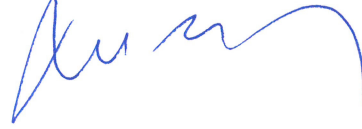
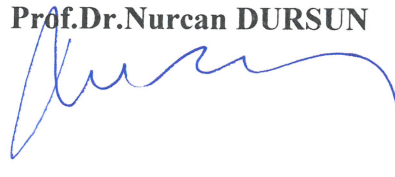
Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

**Adı-Soyadı: Hatice SARAY**

**İmza:**

**YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI**

**"Rho/Rho-Kinaz'ın Fasudil ile İnhibisyonunun Hipokampal Sinaptik Plastisite Üzerine Olan Etkisinin Araştırılması"** adlı Yüksek Lisans Tezi Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi'ne uygun olarak hazırlanmıştır.

**Tezi Hazırlayan****Hatice SARAY****Danışman****Prof.Dr.Nurcan DURSUN****Anabilim Dalı Başkanı****Prof.Dr.Nurcan DURSUN**

**Prof. Dr. Nurcan DURSUN** danışmanlığında **Hatice SARAY** tarafından "**Rho/Rho-Kinaz'ın Fasudil ile İnhibisyonunun Hipokampal Sinaptik Plastisite Üzerine Olan Etkisinin Araştırılması**"adlı bu çalışma, jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Fizyoloji Anabilim Dalı** 'nda **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

11./07/2019

## JÜRİ

## İmza

Danışman : Prof. Dr. Nurcan DURSUN  
(Erciyes Üniversitesi Fizyoloji Anabilim Dalı)

Üye : Prof. Dr. Cem SÜER  
(Erciyes Üniversitesi Fizyoloji Anabilim Dalı)

Üye : Prof. Dr. Neyhan ERGENE  
(Konya KTO Üniversitesi Fizyoloji Anabilim Dalı)

## ONAY

Butezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun ...../...../..... tarih ve.....sayılı kararı ile onaylanmıştır.

...../...../.....

**Prof. Dr. Bilal AKYÜZ**

**Enstitü Müdürü**

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimimin ilk günlerinden itibaren sonuna kadar büyük bir sabır, sevgi ve ilgiyle emeğini esirgemeyen, tüm iyi niyeti ile daima zamanını ayıran, her zaman bilimsel ve manevi destekte bulunan çok değerli danışman hocam Prof. Dr. Nurcan DURSUN' a.

Ders dönemi ve proje aşamasından tez yazımının sonuna kadar sabır, hoşgörü gösteren, her daim bilimsel ve manevi desteğinin esirgemeyen birlikte çalışmaktan onur ve mutluluk duyduğum değerli hocam Prof. Dr. Cem SÜER'e

Ders döneminde ve her daim bilgisinden, deneyimlerinden, yaralandığım bilimsel ve manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen Öğr. Gör. Mehmet Akif BAKTIR' a

Hayatım boyunca bana destek olan, üzerimdeki emeğini ve sevgisini her zaman hissettiğim sevgili annem Güler SARAY, babam Coşkun SARAY, kardeşlerim Kübra ve Sümeyye SARAY' a

Çalışmalarım esnasında desteğini esirgemeyen tüm çalışma arkadaşlarım ve asistan arkadaşlarıma,

Projenin gerçekleştirilmesinde büyük katkıları bulunan Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Birimi'ne (BAP) teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim boyunca uyumlu bir çalışma ortamı sağlayarak destekte bulunan değerli hocalarım başta Prof. Dr. Bekir ÇOKSEVİM' e, Prof. Dr. Asuman GÖLGELİ' ye, Yrd. Doç. Dr. Erdem BAŞARAN' a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

# RHO/RHO-KİNAZ'IN FASUDİL İLE İNHİBİSYONUNUN HİPOKAMPAL SİNAPTİK PLASTİSİTE ÜZERİNE OLAN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

**Hatice SARAY**

**Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü**

**Fizyoloji Anabilim Dalı**

**Yüksek Lisans Tezi, Temmuz 2019**

**Danışman: Prof. Dr. Nurcan DURSUN**

## ÖZET

Rho/Rho-kinaz (ROCK), presinaptik ve postsinaptik hipokampal nöronlarda, sinaptik plastisite gelişiminde önemli role sahiptir. Literatürde, ROCK protein seviyelerinin Alzheimer gibi kognitif bozukluklarda arttığı bildirilmiştir. Çalışmamızda, sağlıklı sıçan hipokampuslerine, ROCK inhibitörü Fasudil infüze edilerek sinaptik plastisitedeki değişiklikler incelenmiştir.

Deneyler, 2 aylık, erkek Wistar Albino sıçanlarda gerçekleştirildi. Kontrol (K) ve Fasudil (F) olmak üzere 2 grup oluşturuldu. Anestezili sıçanlar stereotaksik cihaza sabitlendi. Uyarıcı elektrot perforan yola, kayıt elektrodu dentat girusa yerleştirildi. Fasudil uzun dönemli güçlenme (UDG, n=8), uzun dönemli baskılanma (UDB, n=8), metaplastisite (MP, n=8) deney protokolleri ile eşzamanlı hipokampüse infüze edildi. Populasyon Spike (PS) genlik ve Eksitator PostSinaptik Potansiyel (EPSP) eğimleri değerlendirilerek istatistiksel analizleri yapıldı. Çalışmamız Erciyes Üniversitesi Etik Kurulu'ndan 18/090 sayılı karar ile onaylanmış olup, Bilimsel Araştırma Proje Birimi'nce (BAP) (TYL-8502) desteklendi.

I/O değerlendirilmesinde, PS genliği ve EPSP eğimi iki grupta da artmıştır, bu artış (grup etkisi:  $p > 0.05$ ; etkileşim etkisi:  $p > 0.05$ ) anlamlı değildir. UDG'de Fasudil grubunda, posttetanik dönem PS genliği ( $t_{14}=3.25$ ,  $p = 0.006$ ) ve idame dönemi PS genliği ( $t_{14}=4.82$ ,  $p < 0.001$ ) azalmıştır. Fasudil grubu, EPSP eğimi indüksiyon döneminde ( $t_{14}=4.82$ ,  $p < 0.001$ ) ve idame döneminde ( $t_{14}=3.68$ ,  $p = 0.002$ ) azalmıştır; sonuçta Fasudil UDG'yi bozmuştur. UDB'de indüksiyon döneminde PS genliğinde ( $t_{14} = 0.62$ ;  $P = 0.952$ ) kontrole kıyasla istatistiksel anlamda değişiklik oluşturmamış, idame döneminde ise azalmıştır ( $t_{14}=2.507$ ;  $p = 0.025$ ). İndüksiyon dönemi ( $t_{14} = 0.635$ ;  $P = 0.535$ ) ve idame döneminde EPSP ( $t_{14}= 3.291$ ;  $p = 0.005$ ) anlamlı artmıştır; sonuçta Fasudil UDB'yi arttırmıştır. MP'de ise posttetanik dönem PS genliği ( $p > 0.05$ ) ve idame dönemi PS genliği ( $p > 0.05$ ) değişmemiştir. İndüksiyon dönemi ( $p > 0.05$ ) ve idame dönemi EPSP eğiminde ( $p=0.05$ ) istatistiksel anlamlı artış görülmüştür, sonuçta Fasudil MP'de UDG'nin inhibisyonunu önlemiştir.

Çalışmamız dentat girus sinaptik plastisite fonksiyonlarında ROCK yolağının önemini ortaya koymuştur. Literatürde ROCK'un hipokampal plastisite fonksiyonuna etkisini in-vivo araştıran elektrofizyolojik çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle çalışmamız orijinaldir ve ROCK'un Alzheimer hastalığı fizyopatolojisinde önemli olabileceğini düşündürmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Dentat girus; Fasudil; Hipokampus; Rho-kinaz; Uzun dönemli güçlenme

**THE RESEARCH ABOUT THE EFFECT ON HIPPOCAMPAL SYNAPTIC  
PLASTICITY FORMS BY INHIBITION OF RHO/RHO-KINASE WITH  
FASUDIL**

**Hatice SARAY**

**Erciyes University, Graduate School of Health Sciences**

**Department of Physiology**

**Master Thesis, July 2019**

**Supervisor: Prof. Dr. Nurcan DURSUN**

**SUMMARY**

Rho-Kinase (ROCK) has an important role in the development of synaptic plasticity in presynaptic and postsynaptic hippocampal neurons. In the literature, increased ROCK protein levels are reported in cognitive disorders such as Alzheimer's Disease. In our study, synaptic plasticity changes in healthy rats were evaluated after infusion of Fasudil which is a ROCK inhibitor.

Experiments were performed on 2-months-old, male Wistar Albino rats. Study was composed of 2 groups, Control (K) and Fasudil (F). Anesthetized rats were fixed to the stereotaxic system. Stimulating electrode was placed to perforating path and recording electrode was placed to dentat gyrus. Fasudil was simultaneously infused according to long-term potentiation (LTP, n=8), long-term depression (LTD, n=8), metaplasticity (MP, n=8). Population Spike (PS) slope and Excitatory Post Synaptic Potential (EPSP) slope were evaluated and statistical analyzes performed. Our study was approved by the ethics committee of Erciyes University with approval number of 18/090 and supported by Coordinatorship of Scientific Research Projects (CSRP) (TYL-8502).

In I/O evaluation, slopes of PS and EPSP increased in both groups, however (group effect:  $p > 0.05$ ; interaction effect:  $p > 0.05$ ) didn't reach statistical significance. In LTP phase, posttetanic ( $t_{14}=3.25$   $p = 0.006$ ) and maintenance ( $t_{14}=3.68$ ,  $p = 0.002$ ) PS slope were decreased in Fasudil group. Induction ( $t_{14}=4.82$ ,  $p < 0.001$ ) and maintenance ( $t_{14}=3.68$ ,  $p = 0.002$ ) EPSP slope were decreased in Fasudil group; thus Fasudil disrupted LTP. In LTD phase, while PS slope ( $t_{14} = 0.62$ ;  $P = 0.952$ ) didn't show statistical significance in induction period comparing to controls; it was statistically significantly decreased in maintenance period ( $t_{14}=2.507$ ;  $p = 0.025$ ). EPSP was significantly increased in both induction ( $t_{14} = 0.635$ ;  $P = 0.535$ ) and maintenance period; thus Fasudil increased LTD. In MP, PS slope ( $p > 0.05$ ) didn't change in both posttetanic and maintenance period ( $p > 0.05$ ) but it didn't reach statistical significance. In induction and maintenance period, EPSP ( $p > 0.05$ ) was statistically significantly increased; thus Fasudil prevented the inhibiting effect of LTP on MP.

Our study revealed that ROCK pathway is important for dentat gyrus synaptic plasticity. In the literature, we found no electrophysiological study that researches in-vivo effect of ROCK on hippocampal plasticity function. Thus, our study is unique and supports that ROCK is important for the physiopathology of Alzheimer's Disease.

**Key Words:** Dentat gyrus; Fasudil; Hippocampus; Rho-kinase; Long term potentiation



## İÇİNDEKİLER

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK.....	i
YÖNERGEYE UYGUNLUK SAYFASI.....	ii
KABUL VE ONAY SAYFASI.....	iii
TEŞEKKÜR .....	iv
ÖZET .....	v
ABSTRACT .....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
KISALTMALAR VE SİMGELER .....	x
TABLolar LİSTESİ.....	xvi
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xvii
1.GİRİŞ VE AMAÇ .....	1
2.GENEL BİLGİLER.....	5
2.1 RHO/RHO-KİNAZ (ROCK) PROTEİN AİLESİ.....	5
2.1.1 Rho-Kinaz'ın (ROCK) Doku Alanları ve Hücre İçerisinde ki Dağılımı	8
2.1.2 Klasik RhoA, RhoB ve Cdc42 ile Bağlantılı Proteinler.....	9
2.1.3 Rho Proteinleri ve ROCK Aktivitesinin Düzenlenmesi.....	12
2.1.4 ROCK Aktivitesini Yöneten Yukarı Akışlı Moleküler Regülatörler..	15
2.1.5 ROCK Aktivitesinin Aşağı Akışlı Moleküler Regülatörleri .....	16
2.2 ROCK1 VE ROCK2 GEN NAKAVT FARELER.....	21
2.3 HİPOKAMPAL NÖROGENEZ VE AKSONAL REJENERASYONDA RHO/ROCK AKTİVİTESİ.....	22
2.4 RHO-KİNAZ'IN (ROCK) SİNAPTİK İŞLEVLERDEKİ YERİ .....	25
2.5 NÖRODEJENERATİF HASTALIKLARDA ROCK İNHİBİSYONU .....	27
2.5.1 Alzheimer Hastalığı (AH).....	27
2.5.2 Parkinson Hastalığı (PH) .....	27
2.5.3 Amyotrofik Lateral Skleroz .....	28

2.5.4 Huntington Hastalığı (HH).....	28
2.5.5 Multipl Skleroz (MS).....	29
2.6 OFTALMOLOJİ VE ROCK.....	29
2.6.1 Diyabetik Retinopati .....	29
2.6.2 Akut Kornea Travması.....	29
2.6.3 Glokom.....	30
2.7 KAN BEYİN BARIYERİ'NDE (KBB) ROCK İNHİBİSYONU'UN ETKİSİ	30
2.8 RHO/ROCK İNHİBİSYONU VE İMMÜNOREGÜLASYON.....	30
2.9 FARMOKOLOJİK ROCK İNHİBİTÖRLERİ.....	31
2.9.1 ROCK İnhibitörleri ve Tarihçesi.....	31
2.9.2 ROCK İnhibitör Türevleri.....	29
2.9.3 Rho/ROCK İnhibisyonunda Fasudil .....	34
2.10 HAYVAN DENEYLERİNDE GELENEKSEL FASUDİL KULLANIM DOZU VE UYGULAMA YOLLARI.....	34
2.10.1 İntra Peritoneal Uygulama (İP).....	34
2.10.2 Oral Uygulama.....	35
2.11 HİPOKAMPÜS.....	35
2.11.1 Hipokampüs Anatomik Yapı ve Yerleşimi .....	35
2.11.2 Dentat Girus .....	36
2.11.3 Hipokampüs Fizyolojisi .....	37
2.11.4 Papez Devresi.....	37
2.11.5 Hipokampal Bağlantılar ve Bilgi Akışı.....	38
2.12. HİPOKAMPÜSTE SİNAPTİK PLASTİSİTE.....	39
2.12.1 Sinaptik Plastisite ve UDB.....	41
2.12.2 UDG'nin İndüksiyonu: NMDA Reseptörleri ve Ca <sup>2+</sup> .....	42
2.12.3 UDG'de Protein Kinazlar Ve Sinyal Transdüksiyon Mekanizmaları.	42
2.12.4 Sinaptik Plastisite: Öğrenme ve Hafızadaki Rolü.....	43
2.12.5 Metaplastisite.....	44

3.GEREÇ VE YÖNTEM.....	45
3.1 Deney Hayvanları ve Gruplandırma.....	45
3.2 Cerrahi ve İnvaziv Girişimler.....	45
3.3 Uzun Dönemli Güçlenme, Elektrofizyolojik Kayıtların Alınması.....	46
3.3.1 Uyarı, Kayıt ve Fasudil İnfüzyonu.....	46
3.3.2 Tipik Elektriksel Yanıtın Elde Edilmesi.....	47
3.3.3 Veri Kazanımı ve Uyarım.....	47
3.3.4 Girdi-Çıktı Eğrileri "Input – Output" (I/O).....	48
3.3.5 Uzun Dönemli Güçlenme (UDG).....	48
3.3.6 Uzun Dönemli Baskılanma (UDB).....	49
3.3.7 Metaplastisite (MP).....	49
3.4 Veri Analizi ve İstatistik.....	50
4. BULGULAR.....	51
4.1 Farklı Uyarın Şiddetlerine Karşı Oluşan Populasyon Spike (PS) Genlik ve Eksitator Post Sinaptik Potansiyel (EPSP) Eğim Değerleri.....	51
4.1.1 PS Genlik Değerleri.....	51
4.1.2 EPSP Eğim Değerleri.....	55
4.2 Uzun Dönemli Güçlenmenin İndüksiyon ve İdame Dönemlerine ait PS Genlik ve EPSP Eğim Değerleri.....	58
4.3 Uzun Dönemli Baskılanmanın İndüksiyon ve İdame Dönemlerine ait PS Genlik ve EPSP Eğim Değerleri.....	61
4.4 Metaplastisite'nin Post Tetanik Potensiyelizasyon ve İdame Dönemlerine ait PS Genliği ve EPSP eğim Değerleri.....	64
5.TARTIŞMA VE SONUÇ.....	68
6.KAYNAKLAR.....	75
EKLER	
ÖZGEÇMİŞ	

## KISALTMALAR VE SİMGELER

<b>Ag:</b>	Gümüş
<b>Ag-Cl:</b>	Gümüş klorür
<b>AH:</b>	Alzheimer Hastalığı
<b>ALS:</b>	Amyotrofik Lateral Skleroz
<b>AP:</b>	Anterior-posterior
<b>APP:</b>	Amiloid Prekürsör proteini
<b>AR:</b>	Androjen reseptörü
<b>A<math>\beta</math>:</b>	Amiloid- beta
<b>BAP:</b>	Bilimsel Araştırma Proje birimi
<b>BEH:</b>	Beyin endotel hücresi
<b>Ca+2:</b>	Kalsiyum
<b>CA:</b>	Cornu Ammonis
<b>CAAX:</b>	Sistein, alifatik aminoasit, met. ser. alanin
<b>CAG:</b>	Poliglutaminler
<b>CaMKII:</b>	Ca, kalmodulin bağımlı protein kinaz-II
<b>Casp3:</b>	Kaspaz-3 enzimi
<b>CCK:</b>	Kolesistokinin
<b>CFL:</b>	Kofilin Proteini
<b>CPI-17:</b>	C-kinaz aktive protein fosfataz
<b>CRMP2:</b>	Kollapsin yanıt aracı proteini
<b>CSPG:</b>	Kontroiditin sülfat proteoglikanlar
<b>Cyt:</b>	Sitozol

<b>DCA:</b>	Dikloroasetat
<b>DEKAM:</b>	DeneySEL ve Klinik Araştırma Merkezi
<b>DFU:</b>	Düşük frekanslı uyarı
<b>DG:</b>	Dentat Girus
<b>DMPK:</b>	Myotonik Distrofi Protein Kinazı
<b>DP:</b>	Depotansiyasyon
<b>EAE:</b>	Otoimmün Ensefalomyelit
<b>EC:</b>	Entorinal Korteks
<b>EDVD:</b>	Endotel Vasküler Disfonksiyon
<b>EM:</b>	Endomembran
<b>eNOS:</b>	Endotelyal Nitrik Oksit
<b>ER:</b>	Endoplazmik Retikulum
<b>Eph:</b>	Ephrin proteini
<b>EPSP:</b>	Eksitatör Postsinaptik Potansiyel
<b>ERM:</b>	Ezrin, radixin, moesin
<b>FDA:</b>	İlaç ve gıda idaresi
<b>FHOD1:</b>	Formin proteini homoloji alanı
<b>FT:</b>	Farnesil Transferaz
<b>FTI:</b>	Farnesil Transferaz İnhibitörleri
<b>GAD:</b>	Glutamat dekarboksilaz
<b>GAP:</b>	GTPaz Aktive Edici Protein
<b>GDI:</b>	Guanin Nükleotid Ayrıştırma İnhibitörleri

- GDP:** Guanin Difosfat
- GEF:** Guanin Nükleotit Değişim Faktörü
- GGT:** Geranil-geranil Transferaz
- GİB:** Göz içi basıncı
- GPCR:** G proteinine bağlı reseptörler
- GTP:** Guanin Trifosfat
- GTPaz:** Guanin Trifosfataz
- GZMB:** Granzim-B Enzimi
- HDAC:** Histon Deasetilaz
- HH:** Huntington Hastalığı
- HMN:** Hipoglossal Motor nöron
- HR:** RhoA Bağlanma Bölgesi
- HTT:** Huntington geni
- IC50:** Yarı maksimum konsantrasyon dozu
- IL-1 $\beta$ :** İnterlökin 1-beta
- I/O:** İnter-önce
- İP:** İnterperitoneal
- İV:** İntervenöz
- KBB:** Kan Beyin Bariyeri
- KIF:** Kinezin Benzeri Protein
- LIMK:** LIM alan kinazları
- LINGO1:** Lysin açısından zengin protein

- M:** Molar
- MAG:** Myelinle İlişkili Proteinler
- MAP:** Mikrotübülle Bağlantılı Proteinler
- MBS:** Myozin Bağlanma Alt Ünitesi
- MG:** Magnezyum
- ML:** Medial-lateral
- MLC:** Myozin Hafif Zincir
- MLCP:** Myozin Hafif Zincir Fosfataz
- MΩ:** Megaohm
- MP:** Metaplastisite
- MPTP:** 1-metil-4-fenil-1,2,3,6 tetrahidropiridin
- MPP:** Metil fenil pridinyum
- MRCK:** Cdc42 Bağlayıcı Protein Kinaz
- MS:** Multipl Skleroz
- MSS:** Merkezi Sinir Sistemi
- MT:** Mikrotübül
- mTOR:** Memelilerde Rapamisin kompleksi
- Myozin ATPaz:** Myozin Adenozin Trifosfataz
- Na:** Sodyum
- NaCl:** Sodyum klorür
- NFT:** Nörofibriler Yumak
- NgR:** Nogo reseptörü

**NHE1:** Sodyum ve hidrojen değiştirici protein

**NMDA:** N-metil-D-aspartik asit

**NTR:** Nörotrofin Reseptör

**NO:** Nitrik Oksit

**NOS:** Nitrik Oksit Sentaz

**OMgp:** Oligodendrosit myelin glikoproteini

**PAH:** Pulmoner hipertansiyon

**PHD:** Plekstrin Homoloji Alanı

**PH:** Parkinson Hastalığı

**PKB:** Protein kinaz-B

**PKC:** Protein kinaz-C

**PKCr:** Protein kinaz-C izoformu

**p-MLC:** Myozin hafif zincir fosforilasyonu

**PM:** Plazma Membranı

**PRRBP:** Prolin zengin bölge bağlayıcı protein

**PS:** Populasyon Spike

**PTEN:** Fosfataz ve Tensin homoloğu

**RAD1:** DNA onarımı rekombinasyon proteini

**RBD:** Rho Bağlanma Bölgesi

**ROCK:** Rho-Kinaz

**RRP:** Veziküller için serbest bırakılabilir alan

**ROS:** Reaktif oksijen



**S1PR2:** Sfingo-1-fosfat reseptör-2

**SCI:** Omurilik yaralanması

**Src:** Sarkoma homoli alanı içeren

**TROY:** Tümör nekroz faktörü reseptörü

**TTÜO:** Tek taraflı üreter tıkanıklığı

**UDB:** Uzun dönemli baskılanma

**UDG:** Uzun dönemli güçlenme

**UUO:** Tek taraflı üreter tıkanıklığı

**YFU:** Yüksek frekanslı uyarı

**ZFD:** Çinko Alan

**WASP:** Wiscott-Aldrich Sendromu Proteini

## TABLOLAR LİSTESİ

<b>Tablo 2.1</b> RhoA, Rac ve Cdc42 için Seçilmiş Efektör Proteinlerin Listesi .....	12
<b>Tablo 2.2</b> Farmakolojik ROCK İnhibitörleri.....	32
<b>Tablo 2.3</b> Farklı ROCK İnhibitörlerinin Potansiyel Karşılaştırmalarının Alfabetik Gösterimi.....	33
<b>Tablo 4.1</b> UDG; Kontrol ve Fasudil gruplarında, 0,1 mA -1,5 mA arasında değişen uyarı şiddetleri ile oluşan PS genlik ve EPSP eğim değerleri. ....	54
<b>Tablo 4.2</b> UDB; Kontrol ve Fasudil gruplarında, 0,1 mA -1,5 mA arasında değişen uyarı şiddetleri ile oluşan PS genlik ve EPSP eğim değerleri. ....	54
<b>Tablo 4.3</b> MP; Kontrol ve Fasudil gruplarında, 0,1 mA -1,5 mA arasında değişen uyarı şiddetleri ile oluşan PS genlik ve EPSP eğim değerleri .....	55
<b>Tablo 4.4</b> UDG; Kontrol ve Fasudil grubu sıçanlarda indüksiyon ve idame dönemine ait PS genlik ve EPSP eğimi ortalama değerleri .....	59
<b>Tablo 4.5</b> Kontrol ve Fasudil grubu sıçanlarda indüksiyon ve idame dönemine ait PS genlik ve EPSP eğimi ortalama değerleri .....	62
<b>Tablo 4.6</b> MP; Kontrol ve Fasudil grubu sıçanlarda posttetanik dönem ve idame dönemine ait PS genlik ve EPSP eğimi ortalama değerleri .....	65

## ŞEKİLLER LİSTESİ

<b>Şekil 2.1</b> Rho GTPaz'ların hücre içi düzenlenmesi. ....	6
<b>Şekil 2.2</b> Rho GTPaz ailesi alt üyelerine ait dendrogram. ....	7
<b>Şekil 2.3</b> Rho ilişkili sarmal bobin kinaz, ROCK1 ve ROCK2'nin moleküler yapısı. ....	8
<b>Şekil 2.4</b> ROCK1 ve ROCK2'nin doku dağılımı ve ekspresyon seviyeleri.....	9
<b>Şekil 2.5</b> Rho/Rac proteinlerinin biyosentez (üst), sekestrasyon (orta) ve düzenleyici (alt) döngülerinin şematik sunumu. ....	14
<b>Şekil 2.6</b> Rho/ROCK sinyal yolağının yukarı akışlı moleküler regülatörleri. ....	16
<b>Şekil 2.7</b> Rho/ROCK sinyal yolağı aktivasyonu ve aşağı akış hedefleri (Amin, 2013). ....	17
<b>Şekil 2.8</b> ROCK'un aktif ve pasif formlarının nörit büyümesine etkisi. ....	23
<b>Şekil 2.9</b> Aksonal büyümeyi inhibe eden moleküler mekanizma ve ROCK bağlantısı. ....	25
<b>Şekil 2.10</b> RhoA/ROCK sinyal yolu immünoregülasyon ilişkisi. ....	31
<b>Şekil 2.11</b> Hipokampüsün yapı olarak görünümü. ....	35
<b>Şekil 3.1</b> Deney aşamasında tipik bir elektriksel aktivite kaydının görüntüsü. Hipokampüs elektrofizyolojik deneylerinde kayıt ve uyarı elektrodunun in vivo yerleşimi....	47
<b>Şekil 3.2</b> UDG kaydı deney protokolü şeması. ....	48
<b>Şekil 3.3</b> Metaplastisite kaydı deney protokol şeması.....	50
<b>Şekil 4.1</b> Kontrol ve Fasudil gruplarında, dentat girus nöronlarından 0,1 mA-1,5 mA arasında değişen 8 ayrı uyarı şiddetine karşı ölçülen PS genlik değerleri; UDG öncesi.....	51
<b>Şekil 4.2</b> Kontrol ve Fasudil gruplarında dentat girus nöronlarından 0,1 mA-1,5 mA arasında değişen 8 ayrı uyarı şiddetine karşı ölçülen PS genlik değerleri; UDB öncesi.....	52
<b>Şekil 4.3</b> Kontrol ve Fasudil gruplarında, dentat girus nöronlarından 0,1 mA-1,5 mA arasında değişen 8 ayrı uyarı şiddetine karşı ölçülen PS genlik değerleri; MP öncesi.....	53
<b>Şekil 4.4</b> Kontrol ve Fasudil gruplarının, dentat girus nöronlarından 0,1 mA-1,5 mA arasında değişen 8 ayrı uyarı şiddetine karşı ölçülen EPSP eğim değerleri; UDG öncesi.....	56
<b>Şekil 4.5</b> Kontrol ve Fasudil gruplarının, dentat girus nöronlarından 0,1 mA-1,5 mA arasında değişen 8 ayrı uyarı şiddetine karşı ölçülen EPSP eğim değerleri ; UDB öncesi.....	57

- Şekil 4.6** Kontrol ve Fasudil gruplarının, dentat girus nöronlarından 0,1 mA-1,5 mA arasında değişen 8 ayrı uyarı şiddetine karşı ölçülen EPSP eğim değerleri; MP öncesi..... 58
- Şekil 4.7** UDG; Kontrol ve Fasudil gruplarının indüksiyon ve idame dönemlerine ait ortalama PS genlik değerleri ..... 59
- Şekil 4.8** UDG; Kontrol ve Fasudil gruplarının indüksiyon ve idame dönemlerine ait ortalama EPSP eğim değerleri..... 60
- Şekil 4.9** PS genlik değerleri: UDG deneylerinde elde edilen kontrol ve deney gruplarına ait PS genliği ortalama değerleri ve standart sapmaları.1; indüksiyon dönemi, 2; idame dönemi ..... 61
- Şekil 4.10** EPSP eğim değerleri: UDG deneylerinde elde edilen Kontrol ve Fasudil gruplarına ait EPSP eğimi ortalama değerleri ve standart sapmaları. 1;indüksiyon dönemi, 2; idame dönemi ..... 61
- Şekil 4.11** UDB; Kontrol ve Fasudil gruplarının indüksiyon ve idame dönemlerine ait ortalama PS genliği değerleri ..... 62
- Şekil 4.12** UDB; Kontrol ve Fasudil gruplarının indüksiyon ve idame dönemlerine ait ortalama EPSP eğim değerleri..... 64
- Şekil 4.13** PS genlik değerleri: UDB deneylerinde elde edilen Kontrol ve Fasudil gruplarına ait PS genliği ortalama değerleri ve standart sapmaları. 1;indüksiyon dönemi, 2; idame dönemi ..... 64
- Şekil 4.14** EPSP eğim değerleri: UDB deneylerinde elde edilen Kontrol ve Fasudil gruplarına ait EPSP eğimi ortalama değerleri ve standart sapmaları. 1;indüksiyon dönemi, 2; idame dönemi ..... 64
- Şekil 4.15** MP; Kontrol ve Fasudil gruplarının posttetanik dönem ve idame dönemlerine ait ortalama PS genlik değerleri ..... 65
- Şekil 4. 16** MP; Kontrol ve Fasudil gruplarının posttetanik dönem ve idame dönemlerindeki ortalama EPSP eğim değerleri..... 66
- Şekil 4.17** PS genlik değerleri: MP deneylerinde elde edilen Kontrol ve Fasudil gruplarına ait PS genliği ortalama değerleri ve standart sapmaları. 1;indüksiyon dönemi, 2; idame dönemi ..... 67
- Şekil 4.18** EPSP eğim değerleri: MP deneylerinde elde edilen Kontrol ve Fasudil gruplarına ait EPSP eğimi ortalama değerleri ve standart sapmaları. 1;indüksiyon dönemi, 2; idame dönemi ..... 67

## 1.GİRİŞ VE AMAÇ

Küçük GTPaz Rho'nun, aktin hücre iskeleti reorganizasyonu, myozin hafif zincir (MLC) fosforilasyonu, nöral stres lifi oluşumu, sitokinez, apoptoz, adezyon gibi birçok hücrel fizyolojik ve patofizyolojik olaylarda rolü olduğu bilinmektedir (Özdemir ve ark, 2009; Huang ve ark, 2014). Yapılan çalışmalar, Rho GTPaz'ların hücre içerisindeki sinyal yollarını nasıl etkilediğini ve aşağı akış hedefleri doğrultusunda oluşturdukları hücrel yanıtları net bir şekilde göstermektedir (Özdemir ve ark, 2009). Üzerinde en fazla çalışılan ve ökaryotik hücre tiplerinde yüksek oranda korunan Rho GTPaz'lar Rho, Rac ve hücre bölünmesi kontrol proteindir (Cdc42). Bizim üzerinde çalıştığımız ise Rho'nun hücrel sinyal efektörü olan Rho-kinaz'lardır (ROCK). Memelilerde ROCK1 ve ROCK2 olmak üzere 2 izoformu bulunmaktadır. Bu iki izoformda memeli embriyogenezinde ve yetişkin dokuda her bölgede eksprese edilebilir. Ancak dokulardaki ekspresyon seviyeleri bakımından önemli farklılıklar içerir. ROCK1 ekspresyonu akciğer, karaciğer, immün sistem ve testislerde daha baskındır. ROCK2 ise beyin, kalp ve düz kaslarda daha dominanttır. ROCK proteinleri, myotonik distrofi protein kinaz (DMPK), DMPK ile ilgili Cdc42 bağlayıcı kinaz (MRCK), sitron kinaz gibi diğer AGC grubu kinazlar büyük homolojiye sahip serin/treonin kinaz yapılı moleküllerdir. Yapısal benzerliklerine rağmen, ROCK1 ve ROCK2'nin her iki izoformunun aynı ölçüde ifade edildiği dokularda farklı rollere sahip olabildiği bilinmektedir. Gen nakavt teknolojilerinden faydalanarak, deney hayvanları gelişiminde ROCK1'in, ROCK2 izoform kaybını tamamen telafi edemediği görülmüştür. Farklı bir çalışmada ROCK2 geni nakavt edilmiş olan farelerde beyin anatomisi normal olup bazal sinaptik transmisyon, sinaptik omurga morfolojisi, uzun dönemli güçlenme(UDG)

yanıtları ve hafıza fonksiyonları önemli ölçüde farklılık göstermiştir (Koch ve ark, 2017; Narumiya ve Dean Thumkeo,2018).

Yetişkin memeli merkezi sinir sisteminin(MSS) nöronlarının yenilenmesi, sinir sisteminin travmatik ve nörodejeneratif hastalıklarında nöronların işlevselliği, yenilenmesi ve sinir sistemine ait fonksiyon kayıplarının geri kazanılmasında çok sayıda hücrenel faktör sorumlu tutulmaktadır. MSS'nde meydana gelen nöronal ölüm, aksonal dejenerasyon ve anormal protein agregasyonları gibi pek çok sayıda patolojik mekanizmanın sinir sistemine ait işlevsel restorasyonu engellediği bilinmektedir. ROCK'un, nörodejeneratif hastalıkların patogenezinde yer alması bu hastalıklarda daha ileri translasyonel araştırma ve terapötik hedef olarak görülmesine neden olmuştur. Bu nedenle ROCK fonksiyonunu inhibe edecek yaklaşık 170'e yakın farmokokinetik ajan bulunmuştur. Bunların içerisinde en etkili inhibitör maddeler izokolin türevleri olan **Fasudil** grubu ve aminopiridin türevi olan **Y-27632**'dir. Klinikte onay almış iki lisanslı ROCK inhibitörü bulunmaktadır. Bunlardan birincisi subdural hematoma vazodilatör etkisi nedeniyle kullanılan Fasudil, ikincisi ise glökom tedavisinde kullanılan ripasudil'dir. Bu çalışmada ROCK inhibitör maddesi olarak Fasudil kullanılmıştır (Tönges ve ark,2011; Koch ve ark,2017)

Alzheimer hastalığı (AH) ve Parkinson hastalığı (PH) gibi ilerleyici nörodejeneratif hastalık semptomları bilişsel ve davranışsal değişiklikler ile karakterizedir. İnsanlarda bu patolojik koşullar altında alınan numunelerde ROCK2 ekspresyonunun beyin dokusunda arttığına yönelik bulgular mevcuttur. Her ne kadar ROCK2'nin sinir sisteminde daha dominant olduğu bilirse de ROCK1'in MSS'de ekspresyonunun olması olağandır. Rho ilişki kinaz inhibisyonu Parkinson hastalığında (PH) dopaminerjik nöron hasarını önlerken, Alzheimer hastalığında (AH) ise amiloid beta-42 (A $\beta$ 42) seviyesini azalttığı görülmüştür. Dolayısıyla bu hastalıklarda yeni moleküler bir terapötik hedef noktası olarak düşünülmektedir (Pedrini ve ark,2005; Koch ve ark,2017)

Öğrenme, yaşantılar ve deneyimler sonucunda davranışsal değişimler olarak ifade edilmektedir. Birden fazla öğrenme türü olmasına rağmen hipokampus öğrenme ve bellek ile ilgili ikonik bir beyin bölgesini ifade eder. Hipokampus, temporal lobun medial kısmında lateral ventrikülün ön boynuzu boyunca uzanan gri cevher tabakasıdır. Yön bulma, hafıza ve uzamsal öğrenmede fonksiyona sahip olan hipokampus nörodejenerasyonda ilk etkilenen beyin bölgesidir. Özellikle uzun dönemli güçlenme

(UDG) değişiklikleri ile belleğin değerlendirildiği sinaptik plastisite yanıtının en yüksek olduğu bölgedir. Öğrenme ve hafıza, dış çevreden gelen uyarılar sonucunda nöronlardakielektriksel, kimyasal ve yapısal değişikliklere bağlı olarak sinaptik bağlantıların yenilenmesini sağlarlar. Bu işlem sinaptik plastisite olarak betimlenir. Uzun dönemli güçlenme (UDG), uzun dönemli baskılanma (UDB) ve depotansiyasyon (DP) en iyi bilinen sinaptik plastisite formlarıdır. Bu formlar memeli beyninde bilginin depo edilmesini sağlayan çeşitli hücrel mekanizmaları kapsamaktadır. En etkin çalışan formu uzun dönemli güçlenme (UDG) olarak bilinir (Neves ve ark,2008;Pinarve ark,2017). Bu çalışmada Rho ilişkili kinazlar Fasudil ile inhibe edilerek sinaptik plastisite formlarından uzun dönemli güçlenme (UDG), uzun dönemli baskılanma (UDB) ve sinaptik plastisitenin plastisitesi olarak tanımlanan metaplastisite (MP)üzerindeki etkilere bakılmıştır. Metaplastisitede nöronlarda öncelikle düşük frekanslı uyarım (DFU) ile sinaptik ileti baskılanırken daha sonra yüksek frekanslı uyarım (YFU) ile nöron yanıtlarının güçlendirildiği bir deney protokolüne tabi tutulur. UDG'de ise yüksek frekanslı uyarı (YFU) kullanılarak sinapslar güçlendirilmektedir. Son olarak UDB kayıtlarında ise düşük frekanslı uyarı (DFU) verilerek sinaptik aktivitenin işlevsel olarak yavaşlatıldığı bir deney protokolü kullanılmaktadır. Burada elde edilen yanıtlarda kinaz ve fosfatazların farklı seviyelerdeki katkıları önemli rol oynar. Bu çalışmada ki elektrofizyolojik kayıtlar, hipokampus dentat girus bölgesine ve entorinal korteksten dentat girusa ilerleyen perforan yol üzerine yerleştirilmiş olan elektrotlar vasıtasıyla alınacaktır. Hipokampal öğrenme ve bellek performansı üzerinde ROCK sinyal yolağına yönelik davranış çalışmaları oldukça fazladır. Bu çalışmada, Rho ilişkili kinazların nörodejeneratif hastalıklarda uzamsal öğrenme ve baskılanmadaki rolünü belirleyebilmek için ROCK yolağı inhibe edilerek elektrofizyolojik kayıtlama yapılacaktır.

Nörodejenerasyonda, bilişsel gerileme ile bağlantılı olarak sinapslardan patofizyolojik yanıtlar alınmaktadır. Bu yanıtların oluşumuna neden olan hücrel mekanizmalar arasında en önemli sinyal yolaklarından biriside Rho/ROCK sinyal yolağıdır. Bu nedenle, ROCK inhibitörlerinin terapötik bir hedef olarak uygulanması bilişsel fonksiyonlarda gerilemeyi azaltmakla birlikte yetişkin hipokampal nörogenezde değişikliklere yol açabileceğini göstermiştir (Koch ve ark,2017). Bu çalışmada ROCK sinyal yolağının inhibisyonu Fasudil maddesi ile gerçekleştirilmiş olup hücrel düzeyde infüzyonu sağlanmıştır. Elde edilen bulgular, UDG yanıtlarının baskılandığı,

UDB yanıtının ise artırıldığı yönündedir. Ancak ilginç bir şekilde metaplastisite yanıtlarında UDG inhibisyonu ortadan kaldırılmıştır. Bu bilimsel farklılıkların Rho ilişkili kinaz yolağı ve kullanılan inhibitör maddelerin inhibisyon yeteneğı hakkında bilgilere ışık tutacağı kanaatindeyiz. Aynı zamanda günümüzde hızla artan AH ve PH gibi nörodejeneratif hastalıkların yeni tedavi keşiflerine katkı sağlayacağı düşüncesindeyiz.



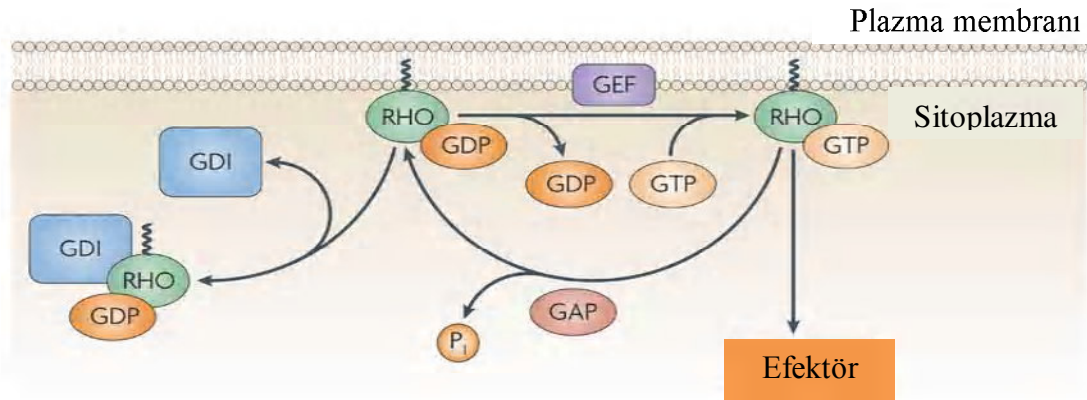


## 2.GENEL BİLGİLER

### 2.1 RHO/RHO-KİNAZ (ROCK) PROTEİN AİLESİ

Rho, moleküler kütlesi 160k/Da olan guanozin difosfat'a (GDP) bağlı inaktif ve guanozin trifosfat'a (GTP) bağlı aktif formu bulunan serin treonin kinaz yapılı bir proteindir (Özdemir ve ark, 2009; Huang ve ark, 2014)Rho proteinlerini diğer küçük guanin trifosfatazlardan (GTPaz) ayıran yapısal özellik, küçük GTPaz alanındaki beşinci iplikçik ile dördüncü  $\alpha$  helezonu arasında yer alan Rho ekleme bölgesinin varlığıdır. Amino asit dizilimlerinin boyu >700 kadar uzayabilir (Valencia ve ark, 1991). Bu proteinlerin hücre adezyonu, hücre proliferasyonu, migrasyon, otofaji, apoptoz, aksonal rejenerasyon, sitoskeletal reorganizasyon, gen ekspresyonu, kan basıncı homeostazı, düz kas kontraksiyonu ve inflamatuvar yanıt gibi pek çok hücrel olaylarda sinyal iletiminin rol aldığı bilinmektedir (Özdemir ve ark, 2009). Küçük GTPaz'lardan Ras proteini üst ailesinin önemli ve büyük bir kolunu oluşturmaktadır. Bilinen en yaygın üyeleri RhoA, Rac1 ve Cdc42'dir. Bu üyeler serum tepki faktörü, NF- $\kappa$ B, stresle aktive olan protein kinazlar ve siklin D1 gibi sinyal moleküllerinin aktive edilmesi yoluyla gen ekspresyonunun düzenlenmesine ilaveten büyümeyi destekleyici ve anti-apoptotik fonksiyonları gerçekleştirmektedirler. Üyelerin tamamı, GTP bağlayıcı proteinlerin karakteristik dizilim motiflerini içermektedirler. Ayrıca üyelerin çoğunluğu izoprenoid lipidler tarafından C-terminal translasyon sonrası modifikasyona uğrarlar. C-terminal modifikasyonları sonrası subselüler hedeflerdeki varyasyonlar için farklı biyolojik aktivitelere sahip ancak birbirleri ile ilişkili kritik izoformları meydana getirmiştir. (RhoA, RhoB ve RhoC) (Wennerberg ve Channing, 2004).

Rho GTPaz'ların GDP-GTP döngüsünü düzenleyen üç protein ailesi bulunmaktadır. Bu protein döngüsü Şekil 2.1'de gösterilmiştir.

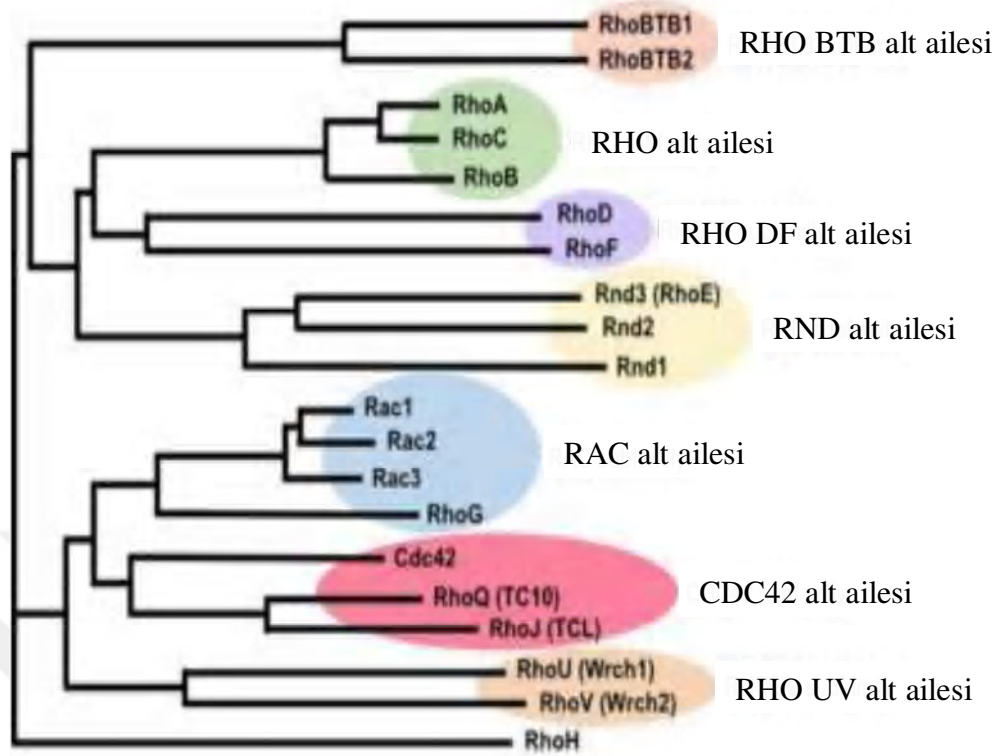


Şekil 2.1 Rho GTPaz'ların hücre içi düzenlemesi.

Tipik Rho GTPazların GDP ve GTP'ye bağlı formları arasındaki geçişi, guanin nükleotid değişim faktörleri (GEF) ve GTPaz aktive edici proteinler (GAP) tarafından organize edilir. Terminalinin yakınında bir prenil grubu ile hücre zarına tutturulmuş bir Rho GTPaz görülmektedir. GTP ve GDP, GTPaz tarafından bağlanır. Guanin nükleotid değişim faktörü (GEF), GTP'nin bağlanmasına izin verir. Dolayısıyla GDP salınımını katalize eder. GAP ve GEF'ler yapıcı ve endüktif olarak hücre membranı ile ilişkilidirler. Rho'nun guanin nükleotid ayrışma inhibitörleri (GDI) aracılığıyla, GDP 'ye bağlı formu ayrılabilir. Geleneksel olarak üç ayrı RhoGDI tanımlanmıştır: RhoGDI-1 ( $\alpha$ ), RhoGDI-2 (D4 / LyGDI /  $\beta$ ) ve RhoGDI-3 ( $\gamma$ )'tür. Bu üç form GDI'nın farklı Rho-bağlayıcı özelliklere sahip olduğu bilinmektedir. RhoGDI-1, RhoA, Rac1 ve Cdc42'ye iyi bağlanırken, RhoGDI-3, RhoB ve RhoG'ye bağlanma gösterir. RhoGDI-2'nin hedefleri belirsizliğini korumaktadır. Aynı zamanda RhoA, Rac1 veya Cdc42'ye bağlanma yeteneğinin iyi olmadığı görülmektedir. GTP'ye bağlı aktif formu ise efektör proteinlerine bağlanarak hücrel sinyalleri iletirler (Olofsson,1999; Victor ve ark, 2009).

GAP proteinleri ilk yıllarda Rho GTPaz'ları aktive ettiği bilinen GEF proteinlerine kıyasla sinyal sonlandırıcı olarak görev yapan bir protein olarak görülmüştür. Ancak son çalışmalar, GAP'ların dış faktörlerle düzenlendiği ve Rho'nun aracılık ettiği hücrel fonksiyonlarda önemli rol oynadığı paradigmasına neden olmuştur (Olofsson,1999; Victor, 2009; Narumiya ve Dean Thumkeo, 2018).

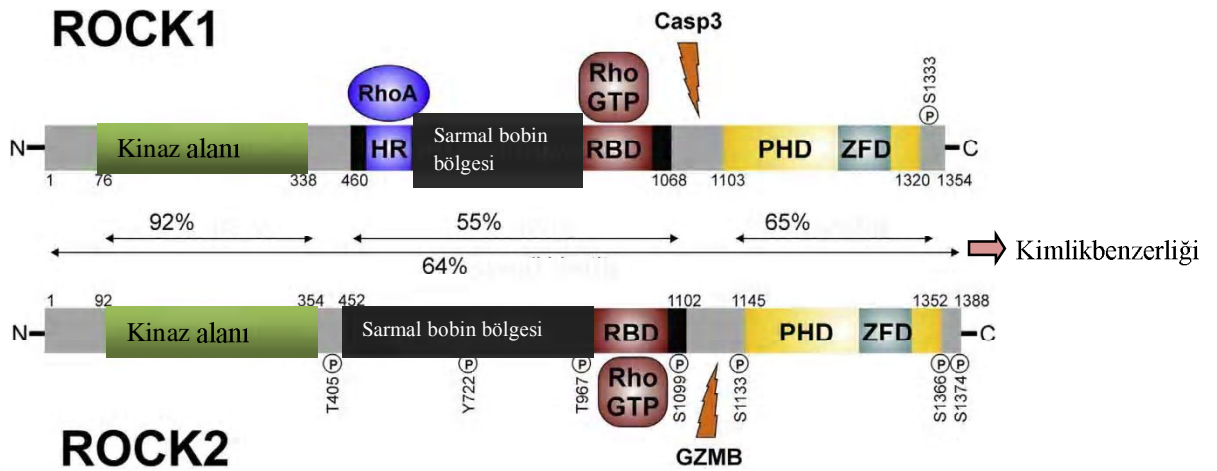
Son çalışmalardan elde edilen veriler Rho GTPaz ailesinin insanlarda bulunan 20 üyesinin varlığını kanıtlamaktadır. Bu üyeler birbirleri ile benzer ancak aynı olmayan farklı aile gruplarına ayrılmaktadırlar (Şekil 2.2) (Narumiya ve Dean Thumkeo, 2018).



Şekil 2.2 Rho GTPaz ailesi alt üyelerine ait dendrogram.

Rho GTPaz memelilerde 20 üye içerecek şekilde genişlemiştir. İnsanlarda bulunan 20 Rho GTPaz'ın aminoasit dizilimleri sıralanmıştır ve filogenetik ağaç, NJ algoritmasına dayanan ClustalW2 yazılımı (EMBL - EBI) ile üretilmiştir. Rho GTPaz'ın alt aileleri daire içerisine alınarak vurgulanmaktadır. Ayrıca tablonun sağ tarafında dahil oldukları aile adları etiketlenmiştir (Narumiya ve Dean Thumkeo, 2018).

Rho'ya ait proteinlerin bilinen ve üzerinde çalışılan en iyi efektörü Rho-kinaz (ROCK) enzimleridir. Bugüne kadar tanımlanmış iki adet ROCK izoformu bulunmaktadır. Bunlar ROCK1(ROCK $\beta$ , p160ROCK, Rho-kinaz P) ve ROCK2 (ROCK $\alpha$ )'dır (Nakagawa ve ark, 1996). İnsanlarda ROCK1 ve ROCK2'ye ait gen faktörü sırasıyla kromozom 18 (18q11.1) ve kromozom 2 (2p24) üzerinde yer alır (Jacobs ve ark, 2006). Rho kinazlar başlangıçta GTP bağlayıcı proteinlerden birisi olan RhoA'nın aşağı akış hedeflerinden birisi olarak keşfedilmişlerdir (Leung ve ark, 1995; Matsui ve ark, 1996).



**Şekil 2.3** Rho ilişkili sarmal bobin kinaz, ROCK1 ve ROCK2'nin moleküler yapısı

Rho GTPaz'ın bağlanma bölgesini içeren merkez hattı, RhoA için ek bir bağlanma bölgesi (HR) içermektedir. Bu bölgenin RhoA GTPaz'ının bağlanma yeteneğini artırdığı bilinmektedir (Blumenstein ve Ahmadian, 2004). C-terminal bölgesi ise sistein bakımından zengin plekstrin homoloji alanına (PHD) sahiptir. Burada çinko açısından zengin parmak benzeri bir (ZFD) alan bulunmaktadır. Bu alan ROCK'un membran stabilizasyonu açısından önemlidir (Koch ve ark, 2018).

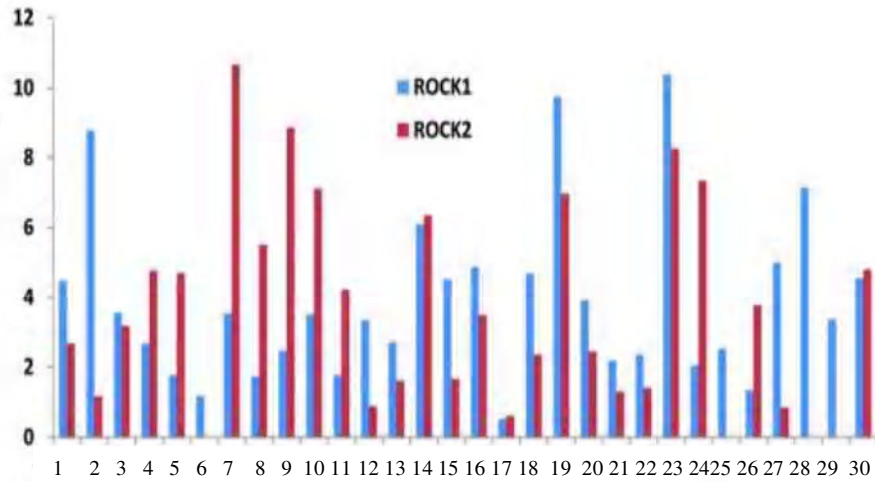
Rho proteinlerinin bağlanma bölgesi (RBD) başta olmak üzere her iki izoform yapısında da C-terminal alanı, bazal koşullar altında temel olarak Rho-kinaz (ROCK) aktivitesini inhibe edici özelliğe sahiptir (Sladojevic ve ark, 2017). C-terminal bölgesi ROCK1 için kaspaz3 enzimi (Casp3), ROCK2 için ise granzim-B enzimi (GZMB) ile aktive edilerek kinaz yapısından hücrel otofaji mekanizması ile tamamen ayrılabilir. Sonuç olarak C-terminali ROCK aktivitesinin oto inhibisyonuna yol açabilir (Sladojevic ve ark, 2017; Koch ve ark, 2018). Kısa süre önce yapılan bir çalışmada ROCK2'nin kaspaz-2 enzimi ile bölünmesinin aktive olabildiğini göstermiştir. Bu aktivasyon sonucunda hücrede trombin kaynaklı mikropartikül oluşumuna neden olmaktadır (Sapet ve ark, 2006).

Dolayısıyla ROCK molekülü iki adet dimerizasyon alanı içermektedir. Bunlardan birincisi RhoGTPaz bağlanma bölgesi (RBD) olan merkez hat, diğeri ise N terminal alanının bulunduğu kinaz yapısıdır (Koch ve ark, 2018; Boureux ve ark, 2007).

### 2.1.1. Rho-Kinaz'ın (ROCK) Doku Alanları ve Hücre İçerisindeki Dağılımı

Her iki ROCK izoformu da yetişkin dokuların büyük bir bölümünde ve sıklıkla eksprese edilebilir. Ancak ROCK1 ve ROCK2'nin bulunduğu doku alanları ve buradaki ekspresyon seviyelerindeki farklılıklar önemlidir (Matsui ve ark, 1998; Katoh ve ark,

2001). ROCK1 ve ROCK2'nin buldukları doku alanları ve buradaki ekspresyon seviyeleri Şekil 2.4'te sunulmuştur.



Şekil 2.4 ROCK1 ve ROCK2'nin doku dağılımı ve ekspresyon seviyeleri

(1; mesane, 2; kan, 3; kemik, 4; kemik iliği, 5; beyin, 6; serviks, 7; kolon, 8; göz, 9; kalp, 10; böbrek, 11; larenks, 12; karaciğer, 13; akciğer, 14; lenf nodu, 15; meme dokusu, 16; kas, 17; over, 18; pankreas, 19; PSS, 20; plasenta, 21; prostat, 22; deri, 23; ince bağırsak, 24; yumuşak doku, 25; dalak, 26; mide, 27; testis, 28; timus, 29; dil 30: uterus)

ROCK1, karaciğer, akciğer, testisler, kan ve immünsistemde baskın iken ROCK2, beyin, kalp ve düz kas hücrelerinde daha baskındır. ROCK1, hücrede çoğunlukla sitoplazmada yer alır. ROCK2 ise sitozolde daha yoğun olmak üzere iç ve plazma zarında da lokalize (RhoA aracılı aktivasyon sonrası) olabilir. Ayrıca hücre çekirdeğinde de lokalize olabilir. ROCK2'nin vimentin filamanları, stres lifleri ve sentrozomlar ile ilişkili olduğu bilinmektedir. ROCK1'in ise hücre adezyon temaları, plazma zarı, veziküller ve aktin filament yapıları ile bağlantılı olduğu bildirilmiştir (Iizuka ve ark, 2012).

### 2.1.2 Klasik RhoA, RhoB ve Cdc42 ile Bağlantılı Proteinler

RhoA, RhoB ve RhoC proteinleri ile aminoasit dizilimleri bakımından %85 oranında benzerlik göstermektedir. Bu proteinlerin aynı guanin nükleotid değişim faktörleri (GEF) ve efektörleri ile etkileşime girdiği düşünülmektedir. Ancak buna rağmen fonksiyonel olarak farklılıklar içermektedir. RhoA, sitozoliktir ve belirli derecelerde plazma membranına bağlanır. RhoB, plazma membranı ve endomembran vezikülleri ile

bağlantılıdır. RhoC ise sitozolik bir bağlantıya sahiptir (Adamson, 1992; Bustelo ve ark, 2007). RhoB, RhoA ve RhoC'nin aksine fonksiyonel olarak zıtlık göstermektedir. Ayrıca RhoB'nin hücrel büyümei inhibe edici özelliği de bulunmaktadır. Örneğin, RhoB geni nakavt edilen farelerde kanserojen kaynaklı deri tümörlerinin arttığı bilinmektedir. Dolayısıyla tümör oluşumlarında RhoB ekspresyonunun azaldığı bildirilmiştir. Sonuç olarak Farnesiltransferaz inhibitörleri (FTI) kullanılarak RhoB üzerinden anti-tümör uygulaması terapötik bir hedef olarak düşünülmüştür (Adnane ve ark, 2002).

Rac1, Rac2 ve Rac3 ile %88 oranında benzerlik göstermektedir. Rac1'in bir diğer varyantı olan Rac1b'nin kolon ve meme kanserinde eksprese edildiği görülmüştür. Hematopoetik hücreler gibi özelleşmiş fonksiyona sahipolan hücrelerde genellikle Rac2'den bahsedilmektedir. Bunun yanı sıra Rac1 protein eksikliği olan farelerde embriyojenik ölüm komplikasyonları görülürken, Rac2 protein eksikliği olan farelerde ise gelişimin normal olduğu bilinmektedir. Ancak Rac2'nin eksik olduğu fareler, normal gelişim gösterebilir de hematopoetik hücre kusurlarının oluşmasına neden olmaktadır (Fujita ve Yamashita, 2014). Rac2'nin silinmesi ya da etkisiz hale getirilmesinin de çeşitli nörotrofilik, fagositik ve lenfositik kusurlarla ilişkili olduğu bilinmektedir. Sonuç olarak hem Rac1 hem de Rac2'nin kombine eksikliklerinin hematopoetik hücrelerde ek komplikasyonlara neden olduğu görülmüştür. Bu da her iki GTPaz'ın hematopoetik hücrelerle örtüşen hücrel fonksiyonlarının olduğunu vurgulamaktadır (Gu ve ark, 2003). Rac proteinlerinden birisiolan Rac3 proteininin en çok beyinde eksprese edildiği bilinmektedir. Rac1 ile benzer bir şekilde meme kanserinde hiperaktif olduğu bilinmektedir. Rac proteinlerinin köken aldığı gen faktörüise genellikle meme kanserinde silinme gösteren 17. kromozoma yakın yerlerde lokalize olmaktadır (Morris ve ark, 2000).

Cdc42 ile ilişkili proteinlerin çoğunun Wiscott-Aldrich sendromu proteini (WASP) veya N-WASP ile birleşerek hücrelerde flopodia oluşumunu uyardığı bilinmektedir. Örneğin, izoformlarından Cdc42p proteini hücrel morfogenezini kontrol etmede rol oynamaktadır. Farklı izoformlarından Cdc42u, Cdc42Hs ve Cdc42a'nın insan dokusunun her bölgesinde olabileceği bilinmekle beraber Cdc42b'nin beyinde nöral hücre yapılarında ve kortikal alanlara özgü olduğu bilinmektedir. Cdc42'ye ait

izoformların ve insanlarda bu proteine ait genin alternatif ekzonlar eklemesi ile ortaya çıktığı görülmüştür (Machesky ve Insall, 1998).

RhoA, Rac1, Cdc42 ve diğer aile üyeleri için belirlenen çok sayıda efektör bu proteinlerin karmaşık ve çeşitli fonksiyonel özelliklerini yansıtmaktadır (Tablo 2.1).



**Tablo 2.1** RhoA, Rac ve Cdc42 için Seçilmiş Efektör Proteinlerin Listesi

Efektör	Protein Tipi	Hedef GTPaz	Temel Biyolojik Aktivite
Cnksr1	Scaffolds protein (Ksr)	RhoA	RhoA etkileşimi (Rhopilin)
Rtkn1,2	Scaffold protein	RhoA	NFκB aktivasyonu
Rhpn1,2	Scaffold, PDZ protein	RhoA	Sitoskeletal Organizasyon
Ktn1	Scaffold protein	RhoA, Rac1	Veziküler Trafik
Cdc42			Veziküler Trafik
Diaph1,2	Scaffold protein (Dia1,2)	RhoA, Rac1	Sitoskeletal Değişiklik
Arip2	Scaffold protein (Por1)	Rac1	Sitoskeletal Düzenleme
Pard6 A, G	Scaffold protein Rac1,	Cdc42	Hücre Polaritesi
Baiap2	Scaffold protein	Rac1, Cdc42	Sitoskeletal Düzenleme
IQGAP1,2	RhoGAP ve Scaffold	Rac1, Cdc42	Hücre Proliferasyonu
Was	Scaffold protein (Wasp)	Rac1	Sitoskeletal Düzenleme
Nck1	Scaffold protein	Rac1	Sinyal İletimi
Nckap1	Scaffold protein (Nap1,125)	Rac1	Sitoskeletal Düzenleme
Cyfp2	Scaffold protein (Pir121)	Rac1	Sitoskeletal Düzenleme
IL1Rap1	Scaffold protein	Rac1	İnterlökin Sinyali
Hspc121	Scaffold protein	Rac1, RhoA	Gen Ekspresyonu
Cdc42			Gen Ekspresyonu
WasL	Scaffold protein (N-Wasp)	Cdc42	Sitoskeletal Düzenleme
Trip10	Scaffold protein	Cdc42	Mikrotübül Bağlanması
Mig-6	Scaffold protein	Cdc42	JNK Yolu Aktivasyonu
Wasf1,2	Scaffold protein	Cdc42, Rac1	Sitoskeletal Düzenleme
CopG2	Coatomer protein ( $\gamma$ 2-Cop)	Cdc42	Vezikül Trafığı
Itpr1	İnozitol 1,4,5	RhoA	Endotel Hücreler Ca <sup>2+</sup> Girişi
PlcG1	Fosfolipaz C	RhoA	İkincil Haberleşme

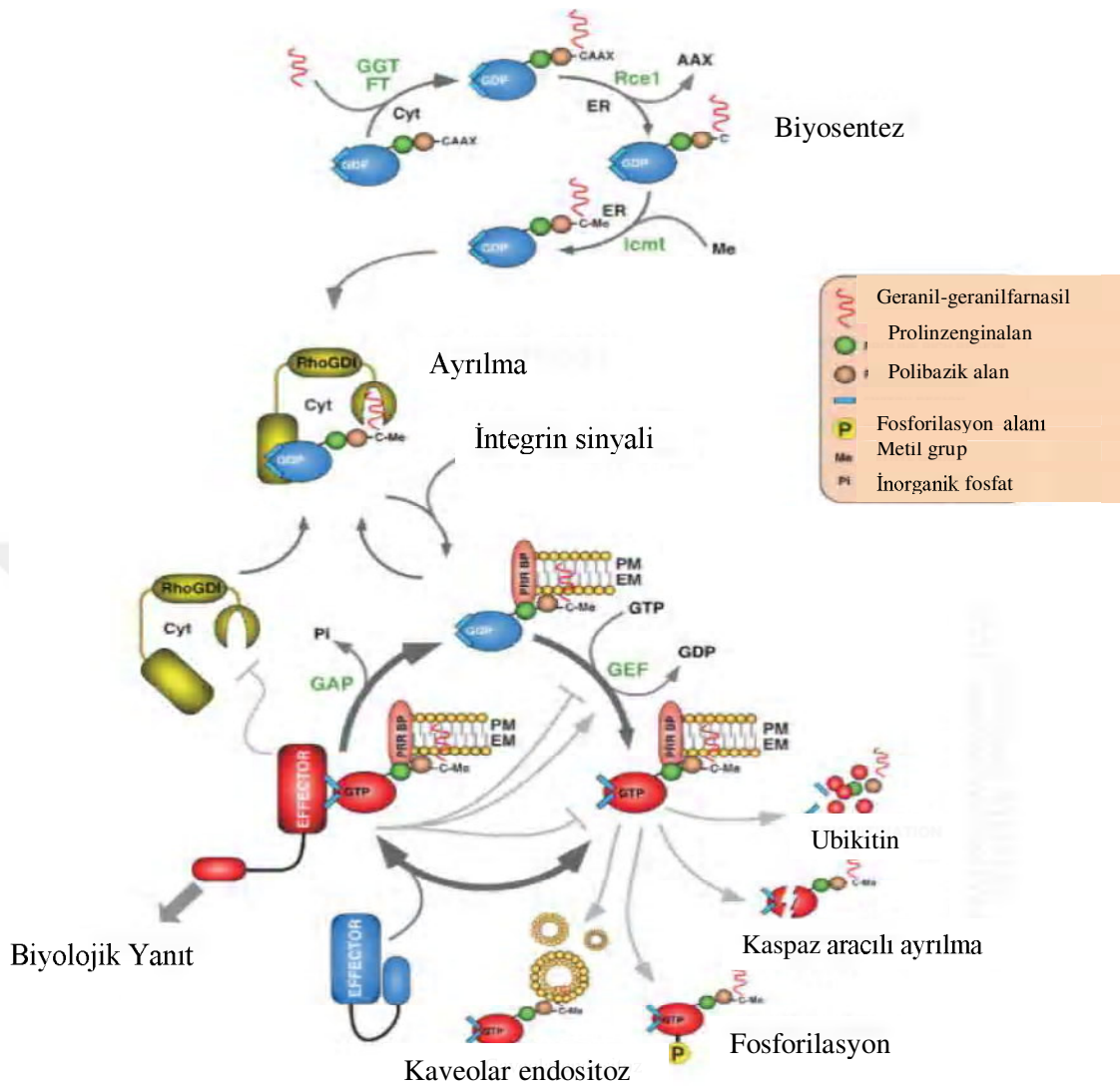
### 2.1.3 Rho Proteinleri ve ROCK Aktivitesinin Düzenlenmesi

Geleneksel olarak, çok sayıda Rho GTPaz'ın sinyal yolu aktivasyonu, aktif olmayan, GDP'ye bağlı bir form ile aktif olan GTP'ye bağlı formu arasında geçiş yapmasıyla



düzenlendiği bilinmektedir. Birkaç istisna dışında diğer düzenlemeler belirsizdir. Bunlardan, GEF'ler GDP'nin değişimi ile aktif Rho GTP bağlanmasını teşvik eder (Schmidt ve Hall, 2002). Ardından aktif Rho GTP efektörü ile etkileşime girerek sinyal yolağını aktif hale getirir. GAP'lar ise GTP'nin hidrolize olmasını sağlayarak, GDP'ye bağlı protein oluşumunu desteklemektedirler. Ayrıca nükleotid bağlanmasını bloke eden ve Rho proteini aktivasyonunu inhibe eden GDI fonksiyonunda bu düzenlemeye katılmaktadır. RhoGEF'ler Dbl benzeri bir protein ailesine ait yaklaşık 60 alt protein grubuna sahip olup RhoGAP'lar ise 80 üye içeren geniş bir protein ailesine sahiptir. RhoGAP'ların Rho aktivasyonunu düzenleme modları GEF'lere oranla daha az bilinmektedir. Ekstraselüler ve intraselüler bir uyarı sinyalinin olmadığı durumda Rho proteinleri, lipid modifikasyonlarını maskeleyen GDI'lar tarafından sitozolde tutulmaktadır (Schmidt ve Hall, 2002; Moon ve ark, 2003).

Rho GTPaz'ların hücresele dağılımdaki çeşitliliği, bulunduğu konumdaki işlevselliğini etkilemektedir. Bu etki aynı zamanda GTPaz'ların hücre içi membranlaolan bağlantıları, hücre lokalizasyonları ve C-terminal alanının lipid modifikasyonları ile ilgilidir. Rho'nun gen ekspresyonları ile olan düzenlenmesinde RhoA, Rac1 ve Cdc42 gibi Rho GTPaz'ların mRNA'sı ve protein seviyeleri, bütün dokularda genellikle stabildir. Ancak bazı Rho proteinleri, belirli dokularla sınırlı olup, bunun nedeni buradaki hücrelerde özel fonksiyonlar gerçekleştirmeleridir. Örneğin, Rac2, hematopoetik hücrelerde konakçı savunma mekanizmalarında oksijen radikallerinin üretiminde uzmanlaşmıştır. Rho ve Rac proteinlerinin çoğu biyolojik fonksiyonlarını yerine getirebilmeleri için hücre membranlarına tutulması gereklidir. Aynı zamanda daha az çalışın Rho GTPaz'ların transkripsiyonel olarak düzenlendiği görülmektedir. Bu genlerin ihtiyaç halinde kopyalandığını ifade etmektedir. Rnd alt aile üyelerinin düzenlenmesinde GDP/GTP etkisi olmadığı düşünülmektedir. Bu nedenle bu aileye ait Rho düzenlenmesini mitojenik olarak gerçekleştirdiği görüşü hakimdir (Riento ve ark, 2003; Wennerberg ve Channing, 2004). Diğer düzenleyici olaylar henüz aydınlatılmamış olup, Rho protein sinyalinin düzenlenmesi ve işleyişi kompleks bir yapıya sahiptir (Wennerberg ve Channing, 2004).



**Şekil 2.5** Rho/Rac proteinlerinin biyosentez (üst), sekestrasyon (orta) ve düzenleyici (alt) döngülerinin şematik sunumu.

İkinci durumda, prototipik GDP / GTP döngüsünün yanı sıra, efektörlerin veya diğer biyolojik yolların (ubikitin, proteaz bölünmesi, içselleştirme) etkisinin aracılık ettiği diğer düzenleyici aşamalar görülmektedir. Ana adımlar koyu gri renkle vurgulanmıştır. Döngüdeki diğer düzenleyiciler açık gri renkle ifade edilmektedir. Kısaltmalar: CAAX; C = sistein, A = alifatik amino asitlerin ve X = Met, Ser, Alanin veya Gln'nin kombinasyonundan türetilen bir kısaltma, Cyt; sitozol, EM; endomembranlar, ER; endoplazmik retikulum, FT; farnesil transferaz, GGT; geranyl-geranyl transferaz, PM; plazma zarı, PRR BP; prolin zengin bölge bağlayıcı protein (Bustelo ve ark, 2007).

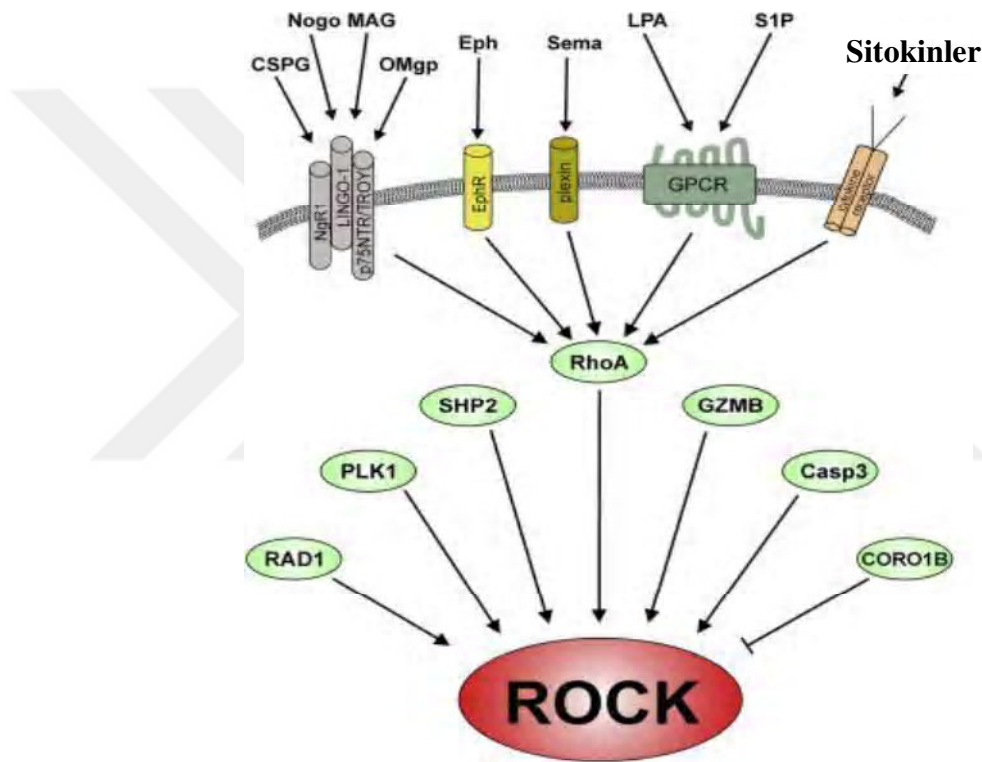
RhoGTPaz'lar içerisinde en fazla çalışılan grup RhoA, RhoB ve RhoC'dir. ROCK natürel halde iken aktif değildir. Genel olarak bu protein formları ROCK'un Rho bağlanma bölgesi (RBD) alanına bağlanarak moleküler yapıdaki C-terminal alanını konformasyonel bir değişikliğe uğrattır. Bu değişim C-terminalinin dezenfeksiyonuna ve

dolayısıyla ROCK'un katalitik olarak aktive edilmesine yol açar (Matsui ve ark, 1996; Amano ve ark, 1999; Boureux ve ark, 2007). ROCK'un aktif olan kinaz alanı sterik olarak da doğrudan bloke edilebilir. Bu blokaj ise C-terminal alanının oto-inhibisyon fonksiyonunun devreye girmesine ve ROCK aktivitesinin blokajına neden olur. Alternatif olarak ise ROCK1 için kaspaz3 (Casp3) ve ROCK 2 için ise granzim B (GZMB) enziminin proteolitik aktivitesi sonucu C-terminal alanının tamamen silinerek ortadan kaldırılması ile ROCK aktif hale getirilebilir (Coleman ve ark, 2001; Sebbagh ve ark, 2001; Sladojevic ve ark, 2017).

#### **2.1.4 ROCK Aktivitesini Yöneten Yukarı Akışlı Moleküler Regülatörler**

ROCK için en iyi şekilde karakterize edilmiş yukarı akışlı moleküler regülatörlerin Ras, RhoA ve RhoC proteinleri olduğu ifade edilmiştir. Özellikle de RhoA protein molekülünün merkezi sinir sistemi (MSS) 'de bulunan, glial destek hücreler tarafından eksprese edilen inhibitör maddelerolan; kondroitin sülfat proteoglikanlar (CSPG), myelinle ilişkili proteinler (MAG), Nogo ve oligodendrosit myelin glikoproteini (OMgp) ile aktivasyonu sağlanır. Bu protein molekülleri hücre membranı üzerinden Nogo reseptörü (NgR1), LINGO1, p75NTR ya da tümör nekroz faktörü reseptörlerinden TROY'u içeren trimetrik bir reseptör kompleksinin aktivasyonuna neden olur (Wang ve ark, 2002; Monnier ve ark, 2003). Ligand bağlandıktan sonra nörotrofin reseptör (p75NTR) bileşeni, ROCK'un temel bağlayıcı ortağı olarak tanımlanmış olan küçük GTPaz RhoA'yı aktive etmektedir (Tönges ve ark, 2011). Ayrıca RhoE gibi bazı GTP2ye bağlı proteinler, Rho bağlanma bölgesi (RBD) dışında başka alanlara bağlanarak ROCK1'in inaktive edilmesine de neden olabilir (Amano ve ark, 2010; Julian ve Olson, 2014). Rho'yu aktive eden alternatif bir regülatör olarak sfingosin-1-fosfat (S1P) ya da lizofosfatidik asit (LPA) devreye girebilir. Daha önce yapılmış olan bazı çalışmalarda insan astrositlerinde, interlökin-1β'nin (IL-1 β) RhoA proteininin doğrudan inhibisyonuna neden olduğu da bilinmektedir (John ve ark, 2004). Her iki ROCK izoformu için yapılan fosfoproteolitik çalışmalarda 50'ye yakın fosforillenme alanını ortaya koymuş olup bunların fizyolojik önemleri kesin olarak bilinmemektedir. ROCK'un bir diğer aktivasyon regülatörleride RhoA, RhoB ve RhoC dışında doğrudan GTP bağlayıcı özelliğe sahip olan diğer protein molekülleridir. Örneğin, Polo benzeri bir kinazda ROCK aktivasyonunu regüle edebilir. Birbiri ile bu kadar homolog olan bu iki ROCK yapısı fosforillenme ve katalize edici proteinler

bakımından farklılıklar göstermektedir (Ward ve ark, 2002; Koch ve ark, 2018). Örneğin, ROCK2 molekülünün Tyr-722 bölgesinde gerçekleşen fosforilasyonda RhoA proteininin bağlanmasını inhibe etmektedir. Ancak aynı alanlarda SHP2 protein molekülünün eşlik ettiği fosforillenmede tam tersi RhoA'nın ROCK2 üzerinde bağlanma afinitesinin artırmaktadır (Lee ve Chang, 2008). ROCK aktivitesinin yukarı akışlı moleküler regülatörlerindeki; kondroitin (CSPG), Nogo, miyelinle ilişkili glikoprotein (MAG), oligodendrosit miyelin glikoproteini (OMgp), ephrin (Eph), semaforin ve lizofosfatidik asit'in (LPA)etki yolu Şekil 2.6 'da sunulmuştur.

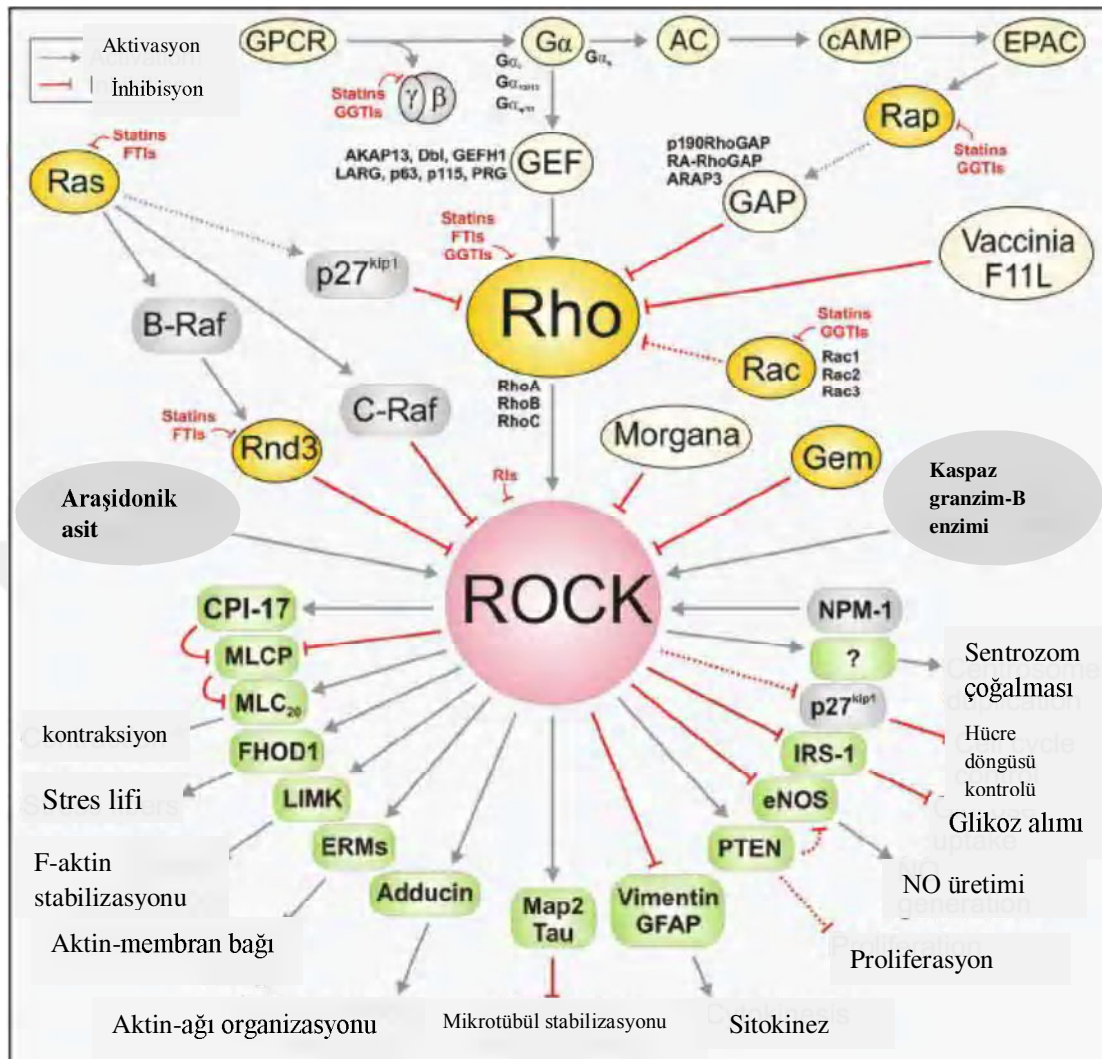


Şekil 2.6 Rho/ROCK sinyal yolağının yukarı akışlı moleküler regülatörleri.

kondroitin sülfat proteoglikanlar (CSPG), Nogo, miyelinle ilişkili glikoprotein (MAG) ve oligodendrosit miyelin glikoproteini (OMgp), NgR1, LINGO-1, p75NTR ve p75 içeren bir trimerik reseptör kompleksini (yada TROY) aktive eden bir dizi inhibitör molekülüdür. Bu moleküller vasıtasıyla RhoA uyarımı sağlanabilir. Ayrıca RhoA, ephrin (Eph), semaforin yada Gproteinine bağlı reseptörler (GPCR) aracılığıyla Lizofosfatidik asit (LPA) ve Singsosin-1-fosfat vasıtasıyla da aktive edilebilir. Sema reseptörleri ve sitokinlerde ROCK'un aktivasyonunun da rol oynamaktadır. (Koch ve ark, 2018).

### 2.1.5 ROCK Aktivitesinin Aşağı Akışlı Moleküler Regülatörleri

Yukarı akış regülatörleri tarafından aktive edilen ROCK sinyal yolağının çok sayıda aşağı akış hedefi bulunmaktadır. Aşağı akışlı regülatörleri Şekil 2.7'de sunulmuştur.



Şekil 2. 7 Rho/ROCK sinyal yolağı aktivasyonu ve aşağı akış hedefleri (Amin ve ark, 2013).

Rho sinyal ağı çoklu mekanizmalar ile hem pozitif hem de negatif etkili kontrol edilebilen hücresel işlemlerden sorumludur. Kesintisiz olarak doğrudan gerçekleşen sinyal basamağını ifade eder. Burada yer alan kesikli çizgiler varsayımları göstermektedir (Amin ve ark, 2013).

Aktif olan ROCK, hücre iskeleti reorganizasyonu, otofaji, apoptoz, vezikül dinamiği, hücresel sağ kalım, proliferasyon, hücre motilitesi ve hücre morfolojisi gibi pek çok hücresel yanıtı neden olur. Bunlar içerisinde en önemlisi aktin-myozin hücre iskeletinin düzenlenmesini sağlamaktır. Bu fonksiyonları gerçekleştirirken LIM alan kinazlarından (LIMK) LIM1 ve LIM2'nin aktivasyonuna da neden olur. Aktif olan LIMK aktin depolimerizan faktörü olan kofilin proteini'nin (CFL) inaktive olmasını sağlar.

Dolayısıyla hücrede stabil filamentin artmasına neden olur. Bu durumise hücre büyümesi ve nörit yenilenmesine engel olur (Ohashi ve ark, 2000; Endo ve ark, 2007).

Rho/ROCK sinyal yolağının aktivasyonu ile aktin polimerizasyonun sağlanması formın proteinlerinden formın homoloji alanı (FHOD1) yoluyla aktomyozin kasılmasına ve dolayısıyla stres liflerinin oluşmasına neden olur. Diğer bir fonksiyonu myozin adenozin trifosfataz (Myozin-ATPaz) aktivitesini artıran myozin hafif zincir'in (MLC) fosforilenmesini sağlamaktır. Bu sayede F-aktin ile etkileşim sonucu kontraksiyon artışı görülmektedir. Bu fonksiyonu aynı zamanda protein fosfataz düzenleyici olarak da bilinen C-kinaz aktive protein fosfataz (CPI-17) molekülü tarafından myozin hafif zincir fosfataz'ın (MLCP) inhibisyonu ile de gerçekleştirebilmektedir (Swärd ve ark, 2000; Totsukawa ve ark, 2000).

Myozin fosfataz, myozin bağlanma alt ünitesi (MBS) yoluyla fosforile edilmiş olan MLC'ye bağlanarak fosforillenmesini sağlar. MBS'nin C-terminal alanı Rho ile etkileşim gösterir. Rho ve MBS'nin fosforillenmesi myozin fosfatazın inaktive edilmesine neden olur. MLC ve MBS 'nin ROCK fosforilasyonu neticesinde myozin-ATPaz aktivasyonunu, aktin-myozinflamentleri toplanmasını ve bu yolla da stres lifi oluşumunu tetikler (Totsukawa ve ark, 2000).

Özellikle gelişmekte olan sinir sisteminde nöronal gelişim ve sinyalleşmede rol oynadığı düşünülen kollapsin yanıt proteini'nin (CRMP2) ROCK2 ile fosforillenmesi nöronal hücrelerde büyüme konisi çöküşüne neden olduğu gösterilmiştir (Arimura ve ark, 2000; Mimura ve ark, 2006; Matsui ve ark, 1998).

Hücre iskeletinin düzenlenmesinde yer alan çok sayıda protein ROCK tarafından fosforile edilebilmektedir. Bunlardan bazıları plazma membran proteinleri ile hücre iskeleti arasında bağlantı kuran ERM proteinleri'dir (ezrin, radixin, moesin). Birçok fizyolojik hücre faaliyetlerinde yer aldığı bilinen bu proteinler aynı zamanda çoğu hastalık etiolojisinde de karşımıza çıkmaktadır. Aynı zamanda daha önce yapılmış çalışmaların çoğunda ERMproteinlerinin aktivasyonu ile Rho proteinlerinin bağlantısından bahsetmektedir. Bu etkileşim, aktin hücre iskeletinin düzenlenmesi, membran proteinleri ile olan bağlantısında negatif ya da pozitif bir tepki oluşturması aktinin aktif konformasyonunun neden stabilizasyonundada değişikliğe neden olmaktadır (Matsui ve ark, 1998; Cihan ve ark, 2008).

ROCK sinyal yolu ile ilişkilihedef kinaz proteinlerinden biriside, adducin'dir. Mevcut sonuçlar ERM proteinlerinin yanı sıra adducin'inde Rho/ROCK yolunun aracılık ettiği fosforilasyonundan bahsetmektedir. Adducin, aktin toparlanmasına neden olan spektrin-aktin ağı için bir montaj görevi üstlenmektedir (Fukata ve ark, 1999).

Rho GTPaz sinyal yolağı, aşağı efektör kinazların aktive edilmesi ile önemli ölçüde hücre iskeleti düzenlemesi görevi görür. Hücrede mikrotübülle bağlantılı proteinler (MAP) ve yine hücre iskeleti ile bağlantılı protein olan tau proteinleri ROCK aracılı fosforile edilebilir. MAP proteinlerinden MAP2 spesifik olarak nöron hücreleri perikaryası ve dendritleri üzerinde bulunan özel belirteçlerdir. Tau ise nöron aksonlarında yer almaktadır. Beyinde hiperfosforile olabilen tau, birçok nörodejeneratif hastalık patolojisinde de yer alan nörofibriler yumak (NFT) oluşumuna neden olmaktadır. Bu nedenle oluşturulmuş serebral iskemili hayvan modellerinde ROCK inhibisyonunun taupatiler üzerinde olumlu etkileri olduğu görülmüştür (Costro, 2011). Ayrıca ROCK, vimentin, nöroflament, uzama faktörü-1  $\alpha$ , sodyum hidrojen değiştirici protein (NHE1) gibi çok sayıda hücre iskeleti ile bağlantılıolan proteinlerin fosforilasyonun da rol oynamaktadır (Goto ve ark, 1998; Amano ve ark, 2003; Yokoyama ve ark, 2005).

Aynı zamanda hücrede bölünme, göç esnasında mikrotübül (MT) ağının düzenlenmesi, polimerizasyon ve depolimerizasyon gibi fonksiyonlarda posttranslasyonel modifikasyonları bulunmaktadır. MT polimerini oluşturan tübül'in ROCK bağlantılı polimerizasyonunun MT asetilasyonunu azalttığı da kaydedilen veriler arasındadır. Aynı zamanda histon deasetilaz'ın (HDAC) aktivitesinde artış ile birlikte hücre göçüne neden olduğu da bilinmektedir (Schofield ve ark, 2012).

ROCK'un aşağı akış hedef kinazlarından bir diğeri fosfataz ve tensin homologu olarak bilinen PTEN'dir. PTEN aktif halde iken protein kinaz-B (Akt/PKB) sinyalleşmesinin temelinde rol oynayan fosfatidilinositoltrifosfat'ın inhibisyonuna neden olmaktadır. ROCK aktivitesi bu sinyalleşmede protein sentezi, hücre büyümesi ve rejenerasyonunda yer alan rapamisin (mTOR) kompleksinin inhibisyonundan sorumludur. Buna ek olarak, ROCK2 aracılı kinesin benzeri protein (KIF) fosforilasyonu tübül'in depolimerizasyonu ile sonuçlanır (Li ve ark, 2005; Park ve ark, 2011; Ogawa ve Hirokawa, 2015).

Nörolojik, kardiyovasküler ve immün sistemde birçok fonksiyonu olan nitrik oksit'in (NO) ROCK ile bağlantısı olduğu bilinmektedir. ROCK sinyal yolunun aktivasyonu NO ve nitrik oksit sentaz (NOS) regülasyonunu düzenler. Ras, Rho ve Rac familyasına ait sinyal yolaklarının inhibisyonu, statinler üzerinden biyolojik etkilere neden olur. RhoA/ROCK aktivasyonunun hücre iskeleti ilgili etkilerinin inhibe edilmesi statinlerin endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) ekspresyonunu artırmakta ve eNOS aracılı mRNA stabilizasyonuna neden olmaktadır. Rho/ROCK sinyal yolağı inhibisyonu, eNOS' un hızlı bir şekilde fosforile olması ve aktivasyonunu sağlar. Bunu fosfatidilinositol-3 (PI3) kinaz/protein Akt yolu ile sağlamaktadır. Dolayısıyla eNOS ekspresyonu ve aktivasyonu endotel fonksiyonu da negatif düzenlemeye neden olur. Kısaca ROCK fonksiyonunun kardiyovasküler hastalıklara aracılık ettiğine dair kanıtlar mevcuttur. Anormal ROCK aktivitesi sonucu koroner damarlarda vazospazm artar. Sonuç olarak hipertansiyon ve pulmoner hipertansiyona neden olur. Aynı zamanda kalbin art yükünü artırarak kardiyak hipertrofinin de tetiklenmesine neden olur. Dolayısıyla vasküler kas tonusu, kan akışı üzerine düzenleyici etki gösterir. ROCK inhibisyonu uygulanarak eNOS regülasyonunun aracılık ettiği vazodilastasyon ile serebral kan akışında artışa ve infark oranında azalmaya neden olur (James ve ark, 2007).

Toplanan veriler Rho/ROCK sinyal yolunun önemli hücrel yanıtlardan birisi olan apoptoz mekanizmasını da desteklediğini göstermektedir (Mills ve ark, 1998; Bao ve ark, 2004). Özellikle kanser oluşumunda önemli sinyal yolaklarından birisi PTEN/Akt yoludur. PTEN çok sayıda uyaran ile aktive olabilmektedir. Akt 'nin aşağı akış hedef efektörlerinden birisi de başta MSS olmak üzere tüm hayati organları etkileyen tüberoz skleroz kompleksi'dir (Tsc1/2). Tsc1/2 memelilerde rapamisin kompleksi (mTOR) üzerine etki etmektedir. Hücre de apoptotik mekanizmaların oluşumunda mTOR kompleksi önemli role sahiptir. Örneğin, serebral arter tıkanıklığı olan hayvan modellerinde Fasudil'in (ROCK inhibitörü (10mg/kg)) kullanımı serebral infarkt alanında apoptotik hücre ölümünü azaltmış olup hücrel sağkalımı artırmıştır. ROCK'un inhibe edilmesi ile azalan ROCK aktivitesi aynı zamanda Akt aktivitesini uygun seviyelerde tutmuştur (Shibuya ve ark, 2005; Wu ve ark,2012).

Son çalışmalar ROCK aktivitesinin otofaji modülasyonu ile bağlantısı olduğunu göstermektedir (Bauer ve ark, 2009). ROCK1 'in stres durumu altında beclin1 kaspaz mekanizmalarını tetikleyerek otofajik hücre ölümünü artırdığı bilinmektedir. Özellikle



hücrel metabolik stres durumlarında ROCK1 substratı olarak beclin1'in fosforile olduğu bilinmektedir (Gurkar ve ark, 2013).

Rho/ROCK sinyalyolunun çok sayıda hücrel işlevlerde rolü olduğu bilinmesine rağmen bu düzenlemelerin altta yatan mekanizmalarına yönelik çalışmalar halen devam etmektedir (Gurkar ve ark, 2013).

## **2.2 ROCK1 VE ROCK2 GEN NAKAVT FARELER**

Rho-kinaz'ın gen nakavt deneylerinde, ROCK2 eksiliği olan farelerde intrauterin büyüme geriliği görülmüştür. Bu farelerde aynı zamanda fetal prematüre doğum ile birlikte ölüme neden olan plasental disfonksiyonda hakimdir (Thumkeo ve ark, 2003). Bu farelerde beyin anatomik yapısı normal olmasına karşın omurga morfolojisi ve sinaptik işlev açısından yetersiz olduğu görülmüştür (Shi ve Wei, 2007). ROCK1 proteini eksik olan farelerde ise omfalosel (karın içi duvarında meydana gelen doğum kusuru) ve göz kapağı disfonksiyonları gelişmiştir (Shimizu ve ark, 2005). Moleküler dizilimleri açısından birbirleri ile oldukça yüksek seviyede homolog olan iki yapı olmalarına rağmen, eksikliklerinde birbirlerini telafi edemeyebilmektedirler. İlginç bir şekilde bilinmeyen bir sebepten dolayı ROCK1 ve ROCK2'ye ait gen faktörü nakavt edilmiş olan farelerde gelişimin normal olduğu da saptanmıştır (Shi ve Wei, 2007). Örnek bir çalışmada, tek taraflı üreter tıkanıklığı (TTÜO) olan farelerde, ROCK1 geninin silinerek hastalığın erken ve geç dönemlerinde ROCK1'e ait fonksiyonel değerlendirme yapılmıştır. ROCK1 geni silinen TTÜO modeli oluşturulmuş farelerde, renal fibroza karşı koruyucu etkili olmadığı görülmüştür. Ayrıca hastalığın ilerleyen evrelerinde renal kollajen matriksi ve fibronektin ekspresyonundada artmaya neden olmuştur (Fu ve ark, 2006).

RhoA/ROCK yolu G proteini reseptör agonistleri tarafından (Gaq yolu ile) kardiyomyosit hücrelerinde hipertrofi oluşumunu tetikler. Bu nedenle ROCK1 gen nakavt olan farelerde kardiyak yapının korunduğu görülmüştür. İyi karakterize edilmiş kardiyak hipertrofi modellerinde olumlu etkilere sahip olduğu bilinmektedir. ROCK protein eksikliği, hipertansiyon gibi patofizyolojik durumlarda kompanzatuvar bir mekanizma olarak ortaya çıkan kardiyak hipertrofinin ilerlemesinin önlenmesi açısından terapötik bir hedef haline gelmiştir (Shi ve ark, 2008). Diyabetli hastalarda vasküler komplikasyonlar sık görülmekle birlikte en sık mortalite ve morbidite nedenleri arasında yer almaktadır. Vasküler hastalık gelişimine neden olan faktörlerden birisi de

endotel vasküler disfonksiyon (EDVD) gelişmesidir. Endotel vasküler disfonksiyon ve sinir uçarındaki hasara bağlı olarak da NO seviyesinde belirgin derecede azalma görülür. Diyabetli sıçanlarda RhoA/ROCK yolu aktivitesinin artması ve bu komplikasyonlarla bağlantısı olduğu kaydedilen bilgiler arasında yer almaktadır. Toplanan veriler Rho ilişkili kinazların gen blokajı yapıldığında diyabete bağlı NO azalmasını baskılandığını göstermiştir (Yao ve ark, 2013). Klinikte kullanılan ilaçların çoğu sistemler üzerinde toksik ya da patofizyolojik komplikasyonlara neden olmaktadır. Doksorubisin'de anti tümör odaklı kullanılan ancak kardiyak toksisiteye neden olan ilaçlardan birisidir. Doksorubisin kaynaklı otofajik disregülasyonun oluşması kardiyomyopati komplikasyonuna neden olur. Daha önceki veriler Rho/ROCK sinyal yolunun kardiyak yeniden şekillenme ve otofajik hücrel aktivitelere sahip olduğunu göstermiştir. Aktif haldeki ROCK izoformlarının, otofajik hücre ölümüne katkı sağladığı bilinmektedir. ROCK geni üzerinde yapılan bozulmalarda kardiyomyositlerde ve sistemik etkide otofaji ve apoptoz oluşumuna bağlı hücre ölümünü azaltmıştır. Sonuç olarak özellikle ROCK1 için farmakolojik ajanlara bağlı kardiyak toksisite ve kalp yetmezliği komplikasyonları üzerinde olumlu yanıtlara neden olduğu gözlemlenmiştir (Shi ve ark, 2018).

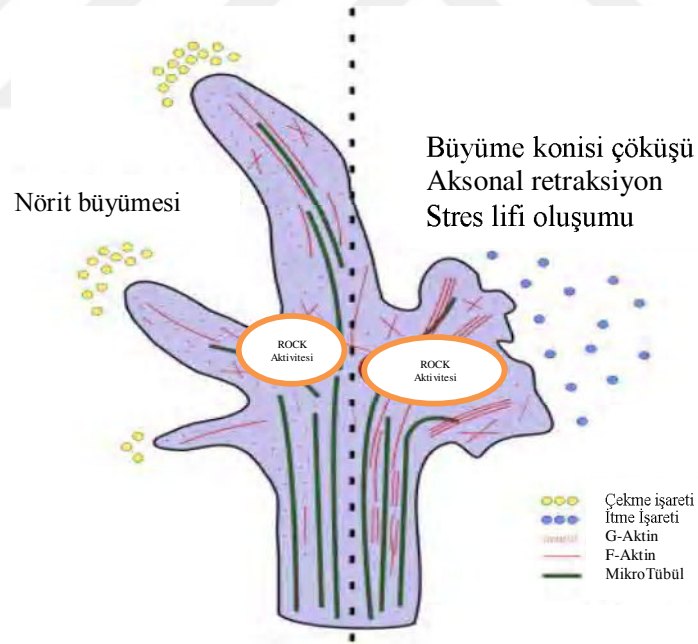
Deney hayvanlarında oluşturulan gen nakavt modelleri oldukça pahalı ve zaman alıcı çalışmalardır. Aynı zaman da bu hayvanlarda büyük oranda gelişim bozukluklarına neden olmaktadır. Bu nedenlerden dolayı nörodejeneratif hastalık modellerinde genel olarak gen susturulma deneylerinin kullanımı hakimdir (Ulusoy ve Kirik, 2011).

### **2.3 HİPOKAMPAL NÖROGENEZ VE AKSONAL REJENERASYONDA RHO/ROCK AKTİVİTESİ**

Yetişkin hipokampal nöroenez, yaşam boyu meydana gelen nöron yenilenmesidir. Rho GTPaz'lar nöron hücrelerinde; nöron morfolojisi, hücre iskeleti reorganizasyonu, nörit büyümesi, nöronal apoptoz ve sağkalım gibi çok sayıda hücrel olaylarla ilişkilidir. Nöronal büyüme esnasında ROCK aktivitesi aksonal retraksiyon ve stres lifi oluşumuna neden olmaktadır. Lateral ventrikül içerisine doğrudan Y-27632 (ROCK inhibitör maddesi) infüze edilmiş olan literatür örnekleri incelenmiştir. Bu deney modellerinde ROCK inhibitörünün en az 7 gün boyunca deney hayvanlarına uygulandığı bilinmektedir. Deney hayvanlarının beyin dokularından doku alınan örneklerinde ROCK inhibisyonunun uzamsal bellek gelişimi ile ilişkilendirilen dentat girus'ta

bulunan yetişkin doğumlu nöronların sayısını artırdığı bildirilmiştir. Aynı zaman da granüler hücre tabakasında bulunan yeni doğumlu nöronların hayatta kalma oranını da artırdığı görülmüştür. Bütün bu fonksiyonlara rağmen beyin dokusunun subgranüler alanlarında ise nöroblast oluşumunu etkilemediği kaydedilen veriler arasındadır (Bito ve ark, 2000; Christie ve ark, 2013).

MSS yaralanmalarından sonra nöron hücresi aksonları büyüme inhibe edici moleküller ve reaktif astrosit etkilerine maruz kalırlar. Bu durumda ROCK aktivitesinin artışı, aktomyozin kontraktilesinde bir artışa neden olur. Ardından akson terminallerinde geri çekme kuvvetleri ve rejeneratif yetmezliğe neden olan LIMK aktivasyonunu meydana getirir. Sonuç olarak sinir lifi oluşumunda baskılanmaya neden olduğu görülmüştür. Bu deneylerde farmakolojik ROCK inhibisyonu için Fasudil, dimetil Fasudil ya da Y-27632 kullanılmıştır. Elde edilen verilerde nörit retraksiyonunun önlendiği ve Ntera2 insan nöronlarında nörit büyümesini artırdığı görülmüştür (Lingor ve ark, 2007; Fujita ve Yamashita, 2014). Şekil 2.8' de gösterilmiştir.



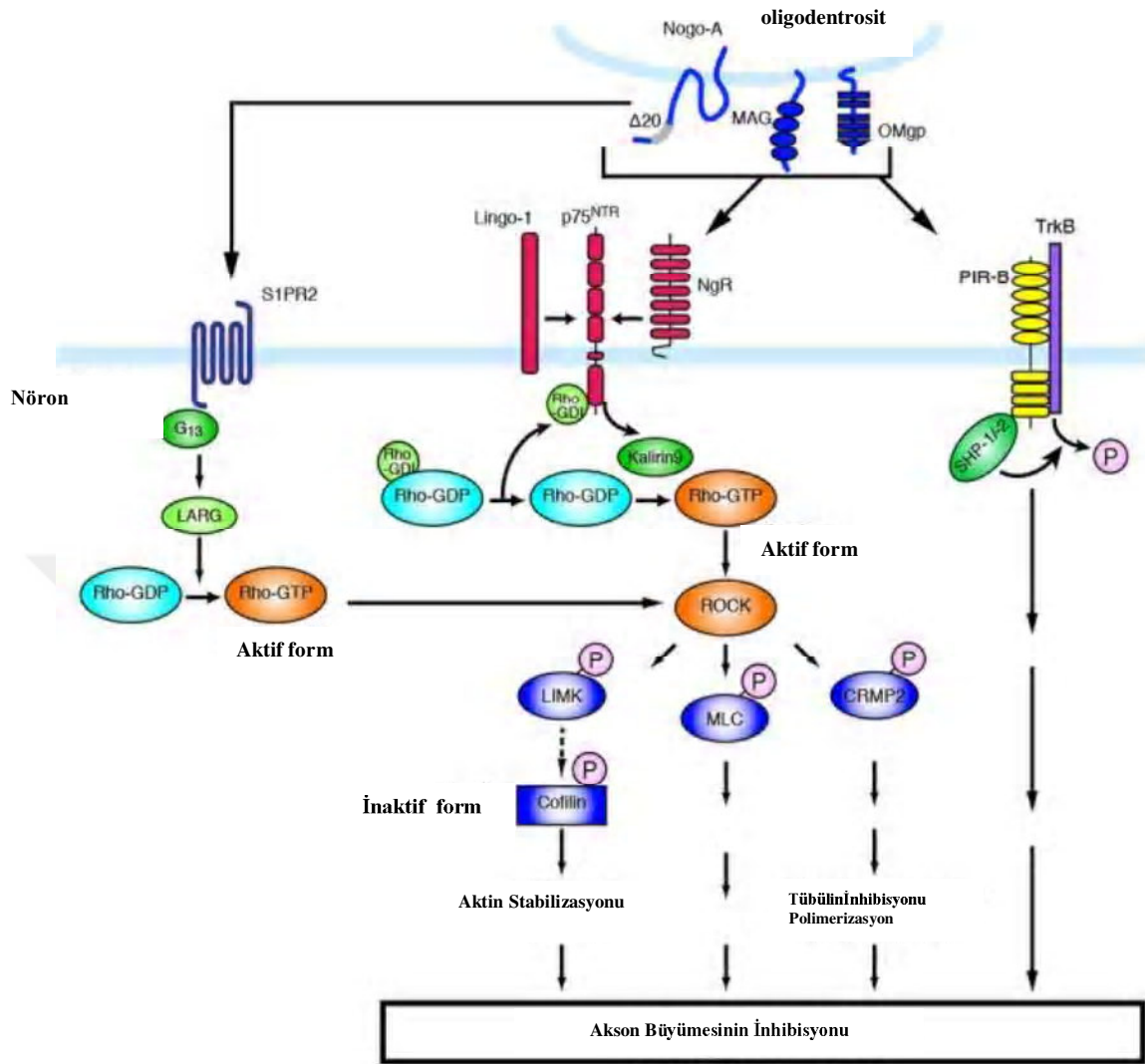
Şekil 2.8 ROCK'un aktif ve pasif formlarının nörit büyümesine etkisi.

ROCK sinyal yolağının aktif olan formu nöron uzantılarında büyüme konisinin çöküşüne neden olur. Ek olarak stres liflerinin oluşması ve aksonal retraksiyon gibi olumsuz etkilere sebep olduğuda bilinmektedir. Genç nöronların olgunlaşma safhasında,

ROCK yolağına yapılan inhibitör madde ile müdahaleaksonal başlangıcı tetikleyerek nörit büyümesine katkı sağladığı görülmüştür (Koch ve ark, 2018).

Omurilik yaralanmalarında (SCI) merkezi sinir sistemi nöronları aksonlarını yenileme özelliği gösteremezler. Bunun nedeni çoğunlukla myelinle ilişkili proteinler (MAG), myelin oligodendrosit glikoproteini (OMgp), kondroitin sülfat proteoglikanları (CSPG), Nogo gibi akson büyümesinin inhibe edici ve ROCK aktivitesini düzenleyici inhibitörlerin ROCK aktivasyonunu tetiklemesidir. En yaygın myelinle ilişkili proteinin Nogo-A proteini olduğu bilinmektedir. Nogo proteinleri reseptörü (NgR) Nogo-66'ya bağlanarak Nogo, PI3K/Akt sinyal yolunu aktive eden ve hücre iskeleti reorganizasyonunu etkileyen Rho/ROCK yolunun aktivasyonuna neden olur. Dolayısıyla ROCK yolunun inhibe edilmesinin nörit büyümesini ve aksonal rejenerasyonu artırdığı düşünölmektedir (Koch ve ark, 2018).

Yetişkin nöronlar aksonal rejenerasyon sağlamada sınırlı etkiye sahiptir. MSS'de RhoA/ROCK yolunun myelinle ilişkili inhibitör proteinler Nogo, myelinle ilişkili glikoprotein (MAG), oligodendrosit myelin glikoproteini (OMgp)) vasıtasıyla aksonal büyümeyi etkilediği bilinmektedir (Fujita ve Yamashita, 2014). Şekil 2.9'da sunulmuştur.



Şekil 2.9 Aksonal büyümeyi inhibe eden moleküler mekanizma ve ROCK bağlantısı.

Myelinle ilişkili inhibitör proteinlerden OMgp, Nogo, MAG, PIR-B ve trimetrik reseptör kompleksi (Lingo-1, p75NTR, NgR) içerisine dahil olan Nogo reseptörüne (NgR) bağlanarak sinyalleri iletirler. Nogo-A-  $\Delta 20$  protein molekülleri ise sfingol fosfat reseptör2 (S1PR2) reseptörü ile bağlantı kurar. NgR'ye ligandın bağlanmasıyla RhoA proteinini GTP aracılı aktif formunu alır. Efektör yapısı olan ROCK üzerinden çeşitli substratların fosforilasyonuna neden olur. Sonuç olarak sinir hücrelerinde aksonal büyümenin inhibe edilmesine aracılık etmektedir. Dolayısıyla ROCK sinyali yolunun inhibisyonu ile aksonal büyüme üzerindeki inhibitör etki ortadan kaldırılabilir. Yetişkin nöronlarda aksonal rejenerasyon sağlamada sınırlı etkiye sahiptir (Fujita ve Yamashita, 2014).

## 2.4 RHO-KİNAZ'IN (ROCK) SİNAPTİK İŞLEVLERDEKİ YERİ

Rho ile ilişkili kinazların çoğu nöronlarda aktin hücre iskeleti dinamiklerinin düzenlenmesinde büyük öneme sahiptir. Aktin hücre iskeleti hücre işlemlerinin yönlendirilmesini sağlayan ve hücrede aktin filamentlerinden oluşan bir iskelet görevi görmektedir. Hücrede sinaptik fonksiyon ve dendritik dikenlerin düzenlenmesinde hücre iskelet yapısı kritik rol oynamaktadır (Yan ve Pan, 2015).

Nöronlar akson ve dendrit uzantıları vasıtasıyla diğer hücreler ile temasa geçmektedirler. Sinaptik kuvvet, nöron hücresinin dendritik omurga morfolojisi ile olan bağlantısına bağlıdır. İlerleyen yaş, beyin gelişimi ve davranışsal öğrenme gibi çoğu faktörün sinaptik gelişimi etkilediği bilinmektedir (Swanger ve ark, 2016). Hücrede aktin hücre iskeletini düzenleyen çok sayıda protein kompleksi ve sinyal ağı bulunmaktadır. Bu protein komplekslerinden biriside Rho protein ailesine ait GTPazlar ve bunların efektörleridir. Bu proteinler ve sinyal kaskadları aktin hücre iskeleti dinamiğini geniş ölçüde etkilemektedirler. Dolayısıyla dendritik omurga morfolojisi ve sinaptik plastisite fonksiyonlarına da katılmaktadırlar (Holtmaat ve Svoboda, 2009). Beyin prefrontal kortekste, hipokampus alanında ve dorsal striatum gibi çoğu beyin bölgesinde Rho efektörü olan ROCK ekspresyonu sağlanmakta olup hastalıklı beyin dokusunda kontrol grubu ile kıyaslandığında ROCK aktivitesinin arttığı bilinmektedir. Eski çalışmalara ait veriler beyinde ekspresyonu daha baskın olan ROCK2 izoformunun, hücrede omurga oluşumu ve sinaptik fonksiyonlar için ROCK1'e oranla daha kritik rol oynadığını belirtmektedir. İzole hücre çalışmalarında ROCK aktivitesinin inhibisyonu ile hipokampal nöronlarda hücre iskeleti omurga yoğunluğunun artırıldığı gözlemlenmiştir (Kang ve ark,2013).

Nöron devreleri aynı zamanda yaşlanma ile beraber bozulmalarda göstermektedir. Özellikle Alzheimer hastalığı (AH) gibi hastalık patolojilerinde nöronlarda önemli ölçüde dendritik dikenlerin kaybı söz konusudur. Yaşa bağlı olarak bilişsel bozulmanın görüldüğü hastalık patolojilerinde ROCKinhibisyonu nöronal dendritik dikenlerin sayısında ve oranında artmaya neden olmuştur. Bu sonuçlar bizde ROCK inhibisyonunun sinaps oluşumu ve sinaptik plastisiteyi iyileştirebileceği düşüncesini oluşturmuştur (Yan ve Pan,2015). Beyinde, mekânsal öğrenme, korku hafızası ve çalışma gibi spesifik süreçlerde ROCK aktivitesinden söz edilmektedir. Hem presinaptik hem de postsinaptik hipokampal nöronlarda ROCK fonksiyonları uzun dönemli güçlenme (UDG) için önemlidir (Huentelman ve Stephan, 2009). ROCK'un temel substratları ile aşağı akış hedeflerinden birisi olan myozin hafif zincir fosforilasyonu (p-MLC) presinaptik alanlarda aktin ve myozin etkileşimine neden olur. Bilindiği üzere ROCK sinyal yolu MLCP'nin inhibisyonu yoluyla da MLC'yi doğrudan fosforilleyebilir. ROCK presinaptik alanlarda aktin hücre iskeleti ağı ile hücre içi vezikül dinamiğini sağlar (Luo, 2002; Huentelman ve Stephan, 2009). Yenidoğanlarda ROCK1 hipoglossal motor nöronlarda (HMN), ROCK2 ise sinaptik terminaller

üzerinde bulunur, hücre somalarında yer almaz. Aynı zamanda beyin gelişimi ile beraber beyinde ROCK2 seviyesinde giderek artış gösterir. MSS'de endojen ROCK uyarımı motor komutların normal sirkülasyonu için önemlidir. Ayrıca afferent nöronların sinapslarında veziküllerin kolay serbest bırakılabilir havuz (RRP) boyutlarının düzenlenmesini sağlar. Bu sayede nöron hücresinde sinaptik gücü koruyarak destekler (Luo, 2002).

## **2.5 NÖRODEJENERATİF HASTALIKLARDA ROCK İNHİBİSYONU**

### **2.5.1 Alzheimer Hastalığı (AH)**

Alzheimer hastalığı (AH), tıpta en sık bunama nedeni olarak bilinen ve yaşlılarda sık görülen kronik nörodejeneratif bir hastalıktır. Amiloid- $\beta$  (A $\beta$ ) peptidlerinin anormal birikimi ve tau fosforile proteinlerinin artışı ile karakterizedir. Aynı zamanda AH, hiperaktif mikrogliya, reaktif oksijen türleri (ROS) ve nöroinflamasyonla ilişkilendirilmiştir (John ve ark, 2004). Literatür taramaları ROCK'un Amiloid- $\beta$  (A $\beta$ ) oluşumuna neden olan amiloid prekürsör proteinini (APP) fosforile edebildiğini göstermiştir. Amiloid- $\beta$  (A $\beta$ ) plakları nöronlarda sinaptik fonksiyonu bozan aktin polimerizasyonu düzensizliğine neden olmaktadır (Bloom, 2014). Deneysel çalışmalarda ROCK2'nin, AH'de frontal korteks tabakasında kontrol grubuna kıyasla arttığı görülmüştür. Aynı zamanda ROCK2'nin beyin dokusunda daha fazla eksprese edildiği düşünülse de ROCK1 protein seviyelerinde AH ve kognitif bozukluklar da arttığı bilinmektedir. Dolayısıyla her iki ROCK izoformunun da AH fizyopatolojisinde rol oynadığı düşünülmektedir (Herskowitz ve ark, 2013).

### **2.5.2 Parkinson Hastalığı (PH)**

Dünya çapında ikinci en yaygın nörodejeneratif hastalık grubu olan Parkinson hastalığı (PH), dopaminerjik nigrostriatal projeksiyonların progresif dejenerasyonu ile karakterizedir. Dopamin salgılayan hücreler özellikle beyin sapında substantia nigra'da yer almaktadır. Striatal dopamin eksiliği sonucu; bradikinezi, titreme, kas sertliği, bilişsel ve davranışsal bozuklukları içeren semptomlara neden olur. Dopaminerjik nöron kaybı ile substantia nigradaki mikrogliyal aktivite arasında bağlantı olduğunu gösteren birçok in vitro hayvan çalışması bulunmaktadır (Roser ve Tönges, 2017). PH'den ölen insan beyinlerinden alınan doku örneklerinde ROCK2 ekspresyonunun astrositlerde anlamlı ölçüde arttığı bulunmuştur. Ayrıca supranükleer paralizi ve kortikobazal dejenerasyonu olan deney gruplarında kontrol grubuna oranla ROCK1 ve ROCK 2

seviyelerinin arttığı da bilinmektedir. 1-Metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin (MPTP) lezyonlu farelerde ROCK inhibitörü Fasudil'in oral yolla uygulanması sonucu dopaminerjik nöronların sağ kalımında artma ile birlikte motor davranışlarda iyileşme tespit edilmiştir. Aynı zamanda nitrostriatal fiberlerin terminal uç bölgelerinin innervasyonunu koruduğu da gözlemlenmiştir. Daha seçici ve farklı bir ROCK inhibitörü olan Y-27632'nin kullanımı nörotoksinolan metil 4-fenilpridinyum'a (MPP<sup>+</sup>) maruz kalan primer mezensefalik kültür örneklerinde benzer koruyucu etkiler göstermiştir (Tönges ve ark, 2012; Gentry ve ark, 2016).

### 2.5.3 Amyotrofik Lateral Skleroz

Amyotrofik lateral skleroz (ALS), kortikalpiramidal sistem ve periferik motor nöron aksonlarında bozulma ile karakterize olan ölümcül ve ilerleyici bir hastalıktır. Hastaların üst ve alt motor nöron hasarın oluşumuna bağlı kaslarda güçsüzlük ve ilerleyen dönemlerde felç tablosundan muzdarip olduğu görülmektedir. ALS'nin SOD1-G93A fare modelinde ROCK inhibitörü Fasudil'in oral yolla uygulanması, motor semptomların başlangıcında gecikme ile birlikte hayvanların hayatta kalma süresinde uzamaya neden olmuştur. Aynı zamanda astroglial infiltrasyonda azalma ve mikroglia sayılarında artma gözlenmiştir. ROCK sinyal yolu ALS hastalarında özellikle ALS gen mutasyonu keşfinden sonra daha da önem kazanmıştır. Monomerik (G) aktin'in filamentous (F) aktin'e dönüştürülmesinde önemlidir. ALS hastalarından alınan doku örneklerinde ROCK ekspresyonunun arttığı ve hücre iskeleti patolojilerinin de belirgin olduğu görülmektedir. Ancak hem Fasudil hem de Y-27632 ROCK inhibitörleri seçicilik özelliği yüksek olmadığından dolayı diğer kinazların inhibisyonuna da neden olabilmektedirler (Gentry ve ark, 2012; Roser ve ark 2016).

### 2.5.4 Huntington Hastalığı (HH)

Huntington hastalığı (HH) poliglutaminleri kodlayan CAG tekrar sayısının (sitozin, adenin) artmasının neden olduğu striatum ve kortekste ciddi nöron kaybı ile seyreden kronik, ölümcül bir nörodejeneratif hastalıktır. İstemsiz vücut hareketleri, bilişsel gerileme ve kişilik değişiklikleri ile karakterizedir. Huntington (HTT) gen mutasyonu sonucu mutant HTT formları oluşturmak amacıyla CAG genişlemesi görülmektedir. Y-27632 gibi ROCK inhibitörlerinin hücrede makro otofaji ve proteozomal işlem yoluyla mutant HTT, androjen reseptörü (AR) topaklanması ve poliglutamin içeren (ataksin-3, atrofin-1) proteinlerin yıkımını artırdığı gözlenmiştir. HH'de, ROCK inhibisyonu



yapılmasının hastalığı modifiye edici özelliği olmasına rağmen altta yatan patolojik mekanizmalar henüz tam olarak tanımlanamamıştır (Bauer ve ark, 2009).

### **2.5.5 Multipl Skleroz (MS)**

Multipl skleroz (MS), merkezi sinir sistemi (MSS)' nin demiyelinizasyonu ve akson hasarı ile karakterize olan kronik inflamatuvar bir hastalıktır. Önceki çalışmalardan elde edilen verilerde MS hastalarının beyin, dalak ve omurilik gibi dokularda ROCK aktivitesinde artış olduğu gösterilmektedir. MS çalışmalarında en uygun hayvan modellerinden birisi otoimmün ensefalomyelit'tir (EAE). Fasudil bu hayvan modelleri üzerinde mikrogliya/makrofaj polarizasyon kontrolü sağlamıştır. Kan beyin bariyeri bütünlüğünü koruyucu ve inflamatuvar yanıtı azaltıcı etki göstermiştir.

## **2.6 OFTALMOLOJİ VE ROCK**

### **2.6.1 Diyabetik Retinopati**

Rho kinaz inhibitörleri oftalmolojide birçok patoloji durumunda incelenmiştir. Özellikle glokom tedavisinde, diyabete bağlı retinopatilerde ve kornea endoteli iyileştirilmelerinde etkili olduğu kantlanmıştır. Yalnızca konjonktival hipereminin ROCK inhibitör kullanımına bağlı olarak arttığını gösteren kanıtlar da mevcuttur. Diyabetik retinopatilerde ROCK inhibitör maddesi intravital enjeksiyon yolu ile uygulanmıştır. Japonya Kyushu Üniversitesi'nde yapılan oftalmolojik çalışmalarda diyabetik nöropati bulunan sıçanlarda lökosit adezyonu olduğu saptanmıştır. Bu adezyon, kan retina bariyerini hasara uğratarak inflamatuvar stokin ve büyüme faktörlerinin salınımına neden olur. ROCK inhibitörlerinin özellikle bu hastalıklarda lökosit yapışmasını azaltarak tedaviye katkı sağladığı görülmüştür. Aynı zamanda Rho sinyal yolağına ait aşağı akış protein sentezlerini de azalttığı bilinmektedir. Rhosinyal yolunun aktivitesi hipoksik durumlarda ve oksidatif stres durumlarında Müller hücre hasarlarına da neden olmaktadır. Dolayısıyla ROCK inhibitörleri Müller hücrelerinin bu hasara karşı korunmasını da sağlamaktadır (Arita ve ark, 2010; Parker ve ark, 2018).

### **2.6.2 Akut Kornea Travması**

Katarakt ameliyatları sonrasında komplikasyon olarak kornea dejenerasyonları görülebilmektedir. Bu gibi durumlarda ROCK inhibitör maddeleri korneada bulunan hücrelerin proliferasyonun sağlanması için denenmiştir. Japonya'da katarakt ameliyatı geçiren hastalarda ciddi kornea hasarı ve ödemi tedavi etmek amacıyla ROCK

inhibitör damlaları kullanılmıştır. Kullanım sonrası yaklaşık 2 ay içerisinde korneada iyileşme ve hücre proliferasyonunda artma sağlanmıştır (Okumura ve ark, 2016).

### **2.6.3 Glokom**

Glokom, görme bozukluğu ile başlayıp ilerleyen dönemlerde görme kaybına kadar giden optik bir nöropatidir. Nedeni göz içi basıncı (GİB) artışına bağlı olarak gerçekleşen komplikasyonlardır. Fizyopatolojisi net olarak bilinmemekle birlikte tedavide GİB'i düşürmek için ROCK inhibitörleri kullanılmaktadır (Okumura ve ark, 2016).

### **2.7. KAN BEYİN BARIYERİ'NDE (KBB) ROCK İNHİBİSYONU'NUN ETKİSİ**

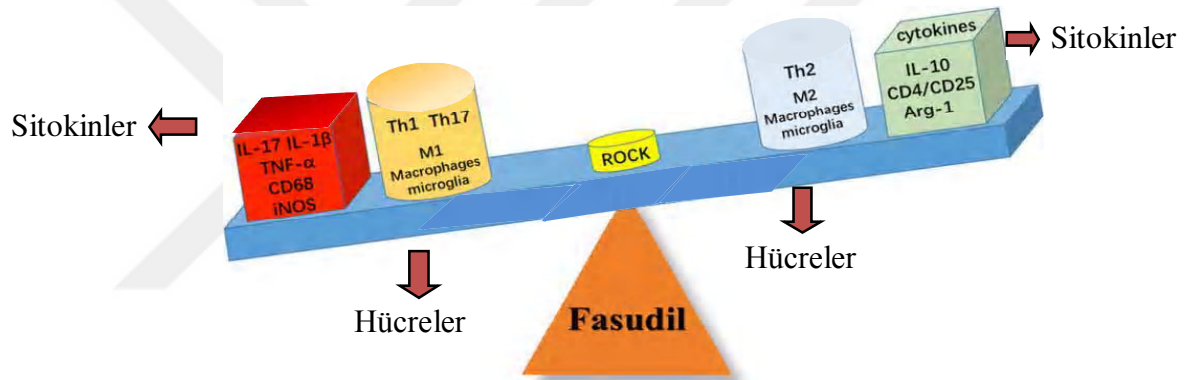
İmmün sistem kontrolü MSS ve periferik sinir sisteminde (PSS) farklılıklar göstermektedir. Bununla birlikte birçok hastalık patolojisi BBB'nin bozulmasına ve hücrel yanıt değişikliğine neden olmaktadır. Kan Beyin Bariyeri'nin (KBB) anomalisi ve periferik hücrelerin MSS'ye ön koşullanması sonucu immün saldırı ve nöron hasarı gelişmektedir. ROCK2'nin beyin dokusunda fazla ekspresyonu KBB'de önemli etkisi olduğunu düşündürmektedir. Daha önce yapılan çalışmalar ROCK inhibitörü Fasudil'in KBB'nin geçirgenliğini azaltıp bütünlüğünü koruduğu yönündedir (Guo ve ark, 2014; Zhang ve ark, 2017).

Fasudil'e kıyasla daha seçici bir ROCK inhibitörü olan KDC025 yakın bir zamanda tanımlanmış olup, KBB'yi korumada daha etkili olduğu bilinmektedir. KDC025'in klinik onaylı ROCK inhibitörü fasudil'e oranla ~200 kat daha fazla seçici olduğu bilinmektedir. Deneysel çalışmalar beyin endotel hücrelerinde (BEH) KDC025'in rt-PA kaynaklı KBB hasarını azalttığını ortaya koymuştur. KDC025 beyin astrositlerinde ROCK2 aktivitesini elimine ederken, beyin endotel hücrelerinde ROCK1'in varlığını korumaktadır. Aynı zamanda ROCK2 'nin KDC025 ile olan seçici inhibisyonu, rekombinan doku plazminojen faktörü'nün (rt-PA) astrosit hücrelerinde oluşturduğu myozin fosforilasyonu ve matriks metaloproteaz aktivitesini azalttığı da görülmüştür (Lee ve ark, 2014; Niego ve ark, 2017).

### **2.8 RHO/ROCK İNHİBİSYONU VE İMMÜNOREGÜLASYON**

RhoA/ROCK sinyal yolağı yaralanma gibi durumlarda inflamatuvar yanıt oluşumunda rol oynamaktadır. Hematopoetik olmayan hücre düzenlemelerine de katıldığı bilinmektedir. Artan kanıtlar yaralanma ve hasarın olduğu doku alanlarında T ve B

hücreleride dahil olmak üzere immün sistem hücrelerinin fonksiyon düzenleyicileri olarak ROCK'un rolünü ortaya koymaktadır (Ricker ve ark, 2016). T hücrelerinin aracılık ettiği aktin polimerizasyonu ve lipid yığılması ROCK inhibisyonu ile azalmıştır. Bu durum ise immün sistem yanıtını bozma eğiliminde olduğunu göstermektedir. RhoA/ROCK yolu kemokin aracılı T hücresi aktivasyonuna neden olur. ROCK aktivitesi T hücre göçünün hızlandırılması için önemlidir. Bu amaçla yapılmış örnek bir çalışmada, RhoA/ROCK yolu inhibisyonu, enfeksiyonel akciğer hastalıklarında T hücresi göç hızını azaltmıştır. İntegrinler ve kemokinler gibi T hücre göçüne neden olan durumlarda, Y-27632 ile yapılmış olan ROCK inhibisyonu akciğer dokusu içerisine infiltre olan T hücresinin göç hızını da geriletmiştir. T hücreleri kanser, yaralanma gibi durumlarda immün yanıtın oluşumu için gereklidir (Şekil 4.10) (Mrass ve ark, 2017).



**Şekil 2.10** RhoA/ROCK sinyal yolu immünoregülasyon ilişkisi.

T hücresi aktivasyonu ve sitokinez düzenlenmesi. Fasudil T hücrelerinin (Th1, Th17) çoğalması ve farklılaşmasını zayıflatır. M1 tipi makrofojlara/mikroglisitleri (CD68'de iNOS) inhibe edici özellik gösterir. Bu etkilere karşılık M2 tipi makrofaj oluşumunu (Arginaz-1(Arg-1) ve IL-10) artırır. CD4/CD25 T hücrelerinde IL-10 oranını artırır CD4 T hücrelerinde IL-17 oranını ise azaltır (Ricker ve ark, 2016).

## 2.9. FARMOKOLOJİK ROCK İNHİBİTÖRLERİ

### 2.9.1 ROCK İnhibitörleri ve Tarihçesi

Rho kinaz üzerinde yapılan çalışmalar ilk olarak 1980'li yıllara dayanmaktadır. Keşif dönemini takiben ROCK inhibitörlerinin hastalık patolojilerinde kullanımı ile ilgili çok sayıda çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda etkili bir ROCK inhibitörü olduğu düşünülen fasudil, ilk olarak 1995 yılında Japonya'da hipertansiyona bağlı subaraknoid kanamaların tedavisinde vazospazmı önlemek amacıyla kullanılmıştır (Suzuki ve ark,

2007). Ayrıca klinik kullanımını için lisanslandırılmıştır. Rho sinyal yolağının aktin hücre iskeleti ile olan bağlantısı 1998 yılında "Alan Hall" tarafından açıklanmıştır. İlk yıllardan itibaren aktin hücre iskeleti ilişkisi başta olmak üzere, hücre morfolojisi, adezyon ve birçok hücreyel fonksiyonla bağlantılı olduğu gösterilmiştir. Fasudil türevi olan inhibitörler 2001 yılında göz içi basıncını (GİB) düşürmek amacıyla Japonya Tokyo Üniversitesi ve Kuzey Carolina Duke Üniversitesi'nde ROCK inhibitörü olarak kullanılmıştır (Rao ve ark, 2001; Rao ve ark, 2017). Yaklaşık olarak 2010 yılından itibaren oftalmoloji alanında retinopati ve kornea hasarında terapötik bir hedef olarak çalışılmıştır. Fasudil'den sonra ripasudil 2014 yılında glokom ve oküler hipertansiyonda kullanılmak üzere klinik olarak lisans almıştır. En son Aralık 2017'de Netarsudil içeren "Rhopressa" olarak bilinen farmakolojik ROCK inhibitörü Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından onaylanmıştır. Yapılan incelemelerde 170'ten fazla ROCK inhibitör maddesi olabilecek bileşikler denendiği bilinmektedir. Birçok hastalık patolojilerinde farklı dozlarda ve farklı bileşiklerle ROCK inhibitörleri halen çalışılmaktadır (Sturdivant ve ark, 2016).

### 2.9.2 ROCK İnhibitör Türevleri

Farmakolojik ROCK inhibitörlerinin tamamı fosfat bağının ilgili substrata bağlanmasına engel olan ATP rekabetçileridir. ROCK inhibitörleri ile ilgili en büyük eksiklik hedefe yönelik spesifikliğin yetersiz olmasıdır. Bu etkileri ortadan kaldırmak amacıyla çok sayıda farmakolojik bileşiklere yönelik moleküler ve genetik çalışmalar halen devam etmektedir (Liu ve ark, 2006). ROCK inhibitörleri ve türevleri Tablo 2.2'de sunulmuştur.

<b>Tablo 2.2 Farmakolojik ROCK İnhibitörleri</b>	
<b>İzokolin Türevleri</b>	Fasudil, HidroksiFasudil, DimetilFasudil, Ripasudil
<b>Aminopiridin Türevleri</b>	Y-27632, Y-32885, Y-39983
<b>Diğer İnhibitörler</b>	Pirimidin, pirrolopiridin, pirazol, benzotiyazol, benzathiophene, aminofurazene, kinazolin ve bor türevleri

ROCK inhibitörlerinin ROCK1 ve ROCK2 seçicilik düzeyleri ile yarı maksimum inhibitör konsantrasyon dozu (IC<sub>50</sub>) oranları Tablo 2.3'te sunulmuştur

<b>Tablo 2.3</b> Farklı ROCK İnhibitörlerinin Potansiyel Karşılaştırmalarının Alfabetik Gösterimi			
<b>ROCK İnhibitörleri</b>	<b>Seçicilik</b>	<b>Potansiyel Doz (Farklı Sistemlerde)</b>	<b>IAS ve RSM potansiyel doz</b>
Fasudil (HA-1077)	ROCK I & ROCK II	IC <sub>50</sub> <sup>ε</sup> = 10.7 µmol/L	IAS IC <sub>50</sub> = 1.82 µmol/L RSM IC <sub>50</sub> = 4.57 µmol/L
GSK-269962A	ROCK I	ROCK I IC <sub>50</sub> = 0.0016 µmol/L ROCK II IC <sub>50</sub> = 0.006 µmol/L	
Hidroksi Fasudil (HA-1100)	ROCK I & ROCK II	IC <sub>50</sub> = 1.8 µmol/L	
Rhokinazinhhibitörü (H-1152 or H-1152P)	ROCK I & ROCK II	IC <sub>50</sub> = 0.0118 µmol/L	IAS IC <sub>50</sub> = 0.079 µmol/L RSM IC <sub>50</sub> = 2.51 µmol/L
RhoKinazInhibitörü II	ROCK I & ROCK II	IC <sub>50</sub> = 0.2 µmol/L	IAS IC <sub>50</sub> = 2.95 µmol/L RSM IC <sub>50</sub> = 15.4 µmol/L
Rhokinazinhibitorü III	ROCK I & ROCK II	IC <sub>50</sub> = 25.0 µmol/L	
Rhokinaseinhibitorü IV	ROCK II	IC <sub>50</sub> = 0.0118 µmol/L	
SB-772077-B	ROCK I & ROCK II	ROCK I IC <sub>50</sub> = 0.0056 µmol/L	
SR-3677	ROCK II	ROCK I IC <sub>50</sub> = 0.056 µmol/L ROCK II IC <sub>50</sub> = 0.0072 µmol/L	
SLx-2119	ROCK II	ROCK I IC <sub>50</sub> = 24.0 µmol/L ROCK II IC <sub>50</sub> = 0.105 µmol/L	
Y-27632	ROCK I & ROCK II	IC <sub>50</sub> = 5.0 µmol/L	IAS IC <sub>50</sub> = 0.436 µmol/L

### 2.9.3 Rho/ROCK İnhibisyonunda Fasudil

Bu çalışmada kullandığımız izokinolin türevi olan Fasudil, 0.33  $\mu$ M'lik Ki'ye sahip güçlü bir küçük moleküler GTPaz ROCK inhibitörüdür. Aynı türe sahip hidroksi Fasudil 0.17 $\mu$ M, dimetil Fasudil ise 1.6 nM'lik Ki'ye sahip inhibitörlerdir. Fasudil, subaraknoid kanamalarda ve pulmoner hipertansiyonda vazodilatör etkisi nedeniyle tercih edilmektedir. Fasudil'in bir türevi olan Ripasudilise glokom tedavisinde göz içi basıncını (GİB) azaltmak amacıyla onay almıştır. Ripasudil, ROCK1 için 51nM ve ROCK2 için 19 nM'lik yarı maksimum inhibitör konsantrasyon (IC50) dozuna sahip farmakolojik bir ajandır (Saito ve ark, 1999; Sasaki ve ark, 2002).

Klinik kullanımda onay almış ROCK inhibitörleri; Fasudil, Ripasudil ve Netarsudil'dir. Fasudil'in klinikte kullanımı intravenöz (İV) yolla uygulanacak şekilde onay almıştır. Ancak oral kullanım formları klinik deneylerde halen kullanıldığı bilgimiz dahilindedir. Fasudil için kullanım süresi 8-12 hafta olarak belirlenmiştir. Ancak hayvan deneylerinde 2 yıla kadar kullanımı mevcuttur. Uzun süreli Fasudil kullanımının komplikasyonları; hipotansiyon, cilt reaksiyonları ve böbrek yetmezliği olarak ifade edilmiştir. Fasudil'in uzun süreli kullanımında ilaç güven aralığı 3.125 mg/kg doz olacak şekilde hesaplanmıştır. Çok sayıda hastanın Fasudil ile tedavisinin sağlandığı prelinik ve klinik veriler mevcuttur. Ancak oral kullanımda sistemik etki nedeniyle hedef dokuda işlev yetersizliği ve uzun süreli kullanım için güven aralığı oldukça dardır. MSS ile bağlantılı birçok patolojide fasudil'in faydalı olduğuna yönelik veriler mevcuttur. Bu nedenle günümüzde nörodejeneratif hastalıklarda ve prelinik çalışmalarda teröpatik bir hedef olarak halen çalışılmaya devam edilmektedir (Fukumoto ve ark, 2013; Tatenhors ve ark,2016; Koch ve ark, 2018;).

## 2.10.HAYVAN DENEYLERİNDE GELENEKSEL FASUDİL KULLANIM DOZU VE UYGULAMA YOLLARI

### 2.10.1 İntraperitoneal Uygulama (İP)

MSS nöroproteksiyonunun indüklendiği fasudil'in intra peritoneal (İP) dozu 5-10 mg/kg olarak rapor edilmiş olup genellikle deney hayvanı modellerinde 10 mg/kg olarak tercih edilmiştir. İlaç deney hayvanlarına totalde 18 gün boyunca uygulanmıştır (Ohashi ve ark, 2000).

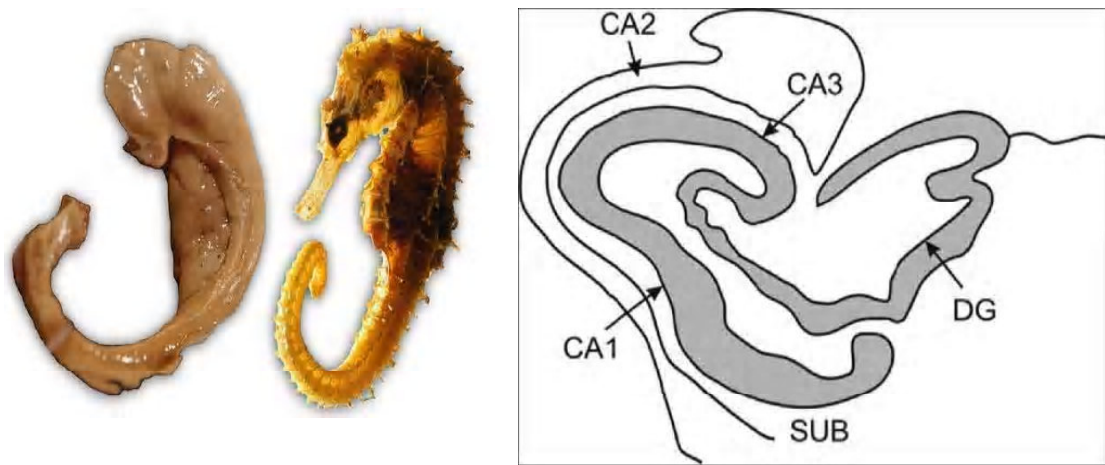
### 2.10.2 Oral Uygulama

Pulmoner hipertansiyon'da (PAH) vazodilatasyona neden olarak teröpatik etki gösteren fasudil'in, dikloroasetat (DCA) ile birleştirilerek yeni bir oral izoformu oluşturulmuştur. Kardiyovasküler çalışmalar PAH'da kardiyovasküler değerlendirmeler için tuz haline getirilmiş olan Fasudil dikloroasetat'ın (FDCA) oral kullanımı, ROCK2 inhibe edici özellik göstermiştir. Oral kullanımda FDCA; 43,3 mg/kg, Fasudil hidroklorür;37,5 mg/kg olarak test edilmiştir (Qi ve ark, 2019).

## 2.11 HIPOKAMPÜS

### 2.11.1 Hipokampüs Anatomik Yapı ve Yerleşimi

İnsanlarda hipokampüs, medial temporal lob ve lateral ventrikülün temporal boynuzu arasında yer alan çeşitli anatomik yapıların karmaşık bir bulmacası olan limbik lobun (rinensefalon) bir parçasıdır (Broca, 1877). Prefrontal korteks, septum, amigdala, hipotalamus paraventriküler çekirdek ve gyrus cinguli yapıları bu halkayı meydana getirmektedir (Knerim, 2015; Destrieux ve ark, 2013). Koronal kesitlerinde mezensefalonda "C" şeklinde görünür ve denizatına benzetilir. Bu nedenle anatomistler tarafından Yunanca "Hippocampus" isminden türetilmiş olup Latince "Hippocampus" olarak adlandırılmıştır (Destrieux ve ark, 2013). Hipokampüs'ün anatomik görünümü Şekil 2.11'de sunulmuştur.



Şekil.11 Hipokampüsün yapı olarak görünümü (Destrieux, 2013).

Hipokampus embriyolojik dönemde gelişimini bu bölgede yer alan öncü nöronların proliferasyonu ve migrasyonu yoluyla tamamlar. Gestasyonel dönem içerisinde fetal hayatın 18 ila 20. haftalarında hipokampus yetişkin şeklini almaya başlar (Sadler, 1990). Sagittal ilerleyen gövdesi, büyük bir baş kısmı ve dorsal ilerleyen kuyruk kısmı olmak üzere 3 ana bölümden meydana gelir. Hipokampus koronal kesitlerinde iç içe geçmiş gri cevher tabakası görünümündedir. Ventriküler yüzeyi alveus adı verilen piramidal nöronların akson uzantılarının oluşturduğu beyaz bir tabaka ile Cornu Ammonis'i (CA) örter ve fibril yapıda sonlanma gösterir. CA latincede koç boynuzu anlamına gelmektedir. Genel itibari ile hipokampal yapı CA1, CA2 ve CA3 bölümlerinden meydana gelir. Alveus ve piramidal hücre (stratum pyramidalis) arasında stratum oriens tabakası yer alır. Bu kısım bazal hücre dendritlerini içermektedir. Daha aşağılara inildikçe internöronların bulunduğu tabakalar görülür. Burada; Stratum lusidum, stratum radiatum ve stratum molekulare (lakunozum) olmak üzere 3 bölüme ayrılır (Broca,1877; Sadler, 1990; Destrieux ve ark, 2013).

### **2.11.2 Dentat Girus**

Memelilerde hipokampus tipik olarak CA1, CA2 ve CA3 alanlarına ve dentat girusa ayrılmaktadır. Dentat girus hipokampal oluşumun önemli bir parçasını oluşturur. Serebral korteksin orta hattında büyük bir alanı kaplamaktadır. Birçok kortikal devrede olduğu gibi, hipokampal nöronlar ya glutamaterjik veya GABAerjik internöronlar olarak sınıflandırılır. Dentat girus, glutamaterjik ana hücre tipi ve gama aminobütirik asit granül hücreleri içerir. Ek bir glutamaterjik ana hücre tipi ise, yosunlu hücrelere sahip olmak üzere diğer hipokampal bölgelerden farklılık göstermektedir (Scharfman, 2016). Bu hücre tabakaları dentat girus'un moleküler tabakasına kadar uzanmaktadır. Granüler ve moleküler hücre katmanları ikisi birlikte "fasia dentata"yı oluşturmaktadır. En içte yer alan son tabaka poliformik ya da hilus olarak adlandırılır. Yarım daire şeklinde tipik bir görünüme sahiptir. Bazı kaynaklarda CA4 dentat girus alanı olarak ifade edilir. Entorinal korteksten (EC) dentat girus'a (DG) ilerleyen perforan yol sürekli bellek oluşumu için önemlidir. DG hücreleri mossy lifler vasıtasıyla CA nöronlarının proksimal dendritleri ile birleşerek sinaptik bir yapı oluştururlar (Barr,1974).



### 2.11.3 Hipokampus Fiziolojisi

1948'li yıllara kadar hipokampus yalnızca olfaktor sistemle ilgili bir merkez olarak düşünülmüştür. Bu inanışın sebebi olfaktor bulbustan doğrudan sinir liflerini aldığı düşüncesinin varlığıdır. Ancak daha sonra koku yolu gelişimi bozulmuş olan kişilerde hipokampal gelişimin normal olduğu saptanmış olup hipokampal gelişimin olfaktor bulbusa bağlı olmadığı saptanmıştır. İlerleyen çalışmalar hipokampusün öğrenme, bellek ve zihinsel işlemleri etkilediğini ortaya çıkarmıştır (Destrieux ve ark, 2013). Hipokampus sinaptik uzun dönemli güçlenme (UDG) ve serebral iskemiye duyarlılık konularında oldukça dikkat çekici bir yapıdır. En önemli özelliklerinden birisi hipereksitabiliteye sahip olmasıdır (Jacobs ve ark, 2006). 1937 yılında ilk olarak Papez, dış çevreden alınan duyuusal bilginin bütünleştirilmesi ile var olan duruma uygun olan duyuusal yanıtın oluşturulmasından sorumlu olduğunu ileri sürdü. Kabul görmüş genel mekanizma dış çevreden alınan duyuuların serebral kortekste ilgili alanlara yönlendirilmesi ve oluşan bilginin buradan hipokampüse iletilmesidir. Hipokampusün kendisine iletilen bu bilgileri işleyerek depolanmak üzere tekrarilgili kortekse gönderdiği düşünülmektedir.

Hipokampüste monoaminerjik, kolinerjik ve GABAerjik afferentler yer alır. Örneğin, hipokampüste en çok eksprese edilen eksitatör nörotransmitter glutamat ve aspartat'tır. Somatostatin-immünoreaktif lifler, stratum lakünozum ve stratum oriente; glutamat dekarboksilaz (GAD)- immünoreaktif lifler, stratum piramidalis, stratum radiatum ve stratum oriente; kolesistokinin (CCK)-immünoreaktif liflerin ise özellikle stratum piramidaliste olduğu ifade edilmiştir (Scharfman, 2016).

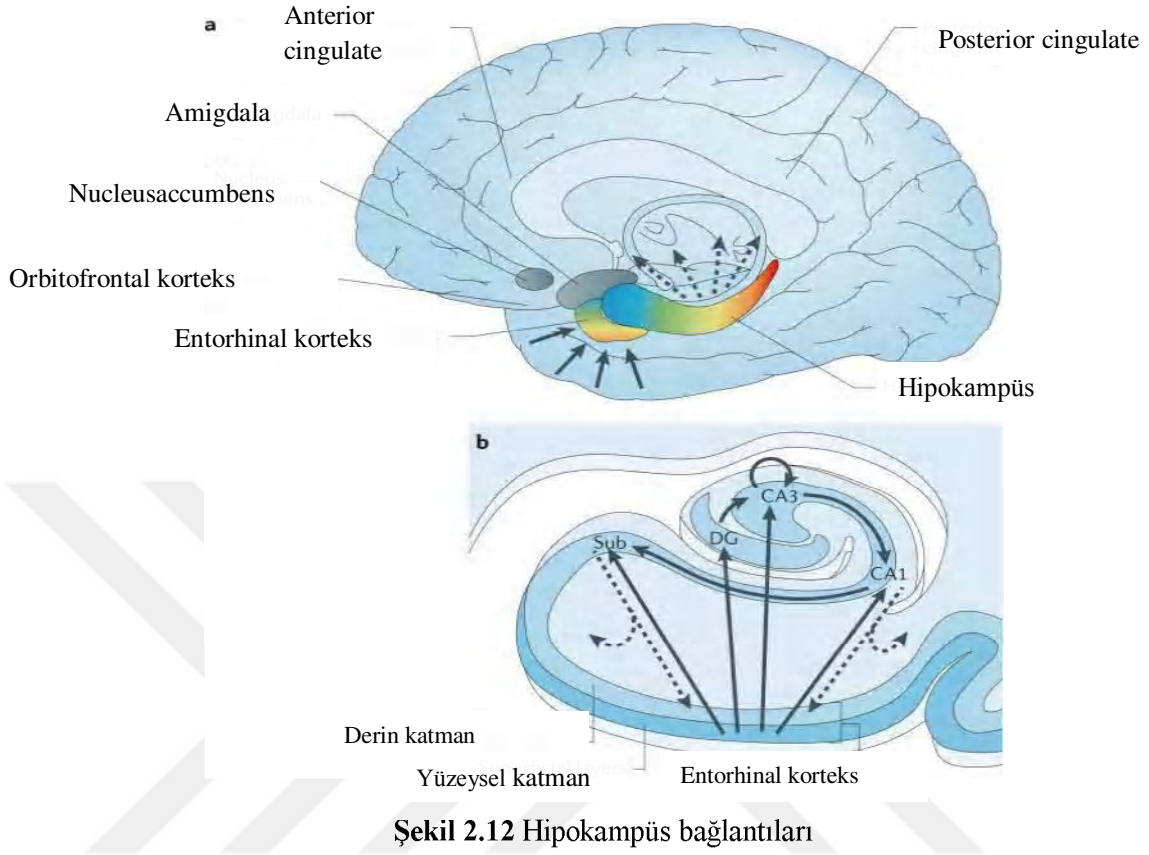
### 2.11.4 Papez Devresi

Tarih boyunca emosyonel konularda en önemli görüşlere sahip olan James Papez, 1937 yılında duyu kontrolü ile ilgili bir devreyi tanımlamıştır. Bu devre limbik sistem ve hipokampus arasında yer alan önemli nöronal bağlantıları ifade etmektedir. Korteks ve subkortikal yapılar arasında yer alan bu devreye Papez devresi (Papez Circuit) adı verilir. Papez devresi; hipokampus, forniks, corpus mamillare, tractus mamillo thalamicus, nuclei thalamicus anterior, gyrus cinguli, gyrus para hippocampalis ve hipokampüse bağlantılar yapan önemli yapılardan oluşur. Papez kuramına göre duyu kontrolü bu devre ile olan bağlantılar üzerinden gerçekleşmektedir. Bu devrede sinyaller tıpkı bir domino taşının devrilmesi gibi artarda birbirini izler. Papeze göre duyuusal

yanıtların sağlamlığı devrede herhangi bir aksaklığın olmamasına bağlıdır (Broca, 1877; Destrieux ve ark, 2013).

### **2.11.5 Hipokampal Bağlantılar ve Bilgi Akışı**

Hipokampus, beyindeki en önemli bilgi işlem birimlerinden birisidir. İşlevsel ve moleküler olarak farklı alt bölgelerden oluşan karmaşık bir devredir. Hipokampal fonksiyonun en basit, orijinal formundaki lamel hipotezi, uyarıcı aktivitenin entorinal korteksten ve hipokampüsten bir dizi paralel hipokampal “dilimler” veya “lameller” içerisinde yer alan “trisinaptik devre” yoluyla geçtiğini tanımlamıştır. Hipokampal, içsel bilgi akışı tek taraflı ve glutamaterjiktir. Devredeki ilk bağlantı entorinal korteks layer-II hücrelerinden kaynak alır. Entorinal korteks özellikle desen tanıma ve hafızanın kodlanması açısından önemlidir. Perforan yolak olarak isimlendirilen lifler aracılığıyla buradan kaynak alan çıktının dentat girus'a (DG) inputu sağlanır. Dentat girus (DG) ilk büyük ağ geçidini oluşturur (Barr, 1974). Ardından dentat girus yosunlu lifler vasıtasıyla CA3'e bağlanma gösterir. CA3 nöronları, 'oto-ilişkisel' yollar aracılığıyla veya Shaffer kollateralleri boyunca CA1 ile hipokampal uzun ekseninin yukarı ve aşağı diğer CA3 nöronlarıyla birbirine bağlanmasını sağlar. Son olarak, CA1 alt sınıfına bağlanma gösterir. Bu bağlantı düzenine ek olarak, entorinal korteksin tabakası II, CA3'e çıkıntı yapar ve entorinal korteksin tabakası III, CA1'e ve diğer alt sınıflara doğrudan bağlantılar gönderebilir. Hipokampus bağlantıları Şekil 2.12'de sunulmuştur.



**Şekil 2.12** Hipokampus bağlantıları

Entorhinal korteks (EC) hipokampal organizasyon için bir kapı görevi üstlenir. Parahipokampal korteks, işitsel korteks, koku ve amigdala gibi pek çok alandan girdi almaktadır. EC'de bilgi girişi önden arkaya doğru bir hat ile düzenlenir. Hipokampal organizasyon dışsal inputlarını ise farklı korteks bölgeleri, amigdaloid kompleks, medial septal bölge ve talamus gibi yapılardan almaktadır (Sadler, 1990).

## 2.12 HİPOKAMPÜSTE SİNAPTİK PLASTİSİTE

Hipokampus beyindeki varsayımsal bilgi depolama mekanizmaları bağlamında sinaptik plastisite çalışmalarında önemli deneysel bir sistem olmuştur. Nöron ve nöronal yollarının basit laminer paterni in vivo ortamda sınırsız periyodlarca sinaptik hadiselerin kaydedilmesi için ekstrasellüler kayıt tekniklerinin kullanımına olanak sağlamıştır. Sinaptik plastisitenin en fazla çalışılan modeli olan uzun dönemli potansiyelizasyonun varlığı ilk kez hipokampüste saptanmıştır. Elektrofizyolojik, biyokimyasal ve moleküler teknikler kullanılarak geniş biçimde nitelendirilmiştir. Birçok güncel çalışma öğrenmeyi takiben hipokampus ve amigdaladaki UDG benzeri sinaptik değişimleri saptamıştır. Aktivite bağımlı plastisitenin uzun-süreli depresyon

(UDB), EPSP-genliği potensiyalizasyonu, genlik-zamanlamasına-bağımlı plastisite (STDP), depotensiyalizasyon ve depresyon gibi diğer çeşitleri de bulunmuştur. Transvers hipokampal kesit hazırlama bu alanda özellikle öneme sahip olup farmakolojik ajanların hızla uygulanmasına ve temizlenmesine olanak sağlayarak intrasellüler ve yama-kıskaç kayıtlarına olanak sağlamıştır. Ek olarak, hipokampal nöronlar ya transvers "organotipik" kesitlerin veya disosiye nöronlar şeklinde popülasyonların kültürlenmesine olanak sağlayarak belli proteinlerin RNA-tabanlı azalma veya aşırı ekspresyonu gibi moleküler manipölasyonları kolaylaştırmıştır. Hipokampüste izole sinaptik membranlardan spesifik moleküler defektli sağlam hayvanların davranışsal analizine kadar birçok organizasyon düzeyinde spesifik bir rezidüde proteinin fosforilasyonu gibi etkileri takip etmeyi mümkün kılmıştır. Yine de hücrelerin geniş ağlarında ki sinaptik plastisiteye dair daha büyük tablolar tamamen aydınlatılmamıştır. Ko-aktif nöronlar arasındaki bağlantıların sinaptik plastisite mekanizmasıyla güçlendiği, böylece sadece bir alt bileşenin gelen uyarımının bir bütünü aktifleştirebileceği, böylece asıl hadiseyle edinilen aktivitenin tekrarlanacağı ileri sürölmüştür. Buradaki sorun hafızanın kodlanmasında hipokampüste bu hücre bütönlüklerinin saptanmasıdır (Neves ve ark, 2008).

Memeli santral sinir sistemindeki belki de en önemli ve dikkat çekici özellik büyük miktarda bilgiyi işlemesi ve saklayabilmesidir. Dekatlar boyunca beynin bu özelliği sağlayabilmek için önemli nöral devrelerde sinaptik kuvvetin uzun süreli modifikasyonlarını kullandığı ileri sürölmüştür. Böyle aktivite bağımlı bir modifikasyonun hipokampüsteki uzun-dönemli güçlenmesidir (UDG), yani uyarıcı aferentlerin kısa süreli yüksek frekansta uyarımıyla sinaptik kuvvetin sürdürülebilir bir artışıdır. UDG fenomenine dair çalışmalar uzun süreli hafızanın belli formlarının başlangıçta depolanması için gerekli kritik bileşenin hipokampus olduğunu göstermiştir. Ayrıca UDG'nin bazı özellikleri veri depolanması veya hafıza için ekici bir hücrenel mekanizma haline getirmiştir. Hafıza gibi, UDG'de hızla üretilebilir ve tekrarlanarak kuvvetlendirilebilir. Girdi spesifikliği gösterir, yani aynı post-sinaptik hücredeki komşu sinapslarda değil, sadece aferent aktiviteyle uyarılan sinapslarda meydana gelir. Girdi spesifitesi nöral bir devredeki depolama kapasitesini dramatik bir şekilde arttırmaktadır. En önemlisi, UDG çağrışımsaldır, güçlü bir girdi aktivitesiyle zayıf bir girdi aktivitesinin geçici şekilde çiftleşmesi zayıf girdinin UDG'sine neden olur. Klasik koşullanmayı hatırlatan bu çağrışımsal özellik çağrışımsal öğrenmenin hücrenel bir

analoğu olarak düşünülebilir. Son olarak, UDG hipokampüsün in vitro preparatlarında ortaya çıkarılmıştır ve bu durum belli deneysel manipülasyonlara olanak sağlamıştır. UDG'nin farklı formları vardır, fakat deneysel çalışmaların çoğu hipokampal CA1 piramidal hücrelerinde gözlenen UDG'ye odaklanmıştır. (Neves ve ark, 2008)

### **2.12.1. Sinaptik Plastisite ve Uzun Dönemli Baskılanma (UDB)**

Sinaptik plastisite daha önceden var olan sinapsların sinaptik transmisyonunun etkinliği ve kuvvetinde aktivite bağımlı şekilde modifikasyonlar meydana gelmesi olarak tanımlanabilir. Süresine bağlı olarak kısa ve uzun süreli plastisite şeklinde sınıflanabilir. Milisaniyelerden dakikalara kadar süren kısa dönemli sinaptik plastisitenin kısa süreli hafıza, duyuşal girdilere kısa-süreli adaptasyonlar ve davranışsal durumlardaki geçici değişikliklerde rol oynadığı düşünölmektedir. Diğer yandan, uzun süreli sinaptik plastisite dakikalardan günlere ve hatta yıllara değişen sürelerde devam edebilir ve bu yüzden uzun süreli hafızaların oluşmasıyla ilişkilidir. UDG ve UDB uzun süreli sinaptik plastisitenin iki ana formudur ve hipokampal fonksiyonda rol oynadığı düşünölmektedir. UDG dakikalardan ömür boyuna kadar değişen sürelerde sinapsın kuvvetlenmesi olarak tanımlanabilirken, UDB potansiyel olarak yine ömür boyu sürebilecek periyotlarda bir sinapsın zayıflamasına işaret eder. Hem UDG hem de UDB kompleks uzamsal öğrenme gibi görevlerde davranışsal performansla ilişkilidir, yani bu kognitif işlemlerde önemli bir rolü olduğu görölmektedir. UDB için daha resmi bir tanımlama fizyolojik veya farmakolojik bazı aktivitelere yanıt olarak meydana gelen sinaptik etkinlikteki bir düşüştür. Önemli bir nokta ise patolojik süreçlerden farklı olmasıdır. Çünkü UDB sinaptik kuvvette stabil bir düşüş meydana gelmesidir. Bazı yazarlar UDB oluşturan sinapsların değişebilir olduğunu ve UDG'yi devam ettirebileceğini ileri sürmüştür ancak, bunun gerçekten önemli bir özellik olup olmadığı belli değildir. Sinaptik azalma sinaps oluşumunun tam tersidir ve dendritlerin bölgelerinden sinaptik temasının kesildiği, sonucunda nöronun kendisinin kaybına neden olan bir sürece işaret etmektedir. Bu nöronal devrelerin gelişimi ve uygun fonksiyonu için gerekli bir gelişimsel süreçtir. Aynı zamanda disfonksiyonel sinaptik azalmanın gelişimsel ve psikiyatrik bozukluklarının bazılarının bir bileşeni olduğu da düşünölmektedir. Kesin olmayan ise UDB'nin sinaptik azalmaya neden olup olmadığı veya farklı oluşumlar olup olmadığıdır. Yapısal ve fonksiyonel değişimlerin

birbirleriyle ilişkili olduğuna dair bazı kanıtlar vardır, UDG'nin sinaps sayısı ve yapısını arttırdığı gösterilmiştir (Pinar ve ark, 2017).

### **2.12.2. UDG'nin İndüksiyonu: NMDA Reseptörleri ve Ca<sup>2+</sup>**

UDG indüksiyonunun normalde yüksek frekanslı aferent aktiviteyle oluşan postsinaptik depolarizasyon sırasında N-metil-D-aspartikasit (NMDA) reseptörlerinin aktivasyonunu gerektirdiği kabul görmüştür. Bunun sonucunda kalsiyum (Ca<sup>2+</sup>) konsantrasyonunda bir artış meydana gelir ve bu artış UDG'nin tetiklenmesi için gereklidir. Normal düşük frekanslı sinaptik transmisyon sırasında, eksitatuvar nörotransmitter olan glutamat presinaptik bir terminalden salınır ve dendritik gövdede eş, lokalize olan postsinaptik NMDA ve 2- Amino 3-Hidroksi- 5 metil-4-izoksazol- propionik asit (AMPA) reseptörlerine bağlanır. Primer olarak sodyuma (Na) geçirgen olan AMPA reseptör kanalı dinlenmedeki membran potansiyelinde sinaptik cevapların oluşmasından sorumlu akımların çoğunu sağlar. Aksine, NMDA reseptörü postsinaptik yanıtta katkı sağlamaz. Çünkü ekstrasellüler magnezyum (Mg) iyon kanalını bloklamaktadır. Postsinaptik membran UDG oluşumu sırasında depolarize olduğunda, Mg, NMDA reseptör kanalından atılarak Ca<sup>2+</sup>'un yanı sıra Na'nın hücreye girmesini sağlar. Tekrarlanan aktivasyonla, yeterli Ca<sup>2+</sup> dendritik gövdeye girerek UDG'ye neden olan sinyal mekanizmalarını aktifleştirir. Böylece, sadece hedef gövdede depolarizasyonla birlikte oluşacak afferent afinite meydana geldiğinde Ca<sup>2+</sup> girişine izin veren bir moleküler saptayıcı olan NMDA reseptörü işlevini yerine getirir. Her ne kadar önceki modeli destekleyen birçok kanıt olsa da güncel çalışmalar UDG için tetikleyici olayın Ca<sup>2+</sup>'un eşik değerinin üzerine yükselmesi gibi bir anahtar benzeri mekanizma olmayabileceğini düşündürmektedir. Örneğin, UDG'nin stabilitesi veya süresi kesin değildir ve NMDA reseptörlerinin aktivasyon derecesine ve belki de gövdedeki Ca<sup>2+</sup> artışının boyutuna bağlı olduğu görünmektedir. Dahası, tek başına Ca<sup>2+</sup>'daki büyük bir artış stabil UDG'yi üretmek için yeterli olmayabilir, afferent aktivite bazı ek önemli bileşenleri sunuyor olabilir. Olasılıklardan birisi olan glutamat, NMDA reseptörlerini aktifleştirmeye ek olarak, metabotropik glutamat reseptörlerini de aktifleştiriyor olabilir (Malenka, 1994).

### **2.12.3. UDG'de Protein Kinazlar ve Sinyal Transdüksiyon Mekanizmaları**

UDG'yi proteinlerin uzun-sürelili modifikasyonlarına çeviren ilk tetikleyici sinyalin yolağına dair çalışmaların çoğu protein kinazların rolüne, özellikle de Ca-kalmodulin bağımlı protein kinaz II (CaMKII), protein kinaz C (PKC) ve tirozin kinaz Fyn'ye

odaklanmıştır. Bu enzimlerin inhibitörleri UDG'yi bloklayabilir ve ikisinin UDG'yi ortaya çıkaran tetanik uyarıyla bir NMDA-reseptörü'ne (NMDAR) bağımlı olacak şekilde aktifleştiği gösterilmiştir. İlgili çekici bir hipotez UDG'nin artmış protein kinaz aktivitesinin idamesine bağlı olduğudur. Bu durum CaMKII'nin otofosforilasyonu veya PKC'nin proteoliz veya fosforilasyonu sonucu meydana gelebilir. Bu fikri destekleyecek ilgili kanıtlar UDG'nin indüksiyonunu takiben 30-90 dakika yüksek kalan protein kinaz aktivitesiyle biyokimyasal deneylerde gösterilmiştir. Gen hedefleyici yaklaşımların bu enzimlerin bazılarının kesin rolünü göstereceği öngörülmüştür, fakat CaMKII, PKC'yi veya Fyn'nin baskılanmasını kolayca yorumlanabilecek bir UDG fenotipi ortaya koymamıştır. Tüm bu mutantlarda, UDG'nin mevcut olduğu fakat ortaya koymasının daha zor olduğu görülmüştür. Bu farelerde UDG sinyal kaskatında kompenzatuvar ve gereksiz mekanizmaların olasılığı, bu sonuçları yorumlamayı zorlaştıracaktır. Bu nedenle, bu noktada kanıtlar UDG'de rol alan birçok protein kinazı işaret etmektedir, fakat kesin rolleri ve hedefleri belirlenmiş değildir (Malenka, 1994).

#### **2.12.4. Sinaptik Plastisite: Öğrenme ve Hafızadaki rolü**

UDG'ye dair önemli bir soru işareti hafızaları depolamak için öğrenme sırasında gerçekten kullanılıp kullanılmadığıdır. Her ne kadar kesin bir cevap verilemese de kemirgenler üzerindeki çalışmalar UDG benzeri süreçlerin gerçekten de öğrenme ve hafızanın belli formlarında önemli olduğuna işaret etmektedir. Öncelikle bir NMDA reseptör antagonisti aynı konsantrasyonlarda UDG indüksiyonunu ve uzamsal öğrenmeyi bloklarken hipokampal fonksiyon gerektirmeyen görsel bir ayırım görevinde herhangi bir etkiye sahip değildir. İkinci olarak, UDG üretimini engelleyen değişik protein kinazların hedeflenmiş gen nakavtları da uzamsal öğrenmeyi bozmuştur. Ancak öğrenmede eksikliğin derecesi UDG'deki bozukluğun derecesiyle orantılı göstermemiştir. NMDA reseptör antagonistlerinin hem UDB hem de UDG'yi blokladığı ve UDB'nin hafif davranışsal defisit gösteren protein kinaz-C izoformu (PKCr) mutant farelerde normal olduğunu belirtmek gerekir. Bu yüzden, olası bir hipotez sinaptik plastisitenin her iki formunun (UDG ve UDB) etkili öğrenmeye katkı sağladığıdır. Eğer sinaptik etkinlikteki değişiklikler uzamsal bilgilerin kodlanmasında önemliyse, o zaman hayvanın yeni bir çevreyi öğrendikçe buradaki değişiklikleri direkt kaydetmesi muhtemeldir. Bu yıllar önce gözlenmiştir, ancak sinaptik kuvvettetiklenen budavranışsal artışın anlamı, motor aktiviteye bağlı beyin sıcaklığının arttığına

gösterilmesiyle sorgulanmıştır ve bu tek başına orijinal gözlemleri açıklayabilir. Güncel olarak, bu durum sıcaklığa bağlı sinaptik kuvvetlerdeki değişiklikler çıkarılarak deneysel olarak araştırılmıştır. Sonuç olarak deney hayvanları yeni bir çevreyi keşfederken eş zamanlı olarak hipokampal sinaptik potensiyelizasyon da meydana gelmektedir. Dahası, UDG ve hafıza arasındaki bağlantıyı destekleyen kanıtlar farenin aşına olduğu veya yeni bir çevreyi keşfederken yapılan hipokampal nöronların eşzamanlı kayıtlarını düşündürmektedir. Hayvan yeni bir çevreyi öğrenirken, inhibitör inter-nöronların aktivitesi baskılanmıştır, yani sinaptik modifikasyonları kolaylaştıran bir durumdur. Sinaptik etkinlikte uzun süreli değişikliklerin hafızanın kodlanmasından sorumlu olduğunu kanıtlamak zor bir görevdir. Yine de hipokampal sinaptik plastisiteye dair çalışmalar devam etmelidir. Çünkü UDG ve UDB altında yatan mekanizmalar hafızanın fiziksel substratının deneysel analizi için en güçlü kanıtları sunmaktadır. Önemli hüresel fenomenler gibi sinaptik etkinlik de muhtemelen multiple düzeylerde düzenlenen etkileşimli sinyal kaskatlarının komplike bir ağı olarak ortaya çıkacaktır. Bu kompleks olayların tümü deneysel bir zorluk olarak karşımıza çıkmaktadır (Malenka, 1994).

### **2.12.5. Metaplastisite**

Metaplastisite terimi ilk ortaya çıktığında, UDG ve UDB'nin hassasiyetini tanımlamak için kullanılmıştır. Bu tanım sinapsların aktivasyonunun değişik şekillerde UDG veya UDB'yi tetikleyebilmesine dair verilere dayandırılmıştır. Etkilenen sinaptik plastisite olduğundan ve ilk sinaptik aktiviteyi takiben sinaptik etkinlikte belli bir değişim olmadığından, gelecekteki plastisiteyi etkileyen bu süregelen değişiklik Metaplastisite yani "sinaptik plastisitenin plastisitesi" şeklinde adlandırılmıştır.

Metaplastisite temelde iki temel etmene sahiptir. İlkinde, metaplastisite sinaptik plastisitenin özelliklerini yön, plastisitenin derecesi ya da dayanıklılığı gibi bir şekilde modifiye etmektedir. Fakat nöromodülasyondan farklı kılmak için metaplastisitenin ikinci özelliği olan metaplastisiteyi tetikleyen ilk nöral aktivite ve takip eden sinaptik plastisitenin indüksiyonu arasındaki zaman süreci olmasıdır. Metaplastisite sinaptik plastisite alanında çok dikkat çekmiştir ve buna aracılık eden mekanizmalar yoğun araştırmalara maruz kalmıştır. Ancak, sinaptik plastisite alanında karşılaşılan zorluklara benzer şekilde metaplastisite alanında da kompleksliğine dair zorluklarla karşılaşmıştır (Abraham ve Richter-Levin, 2018).



## 3.GEREÇ VE YÖNTEM

### 3.1. Deney Hayvanları ve Gruplandırma

Bu Çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) birimi tarafından desteklenen TYL-2018-8502. No'lu proje kapsamında ve Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulunun 16.07.2018 tarih ve 18/090 sayılı onayı ile gerçekleştirildi. Çalışmamızda deney hayvanlarına acı vermemek ve gereksiz sayıda deney hayvanı kullanmamak için gerekli etik kurallara özen gösterilmiştir.

Çalışma için, 60 adet erkek yetişkin (2-3 aylık) 250-300 gr ağırlığında Wistar Albino cinsi sıçan kullanıldı. Sıçanların temini ve teknik desteği Erciyes Üniversitesi Hakan Çetinsaya Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezin'den (DEKAM) sağlandı. Deney hayvanlarının en az 3 gün yerine alışmaları beklenildi. Sıçanlar musluk suyu ve standart sıçan yemi ile kısıtlama yapılmaksızın beslendi. Laboratuvar koşulları; 12 saat aydınlık/12 saat karanlık, sıcaklık  $22 \pm 1$  °C ve nem %50-60 olacak şekilde ayarlandı. Sıçanlar UDG, UDB ve MP kayıtlarının her biri için Kontrol (K, n=8-10) ve Fasudil infüzyonu (n=8-10) olmak üzere 2 gruba ayrılmıştır.

### 3.2. Cerrahi ve İnvaziv Girişimler

Ağırlıkları 250-300 gram arasında olan sıçanlar, cerrahi işlem ve invaziv girişim öncesinde 1,2 g/kg dozda intraperitoneal yolla üretan enjeksiyonu yapılarak anestezi edildi. Genel anestezi evreleri değerlendirilen sıçanlar stereotaksik sisteme (Kopf Instruments, Tujunga, CA, USA) yerleştirildi. Kulak ve ağız çubukları vasıtasıyla kafatası sabitlendi. Daha sonra cerrahi prensiplere uyularak sagittal sutur boyunca kafa derisi üzerinden yapılan 2.5-3cm'lik orta hat insizyonu ile cilt ve cilt altı dokusu geçilerek kafatasına ulaşıldı. Kafa derisi retrakte edildikten sonra netbir görünüm sağlamak üzere kemik yüzeyi spanç ile serum fizyolojik solüsyonuyla yıkanarak temizlendi. Bregma noktası işaretlendi, düzlem ayarlama çubuğu vasıtasıyla bregma ve

lambda hattı aynı düzlemde olacak şekilde ayarlandı. Sağ hemisferde hipokampüse denk gelen kraniyum alanı kemik dokusu oval şekilde kesilerek çıkarıldı.

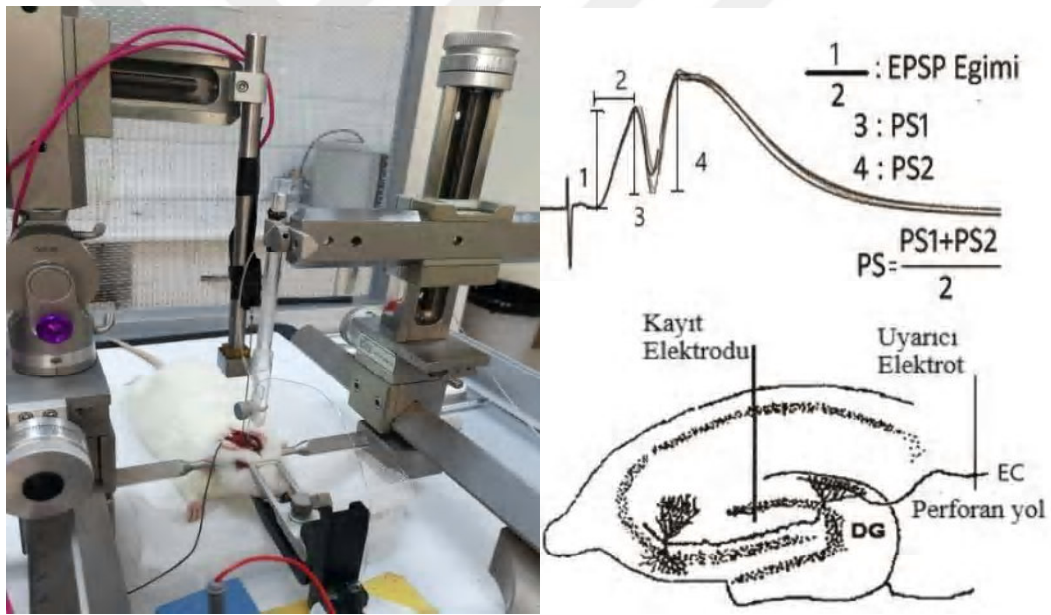
### **3.3. Uzun dönemli Güçlenme, Elektrofizyolojik Kayıtların Alınması**

#### **3.3.1. Uyarı, Kayıt ve Fasudil infüzyonu**

Cerrahi prosedürlere uygun olarak kafatası sağ hemisfere denk gelen kraniyum alanına kraniotomi işlemi yapıldı. Bregma referans noktası olarak alındı, Paksinosand ve Watson (1998) tarafından oluşturulan sıçan beyin atlası kullanıldı. Koordinatlara uygun olarak uyarıcı elektrot (Teflon kaplı, paslanmaz çelik, 127 µm çaplı ucunun yüzeyi izole edilmiş) kullanıldı. Medyal perforan yol uyarımı için; koordinatlar bregma üzerinden: Anterior-Posterior (AP) alana: 6,5 mm; Medial- Lateral (ML) alana: 3,8mm seviyesinde olmak üzere uyarıcı elektrot yerleştirildi. Uyarıcı elektrotun her iki kutbu düşük dirence sahip kablolar vasıtasıyla bir uyarım izolatörüne (A385, World Precision Instruments, USA) bağlandı. Dış çapı 1,5 mm ve uzunluğu 10 mm olan çift kanallı borosilikat kapiller tüplerden yapılmış (World Precision Instruments) dikey bir mikropipet çekici (P30, Sutter Instrument Co, USA) vasıtasıyla pipetler hazırlandı. Çift kanallı cam mikropipetin bir kanalı 3M sodyum klorür (NaCl) ile hava kabarcığı kalmayacak şekilde dolduruldu. Fasudil infüzyonu yapılacak olan grupta birinci kanal 3M NaCl ile hava kalmayacak şekilde dolduruldu, ikinci kanal Fasudil inhibitörü ile dolduruldu. Fasudil monohidrokolür (FCB059815), 100ml saline solüsyonu içerisinde 10µM konsantrasyonunda olacak şekilde çözülerek hazırlandı. Sterotaksik kola sabitlenen pipet infüzyon seti ile Hamilton enjektörüne (20µL, 0,33 ml/dk) takıldı. Cam mikropipet (uç direnci 2-10 MΩ) kayıt işlemi için ipsilateral dentat girusun granül hücre tabakasına (bregma hattı üzerinden: AP:3,5mm- ML:2.13 mm) yerleştirildi. Servikal deri hattı eğri uçlu bir penset vasıtasıyla dilate edilerek bir gümüş-gümüş klorür (Ag-AgCl) disk elektrot bu alana yerleştirildi ve referans elektrot olarak kullanıldı. 3M'lık NaCl ile doldurulan mikropipet kanalı içerisine yerleştirilen klorlanmış gümüş tel ve referans elektrodu bi head-stage kullanılarak tek kanal epitelyal voltaj/akım kıskaç yükseltecine (VCC600, Physiological Instruments) bağlandı. Bütün sistem "Faraday kafesi" kullanılarak topraklandı.

### 3.3.2. Tipik Elektriksel Yanıtın Elde Edilmesi

Hem uyarıcı hem de kayıt elektrodu, eksitator postsinaptik potansiyel (EPSP) olarak tanımlanan pozitif yönlü bir sapmayı takip eden ve populasyon spike (PS) olarak tanımlanan maksimum negatif yönlü bir sapma elde edilene kadar derin yapılara indirildi. Granül hücre tabakasının tipik yanıtı elde edilmeye başlandığında elektrotların derinlikleri 0,1 mm artırılarak en büyük cevap elde edildi. En son derinlikte tipik cevap kaydedildikten sonra perforan yol uyarımına verilen cevaptaki PS amplitüdünün (genliğinin) maksimum olması için uyarı elektrodunun uyumu sağlandı. Bütün deneyler tamamlandıktan sonra ortalama elektrot derinlikleri; kayıt elektrodu için 2,8 mm, uyarıcı elektrot için ise 3 mm olarak belirlendi. (Şekil 3.1)



Şekil.3.1. Deney aşamasında tipik bir elektriksel aktivite kaydının görüntüsü.  
Hipokampus elektrofizyolojik deneylerinde kayıt ve uyarı elektrodunun in vivo yerleşimi

### 3.3.3. Veri Kazanımı ve Uyarım

Veri kazanımı ve uyarım işleminin kontrolü “Scope” yazılımı (ADInstruments, Colorado Springs, CO, USA) ile yapıldı. A/D çevirici (Powerlab/8SP, ADInstruments, Colorado Springs, CO, USA) vasıtasıyla tek fazlı 10V'luk 0,175-ms süreli palslar oluşturuldu ve uyarı izolatörünün tetiklenmesinde kullanıldı. Kaydedilen biyolojik

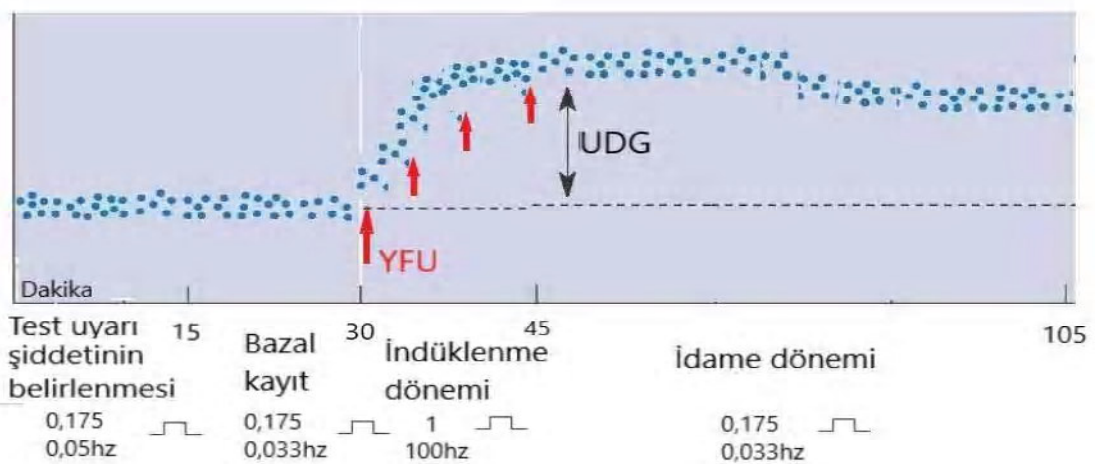
sinyaller 0,1-10 kHz bant-genişliğinde bir yükselticide 1000x kez yükseltildi. Aktivite 20 ms için 40 kHz hızında çevirim içi olarak rakamsallaştırıldı.

### 3.3.4. Girdi-Çıktı Eğrileri Input – Output (I/O)

Elektrotların yerleştirilmesinden sonra 15 dk boyunca 175  $\mu$ s süreli tek-fazlı sabit akım palsları her 20 saniyede bir verilerek I/O eğrileri elde edildi. Bu sırada akım şiddeti 0,1 mA' den 1,5 mA' e kadar 0,2 mA adımlarla artırıldı. Her akım şiddeti için kaydedilen 3 ardışık yanıtın ortalaması akım şiddetine karşı grafiklendi. En yüksek PS genliğinin yarısını oluşturan akım şiddeti test uyarı şiddeti olarak belirlendi ve deneyin sonraki aşamalarında bu akım şiddeti kullanıldı.

### 3.3.5. Uzun Dönemli Güçlenme (UDG)

Test uyarı şiddetinde bir uyarı 30sn de bir verilerek 15 dakika süreyle bazal kayıt alındı. Bazal kaydın ardından induksiyon dönemi olarak tanımlanan süre için 5'er dakika ara ile 100 Hz. frekansında, 1 sn süren dört yüksek frekanslı uyarı (YFU) ile UDG indüklendi. Son YFU'yu takiben toplam idame dönemi olarak tanımlanan 60 dakikalık süre boyunca 30 sn' de bir test uyarı şiddetinde uyarı ile uyarıya devam edildi. YFU sonrasındaki son 5 dk'lık dönem UDG yanıtlarının ortalaması yani induksiyon dönemi, son YFU sonrası deneyin sonunda ki son 5 dk'lık dönemdeki UDG yanıtlarının ortalaması ise idame dönemi yanıtı olarak belirlendi.



Şekil 3.2 UDG kaydı deney protokolü şeması

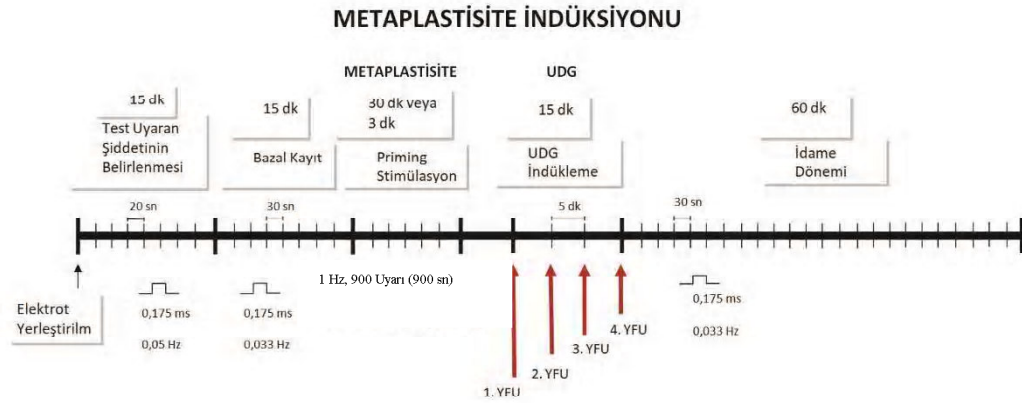
### 3.3.6. Uzun Dönemli Baskılanma (UDB)

Test uyarı şiddeti belirlendikten sonra;

Perforan yol 15 dakika test uyarı şiddeti ile 0.033Hz ile uyarılmasının ardından, UDB'nın indüksiyonu: 1Hz frekanslı 175 µs süreli tek pals'lerin 900 kez uygulanması ile indüklendi. Kayıtlar indüksiyonlardan 90 dakika sonra sonlandırıldı.

### 3.3.7. Metaplastisite (MP)

Uygun cerrahi prosedürler ve stereotaksik yerleştirme gerçekleştirildi. Kraniotomi sonrası referans elektrot yerleştirildikten sonra diğer elektrodlar sıçan beyin atlası koordinatlarına uygun olarak yerleştirildi. Ardından tipik dalga sinyalinin elde edilmesi sağlandı. Elde edilen kayıt sinyali 15 dakika süresince beklenerek dengelendi. Bu sırada dentat girus nöronlarına 0.033 Hz. frekanslı elektriksel uyarım (0.5 mA, 0.175 µs süreli) kullanılarak uyarımı gerçekleştirildi. Daha sonra test uyarı şiddetinde 30 sn'de bir uyarı verilerek 15 dk boyunca bazal kayıt alındı. Bazal kayıt alındıktan sonra deneyin 15. dakikasını takiben priming stimülasyon yapılarak metaplastisite indüklemesi gerçekleştirildi. Metaplastisite yanıtının sağlanabilmesi için üç farklı türde priming stimülasyon protokolünden (5 Hz, 180 uyarı (180 saniye), 0.5 Hz. 1800 uyarı (1800 saniye) ya da 1Hz (900 saniye) 1 Hz'lik protokol uygulandı. Priming stimülasyonu takiben 5 dakikalık süre boyunca 30 saniyede bir uyarı verildi. Uyarı sonrası elde edilen dalga değişiklikleri kayıt edildi. Ardından 5'er dakika aralıklar ile 4 defa YFU (100 Hz) verilerek UDG yanıtının indüklenmesi sağlandı. En son verilen YFU'yı takiben idame dönemi olarak adlandırılan 60 dakikalık kayıt süresince 30 saniyede bir test uyarı şiddetinde bir uyarı ile uyarılma işleminin devamlılığı sağlandı. YFU sonrası ilk 5 dakikalık dalga yanıtının ortalaması posttetanik potansiyelizasyon dönemi, posttetanik potansiyelizasyon dönemi sonrasındaki 5 dakikalık kayıt ise idame dönemine ait yanıtlar olarak alındı. Metaplastisite kaydına ait deney protokolünün şematik gösterimi Şekil.3.3'te gösterilmiştir.



**Şekil.3.3.** Metaplastisite kaydı deney protokol şeması

### 3.4. Veri Analizi ve İstatistik

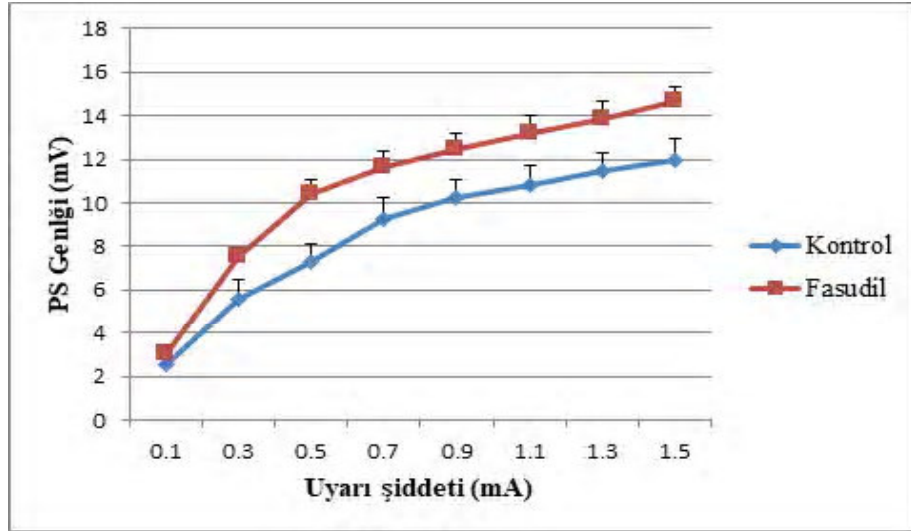
Eksitator Post Sinaptik Potansiyel dalgasının eğimi; dalganın başlangıcı ve PS dalgasının başlangıcı arasındaki voltaj farkının %20–80'i olacak şekilde hesaplandı. PS genliği ilk pozitif yükselti ve sonraki negatif yükselti arasındaki fark olarak hesaplandı. Başlangıçtaki 15 dakikalık bazal kayıt süresinde tetiklenen 30 alan potansiyelinin EPSP ve PS'lerinin ortalama eğim ve genlik değerleri 100 kabul edildi; YFU sonrasında her EPSP ve PS eğim ve genlik değerleri 100 kabul edilen değerlerin yüzdesi cinsinden hesaplandı. UDG' nin indüksiyonu için YFU sırasında oluşan eğim ve genliklerinin, indüksiyon döneminden sonra 60 dakika süreyle kaydedilen idame dönemi için ise son YFU'dan deney sonuna kadarlık bölümde oluşan eğim ve genlik değerlerinin son 5 dk'lık bölümdeki ortalamaları alındı. İstatistik karşılaştırmalar Tek Yönlü ANOVA testi kullanılarak yapılmıştır. Anlamlılık düzeyi  $p < 0,05$  olarak seçildi.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Farklı Uyaran Şiddetlerine Karşı Oluşan Populasyon Spike (PS) Genlik ve Eksitatör Post Sinaptik Potansiyel (EPSP) Eğim Değerleri

#### 4.1.1 PS Genlik Değerleri

UDG'de; test uyaran şiddetinin belirlenmesi amaçlı elektrotlar hipokampüse yerleştirildikten sonra 175  $\mu$ s süreli tek fazlı sabit oluşum palsları her 20 sn'de bir olmak üzere giderek artan akım ile uyarılmıştır. 0.1 mA'dan başlayarak 1.5 mA'e kadar artan 0.2 mA'lık adımlarla uyarılarak elde edilen Populasyon Spike (PS) genlik değerlendirmesi Şekil 4.1'de verilmiş olup ortalama değerleri ve standart sapmaları Tablo 4.1'de gösterilmiştir.

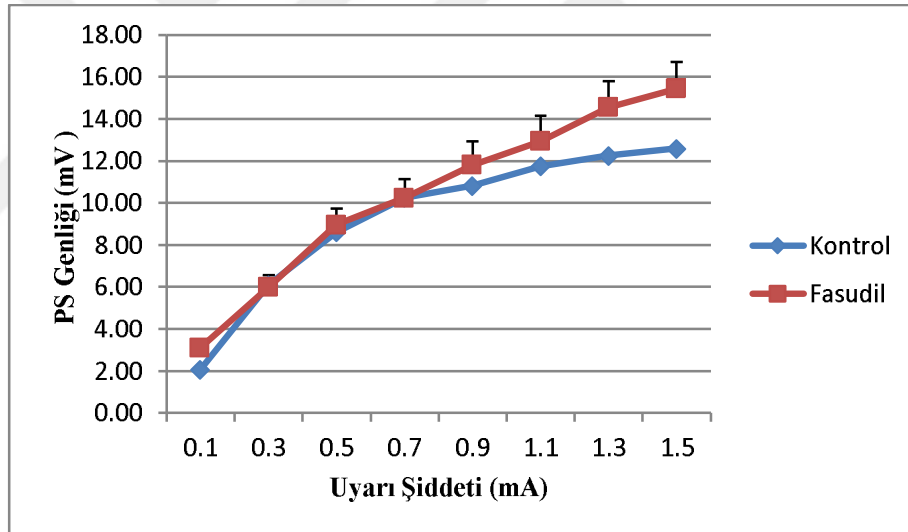


(Değerler ortalama  $\pm$  standart hata olarak verilmiştir. \* Kontrole göre  $p < 0,05$ )

**Şekil 4.1** Kontrol ve Fasudil gruplarında, dentat girus nöronlarından 0,1 mA-1,5 mA arasında değişen 8 ayrı uyari şiddetine karşı ölçülen PS genlik değerleri; UDG öncesi

Veriler tekrarlayan ölçümlerde ANOVA testi ile değerlendirilmiştir. Uyarı şiddeti arttıkça PS genliğinin Kontrol ve Fasudil grubunda ( $P<0.001$  (Şekil 4.1) arttığı görülmüştür. Ancak uyarı şiddetine verilen cevaplarda Kontrol ve Fasudil grubu arasında (Grup etkisi:  $P_s>0.05$ ; etkileşim etkisi:  $P_s>0.05$ ) istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık oluşturmamıştır. Dolayısıyla indüksiyon dönemi sonrasında oluşan farklılıkların başlangıçtaki sinaptik iletimden kaynaklanmayacağı düşünülmüştür.

UDB'de; test uyaran şiddetinin belirlenmesi amaçlı elektrotlar hipokampüse yerleştirildikten sonra 175  $\mu$ s süreli tek fazlı sabit oluşum pısları her 20 sn'de bir olmak üzere giderek artan akımlar ile uyarılmıştır. 0.1 mA'den 1.5 mA'e kadar artan 0.2 mA'lık adımlarla uyarılarak elde edilen Populasyon Spike (PS) genlik değerlendirmesi Şekil 4.2'de verilmiş olup ortalama değerleri ve standart sapmaları Tablo 4.2'de gösterilmiştir.



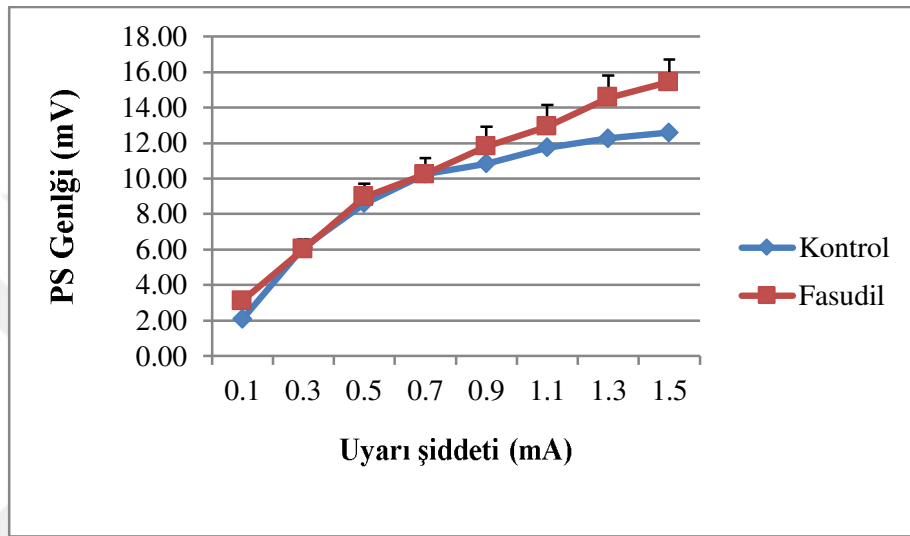
(Değerler ortalama  $\pm$  standart hata olarak verilmiştir. \* Kontrolle göre  $p<0,05$ )

**Şekil 4.2** Kontrol ve Fasudil gruplarında dentat girus nöronlarından 0,1 mA-1,5 mA arasında değişen 8 ayrı uyarı şiddetine karşı ölçülen PS genlik değerleri; UDB öncesi

Veriler tekrarlayan ölçümlerde ANOVA testi ile değerlendirilmiştir. Uyarı şiddeti arttıkça PS genliğinin her iki grupta da ( $P<0.001$  (Şekil 4.2) arttığı görülmüştür. Ancak uyarı şiddetine verilen cevaplarda Kontrol ve Fasudil grubu arasında (Grup etkisi:  $P=0.533$ ; etkileşim etkisi:  $P=0.514$ ) istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık oluşturmamıştır. Dolayısıyla indüksiyon dönemi sonrasında oluşan farklılıkların başlangıçtaki sinaptik iletimden kaynaklanmayacağı düşünülmüştür.



MP'de; test uyaran şiddetinin belirlenmesi amaçlı elektrotlar hipokampüse yerleştirildikten sonra 175  $\mu$ s süreli tek fazlı sabit oluşum palsları her 20 sn'de bir olmak üzere giderek artan akımlar ile uyarılmıştır. 0.1 mA'den 1.5 mA'e kadar artan 0.2 mA'lık adımlarla uyarılarak elde edilen Populasyon Spike (PS) genlik değerlendirilmesi Şekil 4.3'te verilmiş olup ortalama değerleri ve standart sapmaları Tablo 4.3'de gösterilmiştir.



(Değerler ortalama  $\pm$  standart hata olarak verilmiştir. \* Kontrolle göre  $p < 0,05$ )

**Şekil 4.3** Kontrol ve Fasudil gruplarında, dentat girus nöronlarından 0,1 mA-1,5 mA arasında değişen 8 ayrı uyarı şiddetine karşı ölçülen PS genlik değerleri; MP öncesi

Veriler tekrarlayan ölçümlerde ANOVA testi ile değerlendirilmiştir. Uyarı şiddeti arttıkça PS genliğinin Kontrol ve Fasudil grubunda ( $P < 0.001$ ) (Şekil 4.3) arttığı görülmüştür. Ancak uyarı şiddetine verilen cevaplarda Kontrol ve Fasudil grubu arasında (Grup etkisi:  $P > 0.05$ ; etkileşim etkisi:  $P_s > 0.05$ ) istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık oluşturmamıştır. Dolayısıyla posttetanik dönem sonrasında oluşan farklılıkların başlangıçtaki sinaptik iletimden kaynaklanmayacağı düşünülmüştür.

PS Genlik ve EPSP Eğim değişimlerinin ortalama değerleri ve standart sapmaları Tablo 4.1, 4.2 ve 4.3'te verilmiştir.

**Tablo 4.1 UDG;** Kontrol ve Fasudil gruplarında, 0,1 mA -1,5 mA arasında değişen uyarı şiddetleri ile oluşan PS genlik ve EPSP eğim değerleri.

Uyarın Şiddeti (mA)	Populasyon Spike Genliği (mV)		EPSP Eğimi (mV/ms)	
	Kontrol Grubu (n=8)	Fasudil Grubu (n=8)	Kontrol Grubu (n=8)	Fasudil Grubu (n=8)
0,1 mA	2,51±0,40	3,04±0,27	4,08±0,51	4,58±0,61
0,3 mA	5,59±0,90	7,50±0,39	5,63±0,24	5,37±0,65
0,5 mA	7,26±0,86	10,44±0,66	6,13±0,26	5,95±0,63
0,7 mA	9,24±1,00	11,66±0,70	6,46±0,27	6,25±0,64
0,9 mA	10,23±0,86	12,46±0,71	6,88±0,29	6,41±0,66
1,1 mA	10,78±0,94	13,23±0,78	6,98±0,27	6,50±0,70
1,3 mA	11,44±0,82	13,86±0,84	7,03±0,23	6,55±0,67
1,5 mA	12,00±0,95	14,64±0,69	6,85±0,24	6,65±0,67

(Değerler ortalama ± standart hata olarak verilmiştir. \* Kontrolle göre p<0,05)

**Tablo 4.2 UDB;** Kontrol ve Fasudil gruplarında, 0,1 mA -1,5 mA arasında değişen uyarı şiddetleri ile oluşan PS genlik ve EPSP eğim değerleri.

Uyarın Şiddeti (mA)	Populasyon Spike Genliği (mV)		EPSP Eğimi (mV/ms)	
	Kontrol Grubu (n=8)	Fasudil Grubu (n=9)	Kontrol Grubu (n=8)	Fasudil Grubu (n=9)
0,1 mA	2,08±0,51	3,46±0,61	4,59±0,16	5,51±0,50
0,3 mA	5,95±1,00	6,78±0,63	5,28±0,27	6,39±0,55
0,5 mA	8,35±1,33	9,27±0,82	5,90±0,38	6,85±0,56
0,7 mA	9,56±1,41	11,09±1,17	6,03±0,43	7,21±0,67
0,9 mA	10,26±1,58	11,66±1,30	6,20±0,44	7,29±0,62
1,1 mA	10,99±1,63	12,96±1,16	6,33±0,41	7,49±0,64
1,3 mA	11,64±1,70	13,46±1,10	6,28±0,40	7,62±0,67
1,5 mA	11,98±1,78	14,32±0,91	6,50±0,41	7,67±0,64

(Değerler ortalama ± standart hata olarak verilmiştir. \* Kontrolle göre p<0,05)

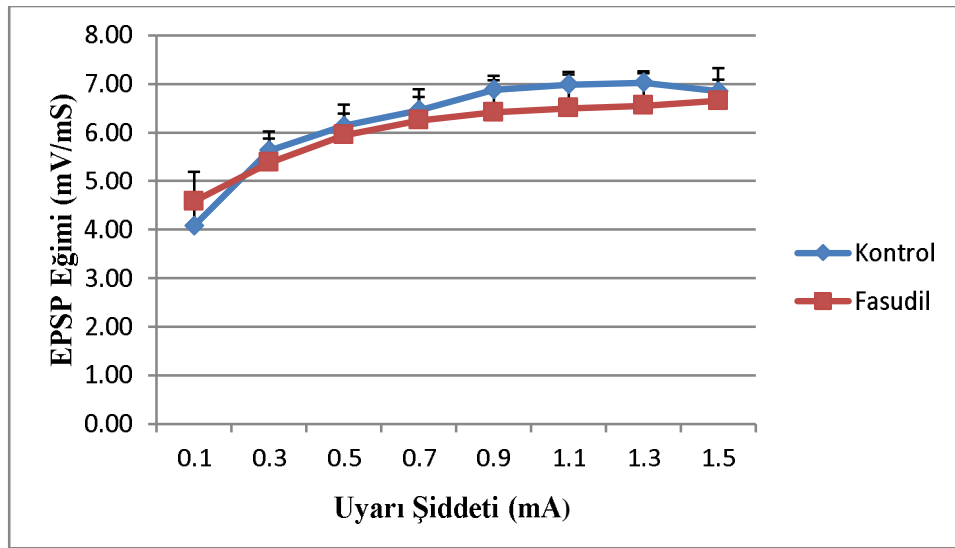
**Tablo 4.3**MP; Kontrolve Fasudil gruplarında, 0,1 mA -1,5 mA arasında değişen uyarı şiddetleri ile oluşan PS genlik ve EPSP eğim değerleri

Uyarın Şiddeti (mA)	Populasyon Spike Genliği (mV)		EPSP Eğimi (mV/ms)	
	Kontrol Grubu (n=8) (1Hz)	Fasudil Grubu (n=8) (1Hz)	Kontrol Grubu (n=8) (1Hz)	Fasudil Grubu (n=8) (1Hz)
0,1 mA	2,08±0,27	3,11±0,30	4,60±0,24	5,73±0,30
0,3 mA	6,09±0,61	6,00±0,58	5,35±0,28	6,36±0,38
0,5 mA	8,61±0,98	8,96±0,77	5,90±0,24	6,85±0,43
0,7 mA	10,26±1,03	10,24±0,89	6,26±0,31	7,07±0,46
0,9 mA	10,83±1,12	11,81±1,11	6,32±0,34	7,17±0,47
1,1 mA	11,74±1,13	12,94±1,21	6,44±0,33	7,37±0,50
1,3 mA	12,25±1,23	14,55±1,25	6,45±0,33	7,82±0,57
1,5 mA	12,58±1,34	15,44±1,27	6,56±0,39	8,04±0,60

(Değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. \*Kontrolle göre p<0,05)

#### 4.1.2 EPSP Eğim Değerleri

UDG için; Test uyarın Şiddetinin belirlenmesi amaçlı elektrotlar hipokampüse yerleştirildikten sonra 175 µs süreli tek fazlı sabit oluşum palsları 20 sn'de bir olmak üzere giderek artın akım ile uyarılmıştır. 0.1 mA'den 1.5 mA'e kadar artın 0.2 mA'lık adımlarla uyarılarak elde edilen Eksitatör PostSinaptik Potansiyel (EPSP) eğim değerlendirmesi Şekil 4.4'te verilmiş olup ortalama değerleri ve standart sapmaları yukarıda Tablo 4.1'de gösterilmiştir.

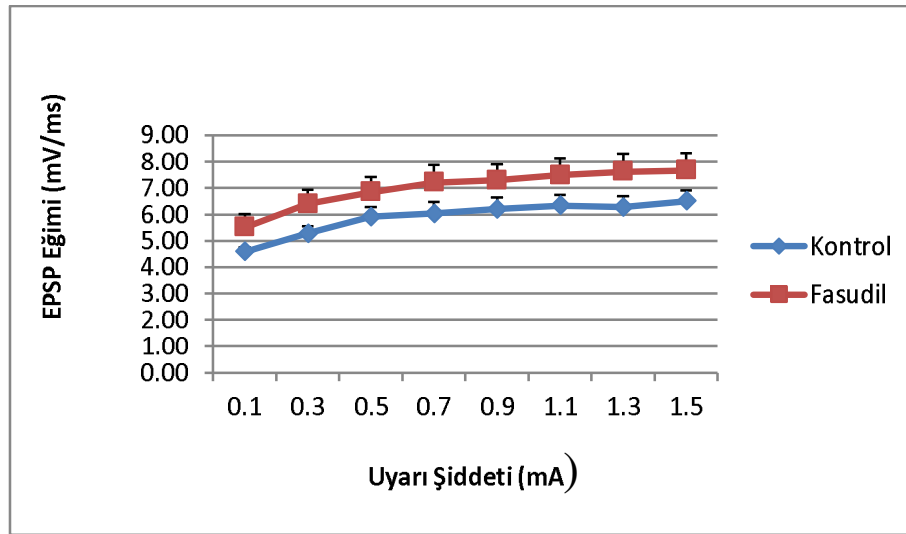


(Değerler ortalama  $\pm$  standart hata olarak verilmiştir. \* Kontrole göre  $p < 0,05$ )

**Şekil 4.4** Kontrol ve Fasudil gruplarının, dentat girus nöronlarından 0,1 mA-1,5 mA arasında değişen 8 ayrı uyarı şiddetine karşı ölçülen EPSP eğim değerleri; UDG öncesi

Veriler tekrarlayan ölçümlerde ANOVA testi ile değerlendirilmiştir. Uyarı şiddeti arttıkça EPSP eğiminin Kontrol ve Fasudil grubunda ( $P < 0,001$ ) (Şekil 4.4) arttığı görülmüştür. Ancak uyarı şiddetine verilen cevaplarda Kontrol ve Fasudil grubu arasında (Grup etkisi:  $P_s > 0,05$ ; etkileşim etkisi:  $P_s > 0,05$ ) istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık oluşmamıştır. Dolayısıyla indüksiyon dönemi sonrasında oluşan farklılıkların başlangıçtaki sinaptik iletimden kaynaklanmayacağı düşünülmüştür.

UDB için, est uyaran şiddetinin belirlenmesi amaçlı elektrotlar hipokampüse yerleştirildikten sonra 175  $\mu$ s süreli tek fazlı sabit oluşum palsları 20 sn'de bir olmak üzere giderek artan akım ile uyarılmıştır. 0.1 mA'den 1.5 mA'ya kadar artan 0.2 mA'lık adımlarla uyarılarak elde edilen Eksitator PostSinaptik Potansiyel (EPSP) eğim değerlendirmesi Şekil 4.5'te verilmiş olup ortalama değerleri ve standart sapmaları yukarıda Tablo 4.2'de gösterilmiştir.

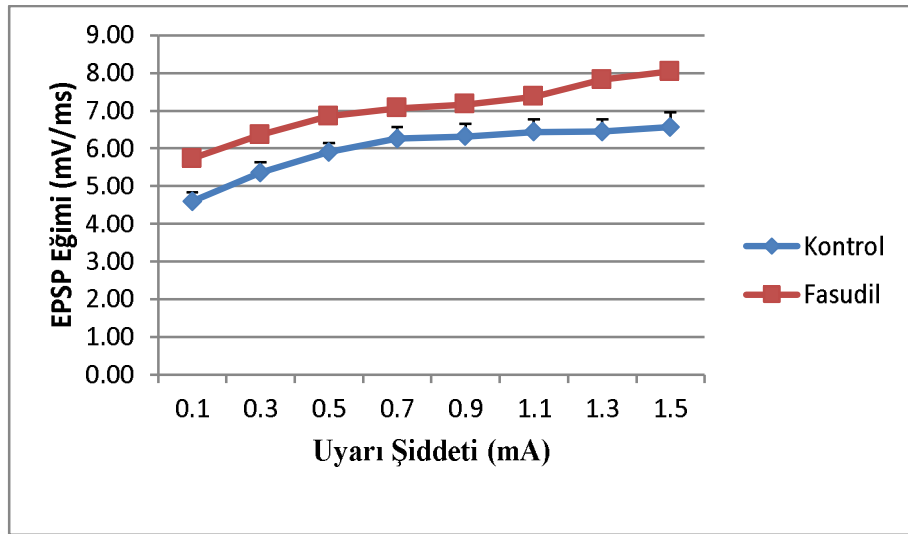


(Değerler ortalama  $\pm$  standart hata olarak verilmiştir. \* Kontrolle göre  $p < 0,05$ )

**Şekil 4.5** Kontrol ve Fasudil gruplarının, dentat girus nöronlarından 0,1 mA-1,5 mA arasında değişen 8 ayrı uyarı şiddetine karşı ölçülen EPSP eğim değerleri; UDB öncesi

Veriler tekrarlayan ölçümlerde ANOVA testi ile değerlendirilmiştir. Uyarı şiddeti arttıkça EPSP eğiminin Kontrol ve Fasudil grubunda ( $P < 0.001$ ) (Şekil 4.5) arttığı görülmüştür. Ancak uyarı şiddetine verilen cevaplarda Kontrol ve Fasudil grubu arasında (Grup etkisi:  $P = 0.514$ ; etkileşim etkisi:  $P = 0.485$ ) istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık oluşmamıştır. Dolayısıyla induksiyon dönemi sonrasında oluşan farklılıkların başlangıçtaki sinaptik iletimden kaynaklanmayacağı düşünülmüştür.

MP için; test uyaran şiddetinin belirlenmesi amaçlı elektrotlar hipokampüse yerleştirildikten sonra 175  $\mu$ s süreli tek fazlı sabit oluşum palsları 20 sn'de bir olmak üzere giderek artan akımlar ile uyarılmıştır. 0.1 mA'den 1.5 mA'ya kadar artan 0.2 mA'lık adımlarla uyarılarak elde edilen Eksitator PostSinaptik Potansiyel (EPSP) eğim değerlendirmesi Şekil 4.6'da verilmiş olup ortalama değerleri ve standart sapmaları yukarıda Tablo 4.3'te gösterilmiştir.



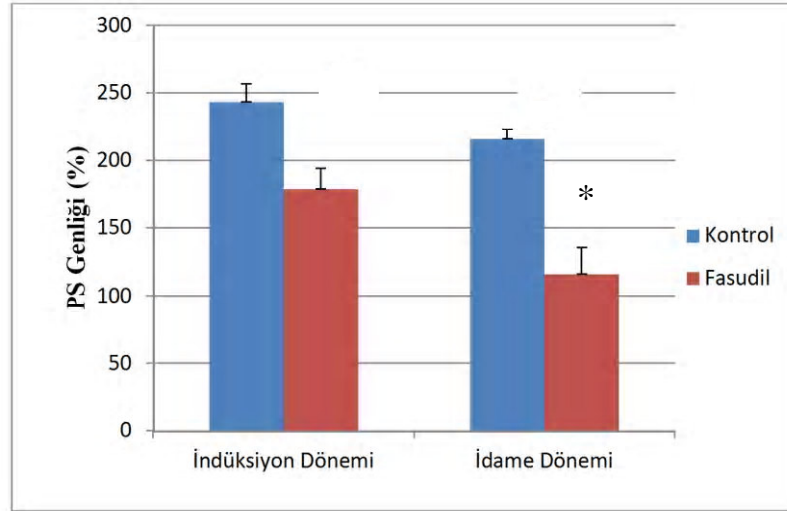
(Değerler ortalama  $\pm$  standart hata olarak verilmiştir. \* Kontrolle göre  $p < 0,05$ )

**Şekil 4.6** Kontrol ve Fasudil gruplarının, dentat girus nöronlarından 0,1 mA-1,5 mA arasında değişen 8 ayrı uyarı şiddetine karşı ölçülen EPSP eğim değerleri; MP öncesi

Veriler tekrarlayan ölçümlerde ANOVA testi ile değerlendirilmiştir. Uyarı şiddeti arttıkça EPSP eğiminin Kontrol ve Fasudil grubunda ( $P < 0.001$  (Şekil 4.5) arttığı görülmüştür. Ancak uyarı şiddetine verilen cevaplarda Kontrol ve Fasudil grubu arasında (Grup etkisi:  $P > 0.05$ ; etkileşim etkisi:  $P > 0.05$ ) istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık oluşmamıştır. Dolayısıyla posttetanik dönemde sonrasında oluşan farklılıkların başlangıçtaki sinaptik iletimden kaynaklanmayacağı düşünülmüştür.

#### 4.2 Uzun Dönemli Güçlenme'nin İndüksiyon ve İdame Dönemlerine ait PS Genlik ve EPSP Eğim Değerleri

Input-Output ve bazal kayıtların alındığı 15 dakikalık süre sonunda UDG'yi indükleyecek deneyprotokolünün (5'er dakika aralıklarla 1sn süreli olarak verilen 100 Hz'lik 4 farklı YFU) 2 farklı gruba uygulanması sonrası YFU ile indüklenen UDG kayıtlarının PS genliği %'lik değerlendirilmesi aşağıda Şekil 4.7 ve Tablo 4.4'de verilmiştir.



(Değerler ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir. \*Kontrole göre  $p < 0,05$ )

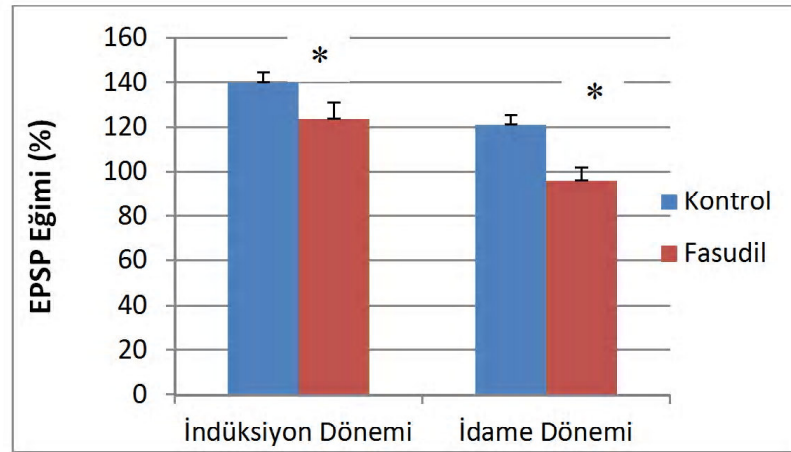
**Şekil 4.7** Kontrol ve Fasudil gruplarının indüksiyon ve idame dönemlerine ait ortalama PS genlik değerleri

**Tablo 4.4**UDG; Kontrol ve Fasudil grubu sıçanlarda indüksiyon ve idame dönemine ait PS genlik ve EPSP eğimi ortalama değerleri

		<b>Kontrol</b> (n=8)	<b>Fasudil</b> (n=8)		
<b>Ortalama PS genliği (mV)</b>	İndüksiyon Dönemi	243,58 $\pm$ 12,96	178,93 $\pm$ 15,13		
	İdame Dönemi	215,88 $\pm$ 7,54	116,20 $\pm$ 19,25	*	
<b>Ortalama EPSP eğimi (mV/ms)</b>	İndüksiyon Dönemi	140,13 $\pm$ 4,50	123,70 $\pm$ 7,40	*	
	İdame Dönemi	121,31 $\pm$ 4,14	96,23 $\pm$ 5,41	*	

(Değerler ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir. \*Kontrole göre  $p < 0,05$ )

Student-t testi ile gruplar kıyaslandığında, Fasudil infüzyonunun hem indüksiyon dönemindeki PS genliğini ( $F=178.9\pm 15.1$ ,  $K=\%243,6\pm 12.9$ ,  $t_{14}=3.25$   $p = 0.006$ ), hem de idame dönemindeki PS genliğini ( $F=\%116,2\pm 19.2$ ,  $K= \%215,8\pm 7.6$ ,  $t_{14}=4.82$ ,  $p<0.001$ ) azalttığı bulunmuştur. Her iki dönemde gelişen bu değişiklikler istatistiksel olarak anlamlıdır.



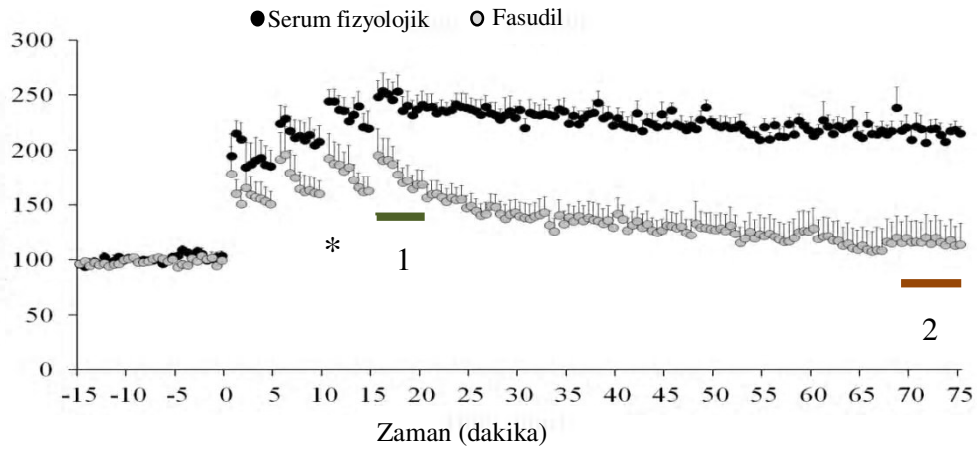
(Değerler ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir. \*Kontrole göre  $p<0,05$ )

**Şekil 4. 8** Kontrol ve Fasudil gruplarının indüksiyon ve idame dönemlerine ait ortalama EPSP eğim değerleri.

Student-t testi ile gruplar kıyaslandığında, Fasudil infüzyonunun hem indüksiyon dönemindeki EPSP eğimini ( $F=\%116,2\pm 19.2$ ,  $K= \%215,8\pm 7.6$ ,  $t_{14}=4.82$ ,  $p<0.001$ ), hem de idame dönemindeki EPSP eğimini ( $F=\%96,2\pm 5.4$ ,  $K= 121.3\pm 4.1$ ,  $t_{14}=3.68$ ,  $p = 0.002$ ) azalttığı bulunmuştur. Her iki dönemde gelişen bu değişiklikler istatistiksel olarak anlamlıdır.

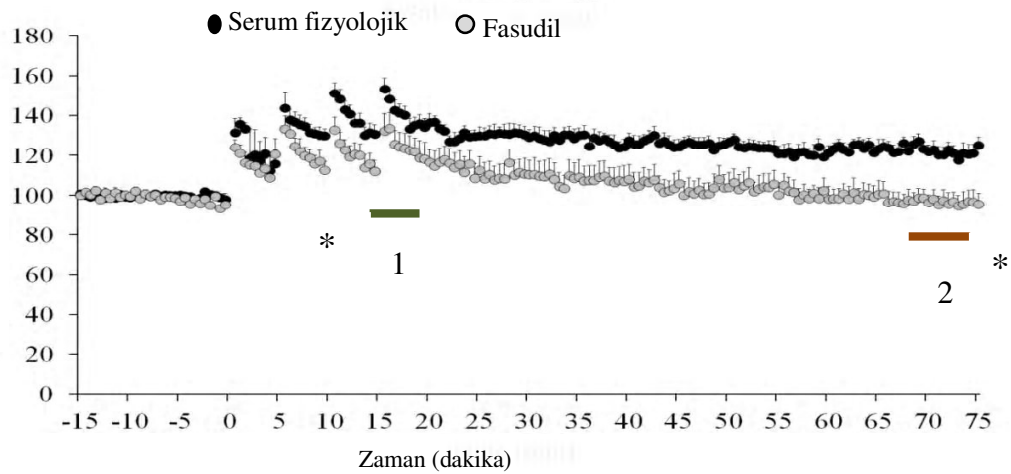
Uzun Dönemli Güçlenme kayıtlarında, Kontrol ve Fasudil grubu sıçanlara ait PS genliklerinin deney süresince olan değişimi Şekil 4.9' da verilmiştir.





**Şekil 4.9** PS genlik değerleri: UDG deneylerinde elde edilen kontrol ve deney gruplarına ait PS genliği ortalama değerleri ve standart sapmaları. 1; induksiyon dönemi, 2; idame dönemi

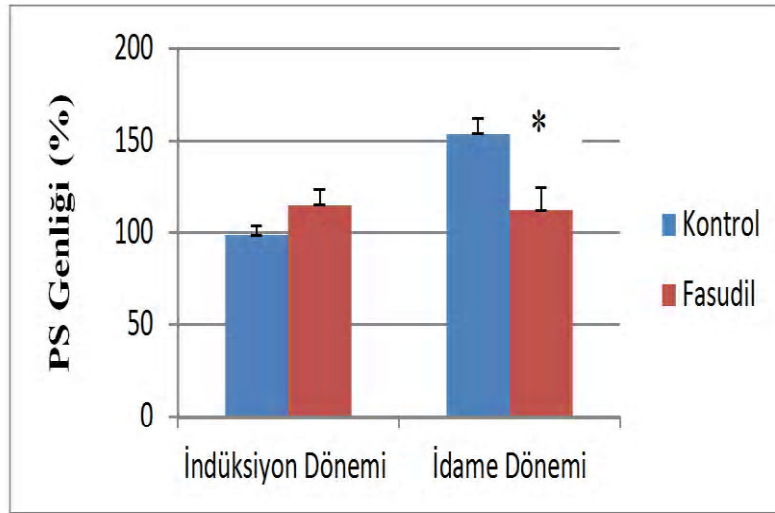
Uzun Dönemli Güçlenme kayıtlarında, Kontrol ve Fasudil grubu sıçanlara ait EPSP eğimlerinin deney süresince olan değişimi Şekil 4.10'da verilmiştir.



**Şekil 4.10** EPSP eğim değerleri: UDG deneylerinde elde edilen Kontrol ve Fasudil gruplarına ait EPSP eğimi ortalama değerleri ve standart sapmaları. 1; induksiyon dönemi, 2; idame dönemi

### 4.3 Uzun Dönemli Baskılanmanın İndüksiyon ve İdame Dönemlerine ait PS Genlik ve EPSP Eğim Değerleri

Input-Output ve bazal kayıtların alındığı 15 dakikalık süre sonunda UDB'yı indükleyecek deneyprotokolünün (1 Hz'lik düşük frekanslı 175  $\mu$ s'lik 900 DFU) 2 farklı gruba uygulanması sonrası indüklenen UDB kayıtlarının PS genliği %'lik değerlendirilmesi aşağıda Şekil 4.11 ve Tablo 4.5'te verilmiştir.



(Değerler ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir. \*Kontrole göre  $p < 0,05$ )

**Şekil 4. 11** Kontrol ve Fasudil gruplarının indüksiyon ve idame dönemlerine ait ortalama PS genliği değerleri

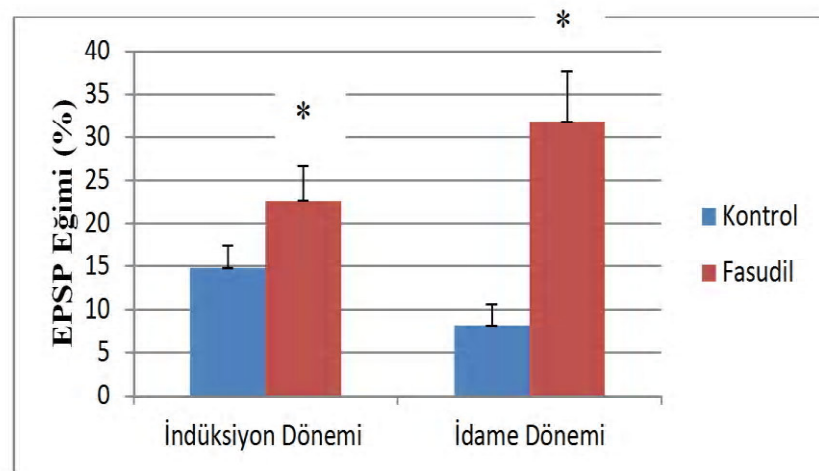
**Tablo 4.5** Kontrol ve Fasudil grubu sıçanlarda indüksiyon ve idame dönemine ait PS genlik ve EPSP eğimi ortalama değerleri

		<b>Kontrol</b> (n=8)	<b>Fasudil</b> (n=9)		
<b>Ortalama PS genliği (mV)</b>	İndüksiyon Dönemi	98,84 $\pm$ 4,69	114,96 $\pm$ 7,96		
	İdame Dönemi	153,84 $\pm$ 8,07	111,95 $\pm$ 12,26	*	
<b>Ortalama EPSP eğimi (mV/ms)</b>	İndüksiyon Dönemi	14,76 $\pm$ 2,69	22,61 $\pm$ 4,02	*	
	İdame Dönemi	8,16 $\pm$ 2,47	31,84 $\pm$ 5,75	*	

(Değerler ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir. \*Kontrole göre  $p < 0,05$ )

EPSP eğimleri, depresyonu ifade edebilmek için, 70-75. dakikalar arasındaki ortalama eğim değerleri 100'den çıkartılarak verilmiştir.

Student-t testi ile gruplar kıyaslandığında, Fasudil infüzyonunun indüksiyon dönemindeki PS genliğinin ( $F = \%114,96 \pm 7,96$ ,  $K = \%98,84 \pm 4,69$ ,  $t_{14} = -0.62$ ;  $P = 0.952$ ) büyüklüğünü kontrol grubuna göre değiştirmedir. İstatistiksel olarak anlamlı farklılık oluşturmadır. İdame dönemindeki PS genliğini ( $F = \%111,95 \pm 12,26$ ,  $K = \%153,84 \pm 8,07$ ,  $t_{14} = 2.507$ ;  $p = 0.025$ ) kontrol grubuna göre azalttığı bulunmuştur. İstatistiksel olarak anlamlı farklılık oluşturmuştur.

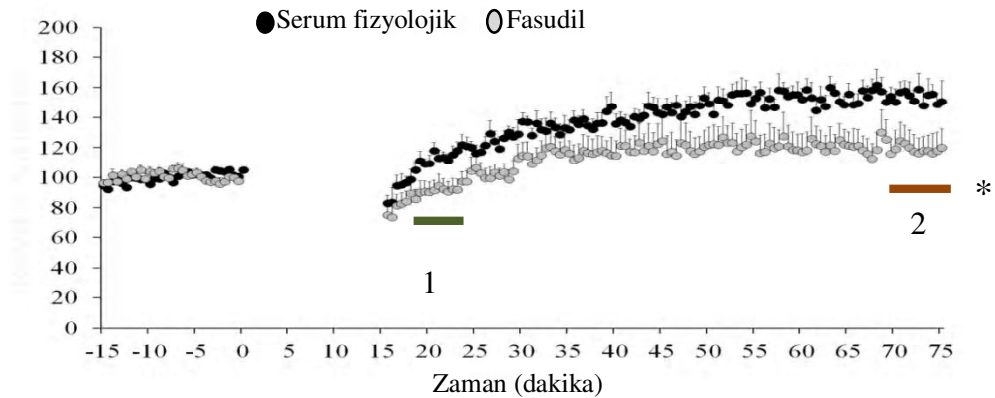


(Değerler ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir. \*Kontrolle göre  $p < 0,05$ )

**Şekil 4. 12** Kontrol ve Fasudil gruplarının indüksiyon ve idame dönemlerine ait ortalama EPSP eğim değerleri

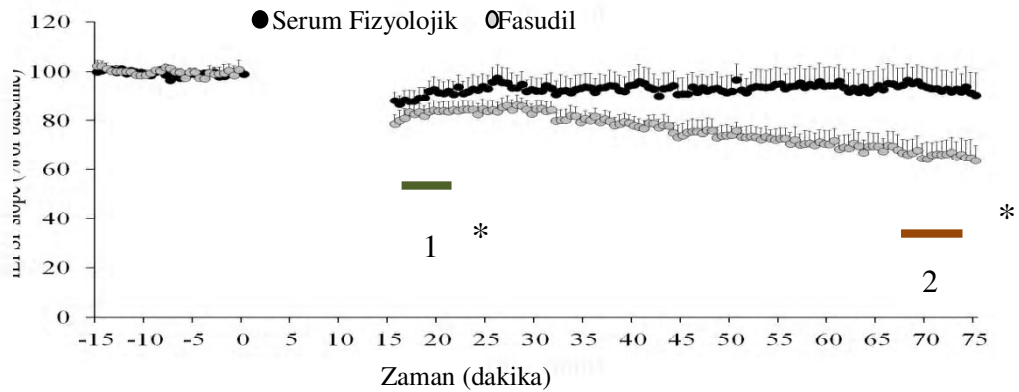
Student-t testi ile gruplar kıyaslandığında, Fasudil infüzyonunun hem indüksiyon dönemindeki EPSP eğimini ( $F = \%22,61 \pm 4,02$ ,  $K = \%14,76 \pm 2,69$ ,  $t_{14} = -0,635$ ;  $P = 0.535$ ) hem de idame dönemindeki EPSP eğiminin ( $F = \%31,8 \pm 5,6$ ,  $K = \%8,2 \pm 2,5$ ;  $t_{14} = 3.291$ ;  $p = 0.005$ ) büyüklüğünü kontrol grubuna göre artırdığı bulunmuştur. Her iki dönemde de gelişen bu değişiklik istatistiksel olarak anlamlıdır.

Uzun Dönemli Baskılanma kayıtlarında Kontrol ve Fasudil grubu sıçanlara ait PS genliklerinin deney süresince olan değişimi Şekil 4.13' de verilmiştir.



**Şekil 4.13** PS genlik değerleri: UDB deneylerinde elde edilen Kontrol ve Fasudil gruplarına ait PS genliği ortalama değerleri ve standart sapmaları.1; induksiyon dönemi, 2; idame dönemi

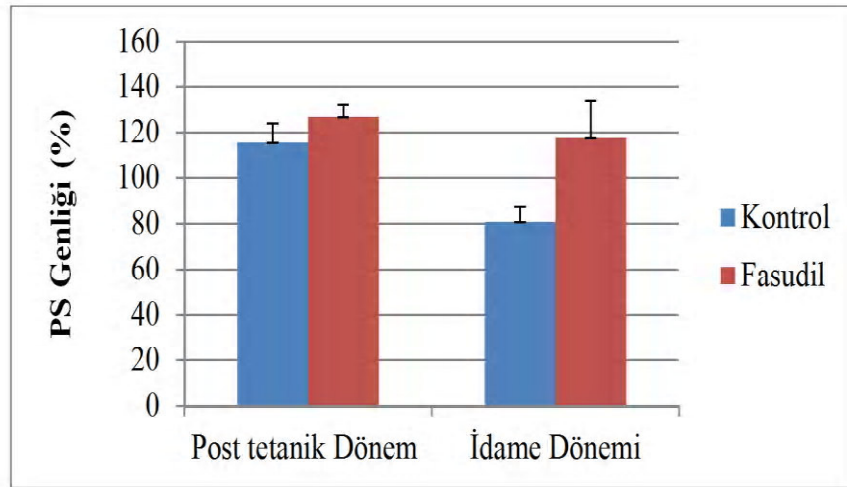
Uzun Dönemli Baskılanma kayıtlarında Kontrol ve Fasudil grubu sıçanlara ait EPSP eğimlerinin deney süresince olan değişimi Şekil 4.14' te verilmiştir.



**Şekil 4.14** EPSP eğim değerleri: UDB deneylerinde elde edilen Kontrol ve Fasudil gruplarına ait EPSP eğimi ortalama değerleri ve standart sapmaları.1; induksiyon dönemi, 2; idame dönemi

#### 4.4 Metaplastisite'nin Posttetanik Potansiyelizasyon ve İdame Dönemlerine ait PS Genliği ve EPSP eğim Değerleri

Input-Output ve bazal kayıtların alındığı 15dakikalık süre sonunda MP oluşumunu sağlayacak deney protokolünün (1Hz 'lik 900 uyarı sonrası 5'er dakika aralıklı 4 YFU) 2 farklı gruba uygulanması sonrası oluşan MP kayıtlarının PS genliği %'lik değerlendirilmesi aşağıda Şekil 4.15 ve Tablo 4.6'da verilmiştir.



(Değerler ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir. \*Kontrolle göre  $p < 0,05$ )

**Şekil 4.15** Kontrol ve Fasudil gruplarının posttetanik dönem ve idame dönemlerine ait ortalama PS genlik değerleri

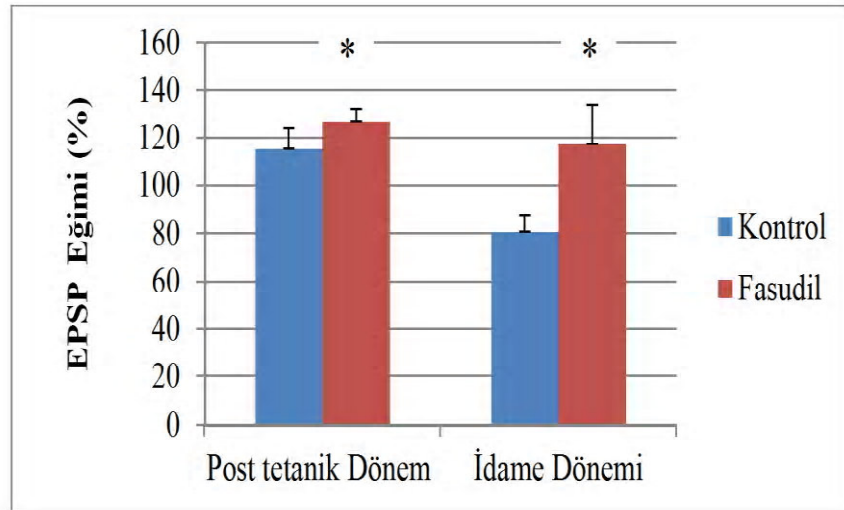
**Tablo 4.6** MP; Kontrol ve Fasudil grubu sıçanlarda posttetanik dönem ve idame dönemine ait PS genlik ve EPSP eğimi ortalama değerleri

		<b>Kontrol</b> (n=8)	<b>Fasudil</b> (n=8)		
<b>Ortalama PS genliği (mV)</b>	Posttetanik Dönem	201,19 $\pm$ 14,09	180,93 $\pm$ 18,34		
	İdame Dönemi	162,78 $\pm$ 12,79	173,13 $\pm$ 16,30		
<b>Ortalama EPSP eğimi (mV/ms)</b>	Posttetanik Dönem	115,29 $\pm$ 8,87	126,86 $\pm$ 5,27	*	
	İdame Dönemi	80,81 $\pm$ 6,76	117,40 $\pm$ 4,58	*	

(Değerler ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir. \*Kontrolle göre  $p < 0,05$ )

Tek örneklem-t testi ile gruplar kıyaslandığında, Fasudil infüzyonunun posttetanik dönemdeki PS genliği ( $F = 180,93 \pm 18,34$ ,  $K = 201,19 \pm 14,09$ ;  $p > 0,05$ ) büyüklüğünün kontrol grubuna göre değiştirmedir. İstatistiksel olarak anlamlı farklılık

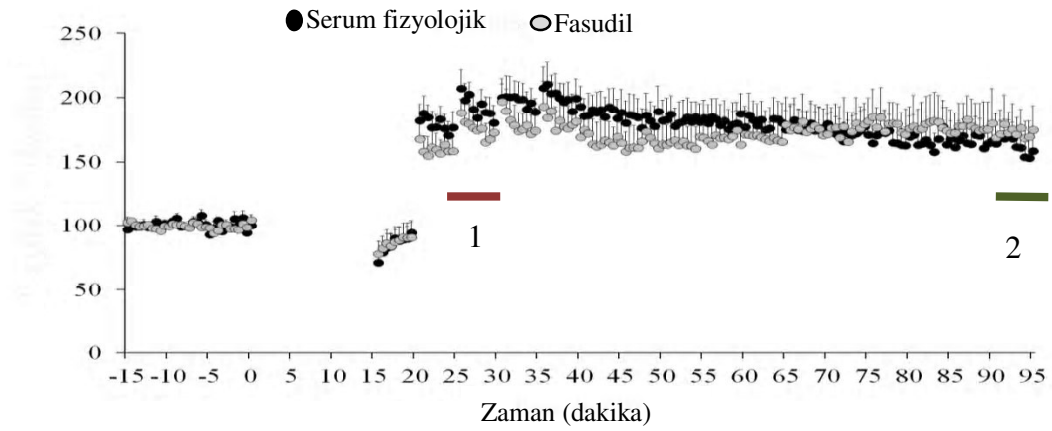
oluşturmamıştır. İdame dönemindeki PS genliğinin ( $F=173,13\pm 16,30$ ,  $K=162,78\pm 12,79$ ,  $p > 0.05$ ) büyüklüğünü ise arttırdı. Ancak her iki dönemde de istatistiksel olarak anlamlı farklılık oluşturmadı.



(Değerler ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir. \*Kontrole göre  $p < 0,05$ )

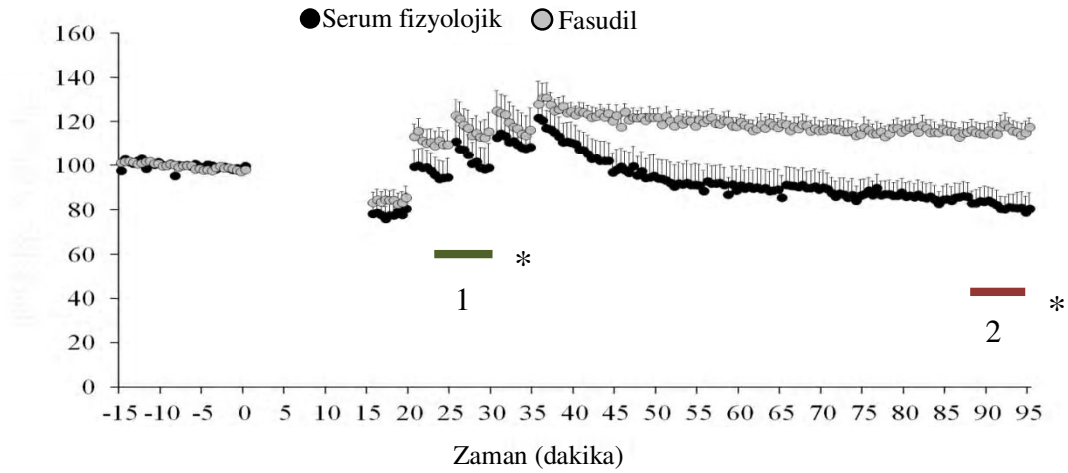
**Şekil 4. 16** Kontrol ve Fasudil gruplarının posttetanik dönem ve idame dönemlerindeki ortalama EPSP eğim değerleri

Tek örneklem-t testi ile gruplar kıyaslandığında, Fasudil infüzyonunun hem posttetanik dönemdeki EPSP eğiminin ( $F=126,86\pm 5,27$ ,  $K=115,29\pm 8,87$ ,  $p > 0.05$ ) hem de idame dönemindeki EPSP eğiminin ( $F=31,8\pm 5.6$ ,  $K=8,2\pm 2.5$ ;  $t_{14}= 3.291$ ;  $p = 0.05$ ) inhibisyonunu ortadan kaldırdı. Her iki dönemde de istatistiksel olarak anlamlı farklılık oluşturdu. MP kayıtlarında, Kontrol ve Fasudil grubu sıçanlara ait PS genliklerinin deney süresince olan değişimi Şekil 4.17' de verilmiştir.



**Şekil 4.17** PS genlik değerleri: MP deneylerinde elde edilen Kontrol ve Fasudil gruplarına ait PS genliği ortalama değerleri ve standart sapmaları. 1; induksiyon dönemi, 2; idame dönemi

MP kayıtlarında, Kontrol ve Fasudil grubu sıçanlara ait EPSP eğimlerinin deney süresince olan değişimi Şekil 4.18' de verilmiştir



**Şekil 4.18** EPSP eğim değerleri: MP deneylerinde elde edilen Kontrol ve Fasudil gruplarına ait EPSP eğimi ortalama değerleri ve standart sapmaları. 1; induksiyon dönemi, 2; idame dönemi

## 5.TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada, küçük moleküler ağırlıklı ve serin treonin kinaz yapılı proteinlerden, Rho GTPaz ailesinin, öğrenme ve bellek süreçlerindeki rolünü araştırmaya odaklanılmıştır. Rho-ilişkili proteinler, etkilerinin çoğunu, kinazlar (ROCK'lar) vasıtasıyla gösterirler. Rho-kinaz'lar , nöronlardaki büyüme konisi çökmesi ve retraksiyonu ile ilişkilendirilmiş olan RhoA'nın aşağı akışlı efektörleridir (Koch ve ark,2018). Nöron ve dendritik yapılar üzerindeki etkilerine rağmen ROCK inhibisyonunun davranış ve nöroproteksiyon üzerindeki uzun vadeli etkileri hakkında kesin verilere halen ulaşılammıştır. Bizim çalışmamızda, herhangi bir nörodejenerasyonun oluşturulmadığı sağlıklı sıçan hipokampuslerine, ROCK inhibitör maddesi (fasudil) uygulanarak, sinaptik plastisite yanıtlarında (UDG, UDB ve MP) önemli değişikliklere neden olabileceği gösterilmiştir.

Bazı çalışmalar, özellikle ROCK2'nin ekspresyon seviyelerinin, özellikle nörodejeneratif hastalığı olan insanlardan alınan numunelerde, farklı patolojik koşullar altında sinir dokusunda artmış olduğunu göstermiştir (Koch ve ark, 2018). Örneğin, Alzheimer hastalığı'nda (AH), A $\beta$  prekürsör proteini (APP) proteolitik olarak işlenerek A $\beta$  plaklarında artışgörülmektedir. Ayrıca hastalık durumunda artan nörofibriler yumakların komponentlerinin ise tau proteinlerinin hiperfosforillenmesi olduğu düşünülmektedir. A $\beta$  plakları parsiyel olarak sinaptik fonksiyonu bozan aktin polimerizasyonu disregülasyonundan sorumlu olduğu gösterilmiştir. Yapılmışolan metabolik etiketleme çalışmaları ROCK'un kinaz alanının APP proteinini fosforilleyebileceğini göstermiştir. AH modellerinde, frontal korteksten alınan doku örneklerinde ROCK2 ekspresyon seviyelerinin kontrole kıyasla arttığı görülmüştür. Aynı şekilde kognitif bozukluğu olan hasta insanlardan alınan homojenatlarda ROCK2 protein seviyeleri kontrollere kıyasla anlamlı oranda artış göstermiştir. Bu durum Rho/ROCK sinyal yolağının AH'nın seyrinde önemli rolü olduğunu düşündürmektedir. APP'ler hücrede  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  sekretaz olarak adlandırılan proteolitik enzimler tarafından



işlenebilmektedirler. Daha önce yapılmış olan çalışmalarda Rho/ROCK sinyal yolunun bazal ve uyarılmış  $\alpha$ -sekretaz aktivitesinin modülasyonunu sağladığını göstermektedir. Dolayısıyla ROCK sinyal kaskatının aktivitesi APP proteinlerinin proteolitik aktivitesini artırarak da nörodejenerasyona katkı sağlayabilmektedir (Pedrini ve ark,2005). ROCK inhibisyonu yapılmış Alzheimer modellerinde artmış tau protein seviyeleri ve değiştirilmiş p25 protein seviyeleri üzerinde de olumlu etkiler göstermiştir. AH'nın ilerlemesini durdurmadaki deneysel stratejilerden birisi beyinde patolojik olarak artan A $\beta$ 'nin düzeylerini azaltmaktır. Eski çalışmalar Rho/ROCK sinyal kaskatının in vitro A $\beta$ 42 miktarını düzenlediğini gösterilmiştir. ROCK inhibitörü Y-27632'nin bir transgenik fare modelinde uygulanması A $\beta$ 42'nin beyindeki seviyelerini etkin bir şekilde düşürmüştür. İnsan SHSY5Y hücre hattında SHRNA ilişki ROCK1 azalması endojenöz insan A $\beta$ 40 üretimini arttırırken ROCK2 azalımı A $\beta$ 40 düzeylerini azaltmıştır. Aksine hem ROCK1 hem ROCK2'nin azalması primer kortikal kültürlerde A $\beta$ 40 düzeylerinin tüketmiştir. AD modellerinde ROCK inhibisyonunun koruyucu mekanizması otofajik temizleme yollarının modülasyonu ile ilişkilendirilmiştir. Bu veriler ışığında ROCK inhibisyonunun AB üretimi ile mücadelede teröpatik bir seçenek olarak potansiyeli daha detaylıca çalışılmayı hak etmektedir (Mulherkar ve ark,2017; Koch ve ark,2018).

Nörodejeneratif hastalıklardan Parkinson hastalığı ise substantia nigra'da dopaminerjik nöron kaybı ve oluşan Lewy cisimleri ile karakterize edilir. Hastalığın başlangıcında nöronal ve aksonal dejenerasyon hakimdir. Özellikle beynin mezo ve neo kortikal alanlarında ilerleyici dejenerasyon hakimdir. MSS'nde aksonal rejenerasyon eksikliğinin en büyük sorumlu protein yollarından biriside ROCK sinyal yolağıdır. Bu yolağın inhibisyonu Parkinson hastalığında Akt sinyal yolağı fonksiyonunu artırmıştır. Akt/PKB/mTOR sinyal yolları genel olarak hücrede protein translasyonunu sağlamaktadır. Dolayısıyla Rho/ROCK inhibisyonu bu yolların aktivasyonu ile hücrede büyüme ve proliferasyon gibi çok sayıda düzenlemede rol alır. Sonuç olarak, ROCK sinyal yolağının Parkinson hastalığında Akt sinyal yolu üzerinden hücrel fonksiyonları etkilediği bilinmektedir. Bu nedenle ROCK inhibitörleri, MAPK ve Akt sinyal yollarının hayatta kalmasını sağlayan teröpatik bir hedef oluşturmaktadır (Castro-Alvarez ve ark, 2011). İnsan Parkinson hastalarının postmortem beyin kesitlerinden alınan örneklerde ROCK2 ekspresyon seviyelerinin arttığı görülmüştür. Mikroglia'da bu oranın daha fazla olduğu belirtilmiştir. Atipik Parkinson sendromlu

hastaların alınan frontal korteks örneklerinde supranükleer paralizi ve kortikobazal dejenerasyon gözlenmiştir. Hem ROCK 1 hemde ROCK 2 düzeyleri kontrollere kıyasla artmıştır. MPTP lezyonlu farelerde fasudilin oral kullanımı dopaminerjik nöronları hem hücrelölümden kurtarmış hem de nigrostriatal fiberlerin terminal uçlarının innervasyonunu korumuştur. Moleküler düzeyde ROCK inhibisyonu hücre sağkalımını artırmıştır. Daha selektif ROCK inhibitörü Y-27632 ise primer mezensefalik kültürlerde benzer koruyucu etkiler göstermiştir (Koch ve ark, 2018).

ALS oluşturulmuş deney hayvanı modellerinde, ROCK inhibitörü fasudil'in teröpatik amaçlı kullanımı motor semptomların başlangıcında gecikmeye neden olmuştur. Bu durum nöronal uzamış sağ kalımla ilişkili bulunmuştur. İnsanlarda görülen merkezi sinir sistemi dejenerasyonlarında, ROCK ekspresyonu ile ilgili veriler bir araya getirildiğinde sitoskelatal patolojinin baskın rolü için giderek artan kanıtlar elde edilmiştir (Koch ve ark, 2018). Bu durumda ROCK inhibitörleri umut verici moleküler bir hedef olarak düşünülebilir.

Benzer şekilde Huntington hastalığında kontrollere kıyasla HD'li hastalardan alınan kan örneklerinde ve serebral kortekste ROCK1 ekspresyon seviyeleri artmıştır. HD striatum ve kortekste nöronal hücrelerin aşırı kaybıyla karakterize, progresif, ölümcül, otozomal ve dominant bir hastalıktır. Bu hastalıkta Huntington genindeki (HTT) bir mutasyon mutant HTT formları oluşmasına neden olmaktadır. ROCK inhibisyonunun gerçekleştirilmesi ile HTT agregasyonunun önlenildiği gösterilmiştir. Nihayetinde, ROCKinhibisyonu hastalığı modifiye edici bir potansiyele sahip olsa da altta yatan mekanizmalar henüz tam olarak anlaşılammıştır (Koch ve ark, 2018).

ROCK sinyal yolağı ve inhibisyonu sinir sistemine ait nöroprotektif etkileri nedeniyle MSS'nde daha fazla araştırmayı hak etmektedir. Bu nedenle bu çalışmada ROCK'un nöronal sinaptik plastisite ve öğrenmede ki etkileri üzerinde durulmuştur.

Çalışmamızda UDG deneylerinde elde ettiğimiz verilerde, Fasudil kullanılan deney grubunda nöronal güçlenme yanıtlarının baskılandığı görülmüştür. Buna rağmen literatür taramalarında bazı çalışmalarda Y-27632 ROCK inhibitörü kullanılarak yapılan in vitro deneylerde Rho inhibitörünün UDG yanıtını artırdığı gösterilmiştir (Valencia ve ark, 1991; Narumiya ve Dean Thumkeo,2018). Beyin de iskemi modeli oluşturulmuş başka bir deneysel çalışma da ROCK'un uzun süreli inhibe edilmesinin beyin dokusunda GABA<sub>A</sub> ve GABA<sub>B</sub> reseptörlerini regüle ederek bozulmuş olan uzun

dönemli güçlenme yanıtlarını iyileştirdiği ifade edilmiştir (Nakagawa ve ark, 1996). Çalışmamızda UDG'de elde edilen nöronal baskılanma yanıtının nedeni olarak, anestezi altında olan canlı hayvanlar üzerinde deney prosedürlerinin gerçekleştirilmesi olabileceği gibi alta yatan diğer hücrel mekanizmaların olabileceği de düşünülmektedir. Diğer bir faktör olarak fasudil'in diğer kinaz yolları ile çapraz bir etkiye de neden olabileceğini de düşünmekteyiz. Bilgimiz dahilinde, UDG'de Rho kinazların rolünü araştıran elektrofizyolojik in-vivo şartlarda hipokampus içerisine madde infüzyonu gerçekleştirilmiş deneysel bir çalışma bulunmamaktadır. Sistemik, oral ya da intravenöz yolla ROCK inhibitör maddesi uygulanmış, çok sayıda in vivo davranış çalışmaları ya da in vitro kültür çalışmaları bulunmaktadır. Bu nedenle çalışmamız, ROCK inhibitörünün (fasudil) hipokampus alanına doğrudan infüzyonunun gerçekleştirildiği ve canlı hayvan üzerinde elektrofizyolojik kayıtlamanın yapıldığı orijinal bir çalışmadır.

ROCK inhibitörü hidrosifasudilin fare modelinde periferal yolla uygulanması uzamsal öğrenmeyi ve çalışan hafızayı geliştirmiştir. Çalışmamızda elde ettiğimiz UDG yanıtlarında baskılanma görülse de ilginçtir ki MP kayıtlarından alınan yanıtlarda, ROCK inhibitörü fasudil'in UDG yanıtının inhibisyonunu dolayısıyla baskılanmasını ortadan kaldırdığı görülmüştür. UDG kayıtlarında, birçok etkenin nöronal yanıtlarda baskılanmaya neden olmuş olabileceği düşünülmektedir. UDG yanıtlarında elde edilen baskılanma fasudil'in UDG'yi bozduğunu göstermeyebilir. Öyle ki sinaptik plastisitenin plastisitesi olarak adlandırılan MP kayıtlarında UDG'yi artırdığı görülmüştür. Davranış çalışmalarından alınan bazı örneklerde ise fasudil'in ROCK aktivitesini bloklayarak, kronik stresin tetiklediği anormal davranış gelişimini önleyebildiği gösterilmiştir (Garcia-Rojo ve ark, 2016).

Mevcut sonuçlar UDG'de öğrenme ve hafızada güçlendirme sürecinin altında yatan sürekli hücrel ve moleküler değişikliklerde potansiyel bir mekanizma olan Rho/ROCK sinyal yolağının katkısını göstermiştir. Hepsi birlikte ele alındığında ROCK aktivitesi sinaptik fonksiyonun düzenlenmesini etkilerken, ROCK inhibisyonunun sinaps oluşumunu ve nöronal plastisiteyi arttırdığı literatür verileri arasındadır. Bu durum nöronların aktivasyonu esnasında Rho'nun sinapslardaki kompleks ve hassas rolünü vurgulamaktadır.

UDG deneylerinde elde ettiğimiz verilerde ise, Fasudil infüzyonu gerçekleştirilen deney

grubunun nöron yanıtlarında baskılanmanın arttığı görülmüştür. Ancak UDB yanıtlarının artırmasının nedeninin spontan olarak gerçekleşen nöron yanıtın baskılanmasının artması mı ya da inhibitör kaynaklı baskılanmanın bir artışı mı, sorusunu düşündürmüştür. ROCK sinyal yolu inhibe edilmiş hipokampal in-vivo elektrofizyolojik UDB çalışmaları bulunmamaktadır. Bu nedenle veriler daha ayrıntılı inceleme gerektirmektedir.

MP deney kayıtlarından elde ettiğimiz verilerde de Fasudil infüzyonu yapılmış olan deney gruplarında UDG yanıtlarının inhibisyonunu ortadan kaldırarak UDG cevabını artırdığı görülmüştür. MP sinaptik plastisitenin plastisitesi olarak adlandırılmakla birlikte bununla ilgili çok fazla veri mevcut değildir. Bilgimiz dahilinde, literatür taramalarında MP ve ROCK inhibisyonu çalışmaları bulunmamaktadır. Ancak elde ettiğimiz EPSP eğimi ve PS genlik değerlerindeki değişimler ROCK sinyal yolağının nöronal plastisite üzerindeki varlığını kanıtlamaktadır.

Daha önce yapılmış olan çalışmalarda, diğer küçük GTPaz'lerden Rac1'in küçük moleküler yapılı Rho ailesinin bir üyesi olduğunu göstermiştir ve bu GTPaz'ların bazal uzantı yoğunluğu ve şekli, aktivite-bağımlı uzantı büyümesi, AMPA reseptör kümelenmesi gibi matür nöronal sinapsların yapısal yönleri için önemli olduğu gösterilmiştir. Ön beyindeki uyarıcı nöronlarda Rac1'in seçici eliminasyonunun sadece uzantı yapısını etkilemekle kalmayıp, aynı zamanda hipokampüste meydana gelen defektlerde hipokampus-bağımlı uzamsal öğrenmede ki sinaptik plastisiteyi de bozduğu gösterilmiştir. Dahası, Rac1 mutantlar gecikmiş yerleştirme, eşleşme görevinde (DMP) çalışan epizodik benzeri bir hafızanın eksikliğini göstermektedir. Bu durum Rac1'in in vivo ortamda yeni uzamsal bilgilerin hızlı kodlanmasında merkezi bir düzenleyici olduğunu düşündürmektedir. Dolayısıyla bu durum Rho ilişkili diğer proteinlerin de öğrenme ve bellek gibi nöronal fonksiyonları etkilediğini göstermektedir (Fujita ve Yamashita, 2014; Garcia-Rojo ve ark, 2017).

Bazı literatür örneklerinde ise Rho proteinlerinden bazılarının uzun dönemli güçlenme (UDG) üzerinde olumlu etki gösterebileceğini vurgulamıştır. Bu proteinlerden RhoB'nin yüksek frekanslı uyarımda uzun dönemli potansiyelizasyonun NMDA aracılı aktivasyonu ile ilişkili olduğu görülmüştür. Rho protein ailesinden olan bu GTPaz'ın hipokampüste sinaptik iletimin potansiyel araçları olduğunu düşündürmüş olup RhoB'nin UDG sırasında hipokampal sinapslarda plastisite de önemli bir rolü olma

olasılığını artırmıştır (Dubreuil ve ark, 2006).

Yetişkin hipokampal nörogenezi, yaşam boyu meydana gelen nöron yenilenmesidir. Nöronal büyüme esnasında ROCK aktivitesi aksonal retraksiyon ve stres lifi oluşumuna neden olmaktadır. Bununla ilgili olarak beyin dokusunda lateral ventrikül içerisine doğrudan Y-27632 (ROCK inhibitörü) farmakolojik maddesi infüze edilmiş olan literatür örnekleri incelenmiştir. Bu deney modellerinde ROCK inhibitörünün yaklaşık 7 gün boyunca uygulandığı bilinmektedir. Beyin dokularından alınan örneklerde ise ROCK inhibisyonunun uzamsal bellek gelişimi ile ilişkilendirilen dentat girus'ta bulunan yetişkin doğumlu nöronların sayısını artırdığı görülmüştür. Granül hücre tabakasında bulunan yeni doğumlu nöronların hayatta kalma oranını da artırdığı bilinmektedir. Ancak subgranüler alanlarda ise nöroblast oluşumunu etkilemediği kaydedilen veriler arasındadır (Bito ve ark, 2000; Christie ve ark, 2013).

MSS yaralanmalarından sonra nöron hücresi aksonları büyüme inhibe edici moleküller ve reaktif astrosit etkilerine maruz kalmaktadırlar. Bu durumda ROCK aktivitesinin artışı, aktomiyozin kontraktilesinde artmaya neden olduğu görülmüştür. Ardından akson terminallerinde geri çekme kuvvetleri ve rejeneratif yetmezliğe neden olan LIMK aktivasyonunu meydana getirmiştir. Sonuç olarak sinir lifi oluşumunda baskılanmaya neden olduğu bilinmektedir. Bu deneylerde farmakolojik ROCK inhibitör maddesi olarak genellikle fasudil, dimetil Fasudil ya da Y-27632 maddeleri kullanılmıştır. Elde edilen verilerde nörit retraksiyonunun önlediği ve insanlarda Ntera2 nöronlarında nörit büyümesini artırdığı görülmüştür (Fujita ve Yamashita, 2014; Lingor ve ark, 2007).

ROCK inhibitörleri her ne kadar yetişkin sıçanlarda öğrenme ve bellek gelişimine katkı sağlasa da embriyojenik dönem için de gerekli olduğu bilinmektedir. Örneğin, Spesifik olarak ROCK2 eksikliği olan, farelerde kaba beyin anatomisinin normal olduğu, ancak bazal sinaptik iletimde hipokampal uzun-sürelili potansiyelizasyonun bozulduğu bildirilmiştir (Garcia-Rojo ve ark, 2017).

Sonuç olarak normal bilişsel işlevlerin gerçekleşebilmesi için nöronlarda sinaptik plastisite gelişimi esastır. Rho kinazları düzenleyici proteinlerde sinaptik plastisiteyi yönlendirici önemli protein molekülleridir. Bu nedenle RhoGTPaz proteinlerinin hedef kinazları olan ROCK1 ve ROCK2'nin MSS'ndeki rolleri ve etkileri daha detaylı bir araştırmayı gerektirmektedir. Bu moleküllerin inhibe edilmesinde kullanılacak olan inhibitör maddeler daha selektif hale getirilebilir. Küçük GTPaz moleküllerine ait sinyal

yolaklarının hastalıklar üzerindeki etkisi ve daha selektif inhibitörlerinin geliştirilmesi MSS'nde oluşan çok sayıda nörodejeneratif hastalık için tedavi seçeneği oluşturabileceği düşünülmektedir.

Bu çalışmada, sağlıklı sıçan hipokampuslarına hücresel alanda ROCK inhibitörü (fasudil) infüze edilerek hipokampal sinaptik plastisite formları üzerine etkisi araştırılmıştır. Elde edilen elektrofizyolojik sonuçlar fasudil'in sinaptik plastisite üzerinde değişikliklere neden olduğunu göstermiştir. Fasudil infüze edilen sıçanlarda hipokampal uzun dönemli güçlenme (UDG) yanıtları bozulmuştur. Uzun dönemli baskılanma da (UDB) nöronal yanıtları artırırken, Metaplastisite (MP) kayıtlarında ise UDG cevabının inhibisyonunu ortadan kaldırarak, nöronlarda uyarılma sonucu oluşan sinaptik yanıtı artırmıştır. Bu farklı yanıtların oluşmasına neden olan hücresel fonksiyonlar ve dış etkenler henüz bilinmemektedir. Fakat küçük GTPaz Rho proteinlerinin ve efektörü olan ROCK sinyal yolağının sinaptik fonksiyonlar üzerinde etkisi olduğu düşünülmektedir. Sonuç olarak hipokampal öğrenme ve bellek üzerinde hücresel yanıtlarda değişikliğe neden olan ROCK sinyal yolağının nörodejeneratif hastalıkların patogenezinde teröpatik bir hedef olarak düşünülmektedir.

## 6. KAYNAKLAR

- Abraham WC**, Richter-Levin G. From Synaptic Metaplasticity to Behavioral Metaplasticity. *Neurobiol Learn Mem*, 2018;154:1-4.
- Adamson P**, Paterson HF, Hall A. Intracellular localization of the P21 rho proteins. *J Cell Biol*, 1992;119(3):617-627.
- Adnane J**, Muro-Cacho C, Mathews L, Sebti SM, Muñoz-Antonia T. Suppression of rho B expression in invasive carcinoma from head and neck cancer patients. *Clin Cancer Res*, 2002;8(7):2225-2232.
- Amano M**, Chihara K, Nakamura N, Kaneko T, Matsuura Y, Kaibuchi K. The COOH terminus of Rho-kinase negatively regulates rho-kinase activity. *J Biol Chem*, 1999;275(45):32418-32424.
- Amano M**, Kaneko T, Maeda A, Nakayama M, Ito M, Yamauchi T, Goto H, Fukata Y, Oshiro N, Shinohara A, Iwamatsu A, Kaibuchi K. Identification of Tau MAP2 as novel substrates of Rho kinase and myosin phosphatase. *J Neurochem*, 2003;87(3):780-790.
- Amano M**, Nakayama M, Kaibuchi K. Rho-kinase/ROCK: A key regulator of the cytoskeleton and cell polarity. *Cytoskeleton*, 2010;67(9):545-554.
- Amin E**, Dubey BN, Zhang SC, Gremer L, Dvorsky R, Moll JM, Taha MS, Nagel-Steger L, Piekorz RP, Somlyo AV, Ahmadian MR. Rho-kinase: regulation, (dys)function, and inhibition. *Biol Chem*, 2013;394(11):1399-1410.
- Arimura N**, Inagaki N, Chihara K, Ménager C, Nakamura N, Amano M, Iwamatsu A, Goshima Y, Kaibuchi K. Phosphorylation of collapsin response mediator protein 2 by Rho kinase evidence for two separate signaling pathways for growth cone collapse. *J Biol Chem*, 2000;275(31): 23973-23980.
- Arita R**, Hata Y, Ishibashi T. ROCK as a Therapeutic Target of Diabetic Retinopathy. *J Ophthalmol*, 2010;2010:175163.

- Bao W**, Hu E, Tao L, Boyce R, Mirabile R, Thudium DT, Ma XL, Willette RN, Yue TL.; Inhibition of Rho-kinase protects the heart against ischemia/reperfusion injury.; *Cardiovasc Res.*; 2004; 15;61(3):548-58.
- Barr**, Murray L. *The Human Nervous System: An Anatomical wiwpoint*, 2nd ed. In: Mai J, Pacinos G, Oxford, England; 1974.
- Bauer PO**, Wong HK, Oyama F, Goswami A, Okuno M, Kino Y, Miyazaki H, Nukina N. Inhibition of Rho kinases enhances the degradation of mutant huntingtin. *J Biol Chem*, 2009; 284(19):13153-13164.
- Bito H**, Furuyashiki T, Ishihara H, Shibasaki Y, Ohashi K, Mizuno K, Maekawa M, Ishizaki T, Narumiya, S. A critical role for Rho associated kinase, p160ROCK, in determining axon outgrowth in mammalian CNS neuron. *Neuron*, 2000; 26(2):431-441.
- Bloom GS**. Amyloid- $\beta$  and tau: the trigger and bullet in Alzheimer disease pathogenesis. *Jama Neurol*, 2014; 71(4):505-508.
- Blumenstein L**, Ahmadian MR. Models of the cooperative mechanism for Rho effector recognition: implications for RhoA mediated effector activation. *J Biol Chem*, 2004; 279(51):53419-53426.
- Boureux A**, Vignal E, Faure S, Fort P. Evolution of the Rho family of ras-like GTPases in eukaryotes. *Mol Biol Evol*, 2007; 24(1):203-216.
- Broca P**. Sur la circonvolution limbique et la scissure limbique. *Bull Soc Anthropol*, 1877; 12:646-657.
- Bustelo XR**, Sauzeau V, Berenjano IM. GTP-binding proteins of the Rho/Rac family: regulation, effectors and functions in vivo. *Bioessays*, 2007; 29(4):356-370.
- Castro-Alvarez JF**, Gutierrez-Vargas J, Darnaudéry M, Cardona-Gómez GP. ROCK inhibition prevents tau hyperphosphorylation and p25/CDK5 increase after global cerebral ischemia. *Behav Neurosci*, 2011; 125(3):465-472.
- Christie KJ**, Turbic A, Turnley AM. Adult hippocampal neurogenesis, Rho kinase inhibition and enhancement of neuronal survival. *Neuroscience*, 2013; 247:75-83.
- Cihan A**, Ark M. Ezrin/Radixin/Moesin (ERM) proteinleri. *Ankara Ecz. Fak. Derg.*, 2008; 37(4):295-309.
- Coleman ML**, Sahai EA, Yeo M, Bosch M, Dewar A, Olson MF. Membrane blebbing during apoptosis results from caspase mediated activation of ROCK I. *Nat Cell Biol*, 2001; 3(4):339-345.
- Destrieux C**, Bourry D, Vellut S. Surgical anatomy of the hippocampus. *Neurochirurgie*, 2013; 59(4-5):149-158.



- Dubreuil CI**, Marklund N, Deschamps K, McIntosh TK, McKerracher L. Activation of Rho after traumatic brain injury and seizure in rats. *Exp Neurol*, 2006; 198(2):361-369.
- Endo M**, Ohashi K, Mizuno K. LIM kinase and slingshot are critical for neurite extension. *J Biol Chem*, 2007; 282(18): 13692-13702.
- Erik G.** Gentry, Benjamin W. Henderson, Andrew E. Arrant, Marla Gearing, Yangbo Feng, Nicole C. Riddle and Jeremy H. Herskowitz. Rho Kinase Inhibition as a Therapeutic for Progressive Supranuclear Palsy and Corticobasal Degeneration. *The J of Neurosci*, 2016; 36(4):1316-1323.
- Fu P**, Liu F, Su S, Wang W, Huang XR, Entman ML, Schwartz RJ, Wei L, Lan HY. Signaling mechanism of renal fibrosis in unilateral ureteral obstructive kidney disease in ROCK1 knockout mice. *J Am Soc Nephrol*, 2006; 17(11):3105-3114.
- Fujita Y**, Yamashita T.; Axon growth inhibition by RhoA/ROCK in the central nervous system.; *Front Neurosci*; 2014; 22;8:338.
- Fukata Y**, Oshiro N, Kinoshita N, Kawano Y, Matsuoka Y, Bennett V, Matsuura Y, Kaibuchi K. Phosphorylation of adducin by Rho-kinase plays a crucial role in cell motility;. *J. Cell Biol.*; 1999; 19;145(2):347-61.
- Fukumoto Y**, Yamada N, Matsubara H, Mizoguchi M, Uchino K, Yao A, Kihara Y, Kawano M, Watanabe H, Takeda Y, Adachi T, Osanai S, Tanabe N, Inoue T, Kubo A, Ota Y, Fukuda K, Nakano T, Shimokawa H.; Double-blind, placebo-controlled clinical trial with a rho-kinase inhibitor in pulmonary arterial hypertension.; *Circ J.*; 2013; 77(10):2619-25.
- García-Rojo G**, Fresno C, Vilches N, Díaz-Véliz G, Mora S, Aguayo F, Pacheco A, Parra-Fiedler N, Parra CS, Rojas PS, Tejos M, Aliaga E, Fiedler JL. The ROCK Inhibitor Fasudil Prevents Chronic Restraint Stress-Induced Depressive Like Behaviors and Dendritic Spine Loss in Rat Hippocampus. *Int J Neuropsychopharmacol*, 2017; 20(4):336-345.
- Goedert M.** Neurodegeneration: Alzheimer's and Parkinson's diseases: The prion concept in relation to assembled A $\beta$ , tau, and  $\alpha$ -synuclein. *Science*, 2015; 349(6248):125555.
- Goto H**, Kosako H, Tanabe K, Yanagida M, Sakurai M, Amano M, Kaibuchi K, Inagaki M. Phosphorylation of vimentin by Rho-associated kinase at a unique amino-terminal site that is specifically phosphorylated during cytokinesis. *J Biol Chem*, 1998; 273(19):11728-11736.
- Gu Y**, Filippi MD, Cancelas JA, Siefring JE, Williams EP, Jasti AC, Harris CE, Lee AW, Prabhakar R, Atkinson SJ, Kwiatkowski DJ, Williams DA.

Hematopoietic cell regulation by Rac1 and Rac2 guanosine triphosphatases. *Science*, 2003;302(5644):445-449.

**Guo MF**, Meng J, Li YH, Yu JZ, Liu CY, Feng L, Yang WF, Li JL, Feng QJ, Xiao BG, Ma CG. The inhibition of Rho kinase blocks cell migration and accumulation possibly by challenging inflammatory cytokines and chemokines on astrocytes. *J Neurol Sci*; 2014; 343 (1-2):69-75.

**Gurkar AU**, Chu K, Raj L, Bouley R, Lee SH, Kim YB, Dunn SE, Mandinova A, Lee SW. Identification of ROCK1 kinase as a critical regulator of Beclin1-mediated autophagy during metabolic stress. *Nat. Commun*, 2013;4(2):2189.

**Herskowitz JH**, Feng Y, Mattheyses AL, Hales CM, Higginbotham LA, Duong DM, Montine TJ, Troncoso JC, Thambisetty M, Seyfried NT, Levey AI, Lah JJ.

Pharmacologic inhibition of ROCK2 suppresses amyloid $\beta$  production in an Alzheimer's disease mouse model. *J Neurosci*, 2013;33(49):19086-19098.

**Holtmaat A**, Svoboda K. Experience-dependent structural synaptic plasticity in the mammalian brain. *Nat Rev Neurosci*, 2009;10(9):647-658.

**Huang L**, Zhao LB, Yu ZY, He XJ, Ma LP, Li N, Guo LJ, Feng WY. Long-term inhibition of Rho kinase restores the LTP impaired in chronic forebrain ischemia rats by regulating GABAA and GABAB receptors. *Neuroscience*, 2014;26(277):383-391.

**Huentelman MJ**, Stephan DA, Talboom J, Corneveaux JJ, Reiman DM, Gerber JD, Barnes CA, Alexander GE, Reiman EM, Bimonte-Nelson HA. Peripheral delivery of a ROCK inhibitor improves learning and working memory. *Behav Neurosci*, 2009;123(1):218-223.

**Iizuka M**, Kimura K, Wang S, Kato K, Amano M, Kaibuchi K, Mizoguchi A. Distinct distribution and localization of Rho kinase in mouse epithelial, muscle and neural tissues. *Cell Struct*, 2012;37(8):155-175.

**Jacobs M**, Hayakawa K, Swenson L, Bellon S, Fleming M, Taslimi P, Doran J. The structure of dimeric ROCK I reveals the mechanism for ligand selectivity. *J Biol Chem* 2006 281(1):260-8.

**James Liao**, Minoru Seto, Kensuke Noma. Rho kinase (ROCK) Inhibitors. *The Cardiovasc Pharmacol*, 2007;50(1):17-24.

**John GR**, Chen L, Rivieccio MA, Melendez-Vasquez CV, Hartley A, Brosnan CF. Interleukin-1 $\beta$  induces a reactive astroglial phenotype via deactivation of the Rho GTPase-Rock axis. *J Neurosci*, 2004;24(11):2837-2843.

- Julian L**, Olson MF. Rho associated coiled coil containing kinases (ROCK): structure, regulation and functions. *Small GTPases*,2014;5:e29846.
- Kang S**, Ling QL, Liu WT, Lu B, Liu Y, He L, Liu JG. Down regulation of dorsal striatal RhoA activity and impairment of working memory in middle aged rats. *Neurobiol Learn Mem*,2013;103:3-10.
- Katoh K**, Kano Y, Amano M, Onishi H, Kaibuchi K, Fujiwara K. Rho-kinase mediated contraction of isolated stress fibers. *J Cell Bio*, 2001;153(3):569-584.
- Knierim JJ**. The hippocampus. *Curr Biol*,2015;25(23):1116-1121.
- Koch JC**, Tatenhorst L, Roser AE, Saal KA, Tönges L, Lingor P. ROCK inhibition in models of neurodegeneration and its potential for clinical translation. *Pharmacol Ther*,2018;189:1-2.
- Lee HH**, Chang ZF. Regulation of RhoA-dependent ROCKII activation by Shp2. *J Cell Bio*,2008;181(6):999-1012.
- Lee JH**, Zheng Y, von Bornstadt D, Wei Y, Balcioglu A, Daneshmand A, Yalcin N, Yu E, Herisson F, Atalay YB, Kim MH, Ahn YJ, Balkaya M, Sweetnam P, Schueller O, Poyurovsky MV, Kim HH, Lo EH, Furie KL, Ayata C. Selective ROCK2 Inhibition In Focal Cerebral Ischemia. *Ann Clin Transl Neurol*,2014;1(1):2-14.
- Leung T**, Manser E, Tan L, Lim L. A novel serine/threonine kinase binding the Ras-related RhoA GTPase which translocates the kinase to peripheral membranes. *J Biol Chem*,1995;270(49):29051-29052.
- Li Z**, Dong X, Wang Z, Liu W, Deng N, Ding Y, Tang L, Hla T, Zeng R, Li L, Wu D.; Regulation of PTEN by Rho small GTPases.; *Nat Cell Biol.*; 2005; 7(4):399-404.
- Lingor P**, Teusch N, Schwarz K, Mueller R, Mack H, Bähr M, Mueller BK. Inhibition of Rho kinase (ROCK) increases neurite outgrowth on chondroitin sulphate proteoglycan in vitro and axonal regeneration in the adult optic nerve in vivo. *J Neurochem*, 2007;103
- Liu Y**, Gray NS.; Rational design of inhibitors that bind to inactive kinase conformations.; *Nat Chem Biol.*; 2006; 2(7):358-64.
- Luo L**. Actin cytoskeleton regulation in neuronal morphogenesis and structural plasticity. *Annu Rev Cell Dev Biol*; 2002; 18:601-635.
- Machesky LM**, Insall RH. Scar1 and the related Wiskott-Aldrich syndrome protein, WASP, regulate the actin cytoskeleton through the Arp2/3 complex. *Curr Biol*,1998;31(8):1347-1356.

- Malenka RC.** Synaptic plasticity in the hippocampus: LTP and LTD. *Cell*,1994;78(4):535-538.
- Matsui T,** Amano M, Yamamoto T, Chihara K, Nakafuku M, Ito M, Nakano T, Okawa K, Iwamatsu A, Kaibuchi K. Rho associated kinase, a novel serine/threonine kinase as putative target for small GTP binding protein RHO. *EMBO J*, 1996;15(9):2208-2216.
- Matsui T,** Maeda M, Doi Y, Yonemura S, Amano M, Kaibuchi K, Tsukita S, Tsukita S. Rho-kinase phosphorylates COOH terminal threonines of ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins and regulates their head-to-tail association. *J Cell Biol*,1998;140(3):647-657.
- Mills JC,** Stone NL, Erhardt J, Pittman RN. Apoptotic membrane blebbing is regulated by myosin light chain phosphorylation. *J Cell Biol*,1998;140(3):627-636.
- Mimura F,** Yamagishi S, Arimura N, Fujitani M, Kubo T, Kaibuchi K, Yamashita T. Myelin-associated glycoprotein inhibits microtubule assembly by a Rho-kinase-dependent mechanism. *J Biol Chem*,2006;281(23):15970-15979.
- Monnier PP,** Sierra A, Schwab JM, Henke-Fahle S, Mueller BK. The Rho/ROCK pathway mediates neurite growth-inhibitory activity associated with the chondroitin sulfate proteoglycans of the CNS glial scar. *Mol Cell Neurosci*,2003;22(3):319-330.
- Morris CM,** Haataja L, McDonald M, Gough S, Markie D, Groffen J, Heisterkamp N. The small GTPase RAC3 gene is located within chromosome band 17q25.3 outside and telomeric of a region commonly deleted in breast and ovarian tumours. *Cytogenet Cell Genet*,2000;89(1-2):18-23.
- Moshirfar M,** Parker L, Birdsong OC, Ronquillo YC, Hofstedt D, Shah TJ, Gomez AT, Hoopes PCS. Use of Rho kinase Inhibitors in Ophthalmology: A Review of the Literature. *Med Hypothesis Discov Innov Ophthalmol*,2018;7(3):101-111.
- Mrass P,** Oruganti SR, Fricke GM, Tafoya J, Byrum JR, Yang L, Hamilton SL, Miller MJ, Moses ME, Cannon JL. ROCK regulates the intermittent mode of interstitial T cell migration in inflamed lungs. *Nat Commun*,2017;8(1):1010.
- Nakagawa O,** Fujisawa K, Ishizaki T, Saito Y, Nakao K, Narumiya S. ROCK-I and ROCK-II, two isoforms of Rho-associated coiled coil forming protein serine/threonine kinase in mice. *FEBS Lett*,1996;392(2):189-193.

- Narumiya S, Thumkeo D.** Rho signaling research: history, current status and future directions. *Febs Lett.* 2018 592(11):1763-1776.
- Neves G, Cooke SF, Bliss TV.** Synaptic plasticity, memory and the hippocampus: a neural network approach to causality. *Nat Rev Neurosci*,2008;9(1):65-75.
- Niego B, Lee N, Larsson P , De Silva TM, Au AE, McCutcheon F, Medcalf RL .** Selective inhibition of brain endothelial Rho-kinase-2 provides optimal protection of an in vitro blood-brain barrier from tissue-type plasminogen activator and plasmin. *Plos One*,2017;12(5):e177332.
- Ogawa T, Hirokawa N;** Microtubule Destabilizer KIF2A undergoes distinct site-specific phosphorylation cascades that differentially affect neuronal morphogenesis *Cell Reports* 2015; 12(11):1774-178
- Ohashi K, Hosoya T, Takahashi K, Hing H, Mizuno K.** A Drosophila homolog of LIM-kinase phosphorylates cofilin and induces actin cytoskeletalreorganization. *Biochem Biohys Res Commun*,2000;276(3):1178-1185.
- Okumura N, Kinoshita S, Koizumi N.** Application of Rho Kinase Inhibitors for the Treatment of Corneal Endothelial Diseases. *J Ophthalmol*,2017;2017:2646904.
- Olofsson B.** Rho guanine dissociation inhibitors: pivotal molecule in cellular signalling. *Cell Signal*, 1999; 11(8):545-554.
- Ono-Saito N, Niki I, Hidaka H.** H-series protein kinase inhibitors and potential clinical applications. *Pharmol Ther*,1999;82(2-3):123-131.
- Özdemir A, Ark Mustafa.** Rho Kinaz ve Apoptoz. *MEÜ Sağ. Bil. Derg.* 2009; 2(2):1-9.
- Park JH, Arakawa-Takeuchi S, Jinno S, Okayama H.** Rho associated kinase connect a cell cycle controlling anchorage signal to the mammalian target of rapamicin pathway. *J Biol Chem*,2011;286(26):23132-23141.
- Pinar C, Fontaine CJ, Triviño-Paredes J, Lottenberg CP, Gil-Mohapel J, Christie BR.** Revisiting the flip side: Longterm depression of synaptic efficacy in the hippocampus. *Nurosci Biobehav Rev*;2017;80:394-413.
- Qi L, Lv T, Cheng Y, Yu M, Han H, Kong H, Xie W, Wang H, Zhang Y, Huang Z.** Fasudil dichloroacetate (FDCA), an orally available agent with potent therapeutic efficiency on monocrotaline induced pulmonary arterial hipertensiyon rats. *Bioorg Med Chem Lett*,2019;29(14):1812-1818.

- Rao PV**, Deng PF, Kumar J, Epstein DL. Rao PV<sup>1</sup>, Deng PF, Kumar J, Epstein DL. Modulation of aqueous humor outflow facility by the Rho kinase-specific inhibitor Y-27632. *Invest Ophthalmol Vis Sci*,2001;42(5):1029-1037.
- Rao PV**, Pattabiraman PP, Kopczynski C. Role of the Rho GTPase/Rho kinase signaling pathway in pathogenesis and treatment of glaucoma: Bench to bedside research. *Exp Eye Res*,2017;158:23-32.
- Ricker E**, Chowdhury L, Yi W, Pernis AB. The RhoA-ROCK pathway in the regulation of T and B cell responses. *F1000 Res*,2016;5:2295.
- Riento K**, Guasch RM, Garg R, Jin B, Ridley AJ. RhoE binds to ROCK I and inhibits downstream signaling. *Mol Cell Biol*,2003;23(12):4219-4229.
- Roser AE**, Tönges L, Lingor P. Modulation of Microglial Activity by Rho-Kinase (ROCK) Inhibition as Therapeutic Strategy in Parkinson's Disease and Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Front Aging Neurosci*,2017;4(9):94.
- Sadler TW**: Langman's medical embryology. Altıncı baskı, Baltimore: Williams&WilkinsPress, 1990: 356.
- Sapet C** , Simoncini S, Llorca B, Puthier D, Sampol J, Nguyen C, Dignat-George F, Anfosso F. Thrombin-induced endothelial microparticle generation: identification of a novel pathway involving ROCK-II activation by caspase-2. *Blood*,2006;108(6):1868-1876.
- Sasaki Y**, Suzuki M, Hidaka H.; The novel and specific Rho-kinase inhibitor (S)-(+)-2-methyl-1-[(4-methyl-5-isoquinoline)sulfonyl]-homopiperazine as a probing molecule for Rho-kinase-involved pathway.; *Pharmacol Ther.*; 2002; 93(2-3):225-32.
- Scharfman HE** The enigmatic mossy cell of the dentate gyrus. *Nat Rev Neurosci*. 2016; 17(9):562-75.
- Schmidt A**, Hall A. Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch. *Genes Dev*. 2002 ;16(13):1587-609.
- Schofield AV**, Steel R, Bernard O. Rho-associated coiled-coil kinase (ROCK) protein controls microtubule dynamics in a novel signaling pathway that regulates cell migration. *J Biol Chem*,2012;287(52):43620-43629
- Sebbagh M**, Renvoizé C, Hamelin J, Riché N, Bertoglio J, Bréard J. Caspase-3-mediated cleavage of ROCK I induces MLC phosphorylation and apoptotic membrane blebbing. *Nat Cell Bio*,2001;3(4):346-352.

- Shalaka M**, Karen F, Wei H, Mohammad D U, Raymond J. G, Mauro C, Claudia R,<sup>4</sup> Kimberley T RhoA-ROCK Inhibition Reverses Synaptic Remodeling and Motor and Cognitive Deficits Caused by Traumatic Brain Injury *Sci Rep*. 2017; 7: 10689.
- Shi J**, Wei L. Rho kinase in the regulation of cell death and survival. *Arch Immunol Ther Exp*,2007;55(2):61-75.
- Shi J**, Zhang YW, Summers LJ, Dorn GW 2nd, Wei L. Disruption of ROCK1 gene attenuates cardiac dilation and improves contractile function in pathological cardiac hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol*,2008;44(3):551-560.
- Shibuya M**, Hirai S, Seto M, Satoh S, Ohtomo E; Fasudil Ischemic Stroke Study Group. Effects of fasudil in acute ischemic stroke: results of a prospective placebo controlled double blind trial. *J Neurol Sci*, 2005;238(1-2):31-39
- Shimizu Y**, Thumkeo D, Keel J, Ishizaki T, Oshima H, Oshima M, Noda Y, Matsumura F, Taketo MM, Narumiya S. ROCK-I regulates closure of the eyelids and ventral body wall by inducing assembly of actomyosin bundles. *J Cell Biol*. 200;168(6):941-53.
- Sladojevic N**, Yu B, Liao JK. ROCK as a therapeutic target for ischemic stroke. *Expert Rev Neurother* 2017 17(12):1167-1177.
- Steve P**, Troy C, Prendergast G, Petenceska S, Ehrlich M, Gandy S Modulation of Stain Activated Shedding of Alzheimer APP Ectodomain by ROCK *PlosMedicine* 2005 2(1):e18
- Sturdivant JM**, Royalty SM, Lin CW, Moore LA, Yingling JD, Laethem CL, Sherman B, Heintzelman GR, Kopczynski CC, deLong MA. Discovery of the ROCK inhibitor netarsudil for the treatment of open-angle glaucoma. 2016 26(10):2475-2480.
- Suzuki Y**, Shibuya M, Satoh S, Sugimoto Y, Takakura K.; A postmarketing surveillance study of Fasudil treatment after aneurysmal subarachnoid hemorrhage.; *Surg Neurol.*; 2007; 68(2):126-31
- Swanger SA**, Mattheyses AL, Gentry EG, Herskowitz JH. ROCK1 and ROCK2 inhibition alters dendritic spine morphology in hippocampal neurons. *Cell Logist* 2016 19;5(4):e1133266.
- Swärd K**, Dreja K, Susnjar M, Hellstrand P, Hartshorne DJ, Walsh MP. Inhibition of Rho-associated kinase blocks agonist-induced Ca<sup>2+</sup> sensitization of myosin phosphorylation and force in guinea-pig ileum. *J physiol*,2000;522(1):33-49.

- Tatenhorst L**, Eckermann K, Dambeck V, Fonseca-Ornelas L, Walle H, Lopes da Fonseca T, Koch JC, Becker S, Tönges L, Bähr M, Outeiro TF, Zweckstetter M, Lingor P. Fasul attenuates aggregation of  $\alpha$ -synuclein in models of Parkinson's disease. *Acta Neuropathol Commun*,2016;4:39.
- Thumkeo D**, Keel J, Ishizaki T, Hirose M, Nonomura K, Oshima H, Oshima M, Taketo MM, Narumiya S. Targeted disruption of the mouse rho-associated kinase 2 gene results in intrauterine growth retardation and fetal death. *Mol Cell Bio*. 2003 23(14):5043-55.
- Totsukawa G**, Yamakita Y, Yamashiro S, Hartshorne DJ, Sasaki Y, Matsumura F. Distinct roles of ROCK (Rho kinase) and MLCK in spatial regulation of MLC phosphorylation for assembly of stress fibers and focal adhesions in 3 T3 fibroblasts. *J Cell Biol*,2000;150(4):797-806.
- Tönges L**, Frank T, Tatenhorst L, Saal KA, Koch JC, Szegö ÉM, Bähr M, Weishaupt JH, Lingor P. Inhibition of Rho kinase enhances survival of dopaminergic neurons and attenuates axonal loss in a mouse model of Parkinson's disease. *Brain*,2012;135(11):3355-3370.
- Tönges L**, Koch JC, Bähr M, Lingor P. ROCKing Regeneration: Rho Kinase Inhibition as Molecular Target for Neurorestoration. *Front Mol Neurosci*,2011;4:39.
- Tybulewicz V**, Henderson R; Rho Family GTPases and their regulators in lymphocytes; *Nat Rev Immunol*; 2009; 9(9): 630–644.
- Ulusoy A**, Kirik D. Development of advanced therapies based on viral vector-mediated overexpression of therapeutic molecules and knockdown of disease-related genes for Parkinson's disease. *Therapeutic Delivery*,2010;2(1):37-50.
- Valencia A**, Chardin P, Wittinghofer, Sander C. The ras protein family: evolutionary tree and role of conserved amino acids. *Biochemistry*,1991;30:4637-4648.
- Wang KC**, Kim JA, Sivasankaran R, Segal R, He Z. P75 interacts with the Nogo receptor as a co-receptor for Nogo, MAG and OMgp. *Nature*,2002;420(6911) :74-78.
- Ward Y**, Yap S, V. Ravichandran, Matsumura F, Ito M, Spinelli B, Kelly K; The GTP binding proteins Gem and Rad are negative regulators of the Rho–Rho kinase pathway; *J Cell Biol*.; 2002; 157(2): 291–302.
- Wu CH**, Fallini C, Ticozzi N, Keagle PJ, Sapp PC, Piotrowska K, Lowe P, Koppers M, McKenna-Yasek D, Baron DM, Kost JE, Gonzalez-Perez P, Fox AD, Adams J, Taroni F, Tiloca C, Leclerc AL, Chafe SC, Mangroo D, Moore MJ, Zitzewitz JA, Xu ZS, van den Berg LH, Glass JD, Siciliano G, Cirulli ET, Goldstein DB, Salachas F, Meininger V, Rossoll W, Ratti A, Gellera C, Bosco DA, Bassell GJ, Silani V, Drory VE, Brown RH Jr, Landers JE.



Mutations in the profilin 1 gene cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*,2012;488(7412):499-503.

- Wu J**, Li J, Hu H, Liu P, Fang Y, Wu D.; Rho-kinase inhibitor, Fasudil, prevents neuronal apoptosis via the Akt activation and PTEN inactivation in the ischemic penumbra of rat brain., *Cell Mol Neurobiol*; 2012; 32(7):1187-97.
- Yan J**, Pan Y, Zheng X, Zhu C, Zhang Y, Shi G, Yao L, Chen Y, Xu N. Comparative Study of ROCK1 and ROCK2 in Hippocampal Spine Formation and Synaptic Function. *Neurosci Bull*, 2019;35(4):649-660.
- Yan Y**, Yu J, Gao Y, Kumar G, Guo M, Zhao Y, Fang Q, Zhang H, Yu J, Jiang Y, Zhang HT, Ma CG.; Therapeutic potentials of the Rho kinase inhibitor Fasudil in experimental autoimmune encephalomyelitis and the related mechanisms.; *Metab Brain Dis*; 2019; 34(2):377-384.
- Yao L**, Chandra S, Toque HA, Bhatta A, Rojas M, Caldwell RB, Caldwell RW. Prevention of diabetes induced arginase activation and vascular dysfunction by Rho kinase (ROCK) knockout. *Cardiovasc Res*,2013;97(3):509-519.
- Yokoyama T**, Goto H, Izawa I, Mizutani H, Inagaki M.; Aurora-B and Rho-kinase/ROCK, the two cleavage furrow kinases, independently regulate the progression of cytokinesis: possible existence of a novel cleavage furrow kinase phosphorylates ezrin/radixin/moesin (ERM).; *Genes Cells*.; 2005; 10(2):127-37.
- Zhang H**, Guo M, Zhang L, Xue H, Chai Z, Yan Y, Xing Y, Xiao B, Zhang P, Ma C.; [Anti-inflammatory effect and mechanisms of Huangqi glycoprotein in treating experimental autoimmune encephalomyelitis].; *Folia Neuropathol*; 2017; 55(4):308-316.



T.C.  
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ  
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU  
(EÜHADYEK)



Tarih: 16.07.2018

Toplantı Sayısı: 06

Karar No:18/090

Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 16.07.2018 tarihinde Prof. Dr. Fahri OĞUZKAYA 'nın başkanlığında toplanmıştır.

Üye Adı/Soyadı	Ünvanı	Bölümü	İmza
Fahri OĞUZKAYA	Prof. Dr.	Tıp Fakültesi	
Coşkun TEZ	Prof. Dr.	Fen Fakültesi	
Gültekin ATALAN	Prof. Dr.	Veteriner Fakültesi	
Füsün Ferda ERDOĞAN	Prof. Dr.	Tıp Fakültesi	
Serpil SARIOZKAN	Prof. Dr.	Veteriner Fakültesi	
Yusuf KONCA	Prof. Dr.	Ziraat Fakültesi	
Ahmet ÖZTÜRK	Prof. Dr.	Tıp Fakültesi	
Zühal HAMURCU	Doç. Dr.	Tıp Fakültesi	
M. Betül AYCAN	Doç. Dr.	Eczacılık Fakültesi	KATILMADI
Sezer DEMİRBUĞA	Doç. Dr.	Diş Hekimliği Fakültesi	
Nalan Hakime NOĞAY	Doç. Dr.	Sağlık Bilimleri Fakültesi	
Çağrı Çağlar SİNMEZ	Yard.Doç. Dr.	Veteriner Fakültesi	
Burcu ÜNLÜ ENDİRLİK	Yard.Doç. Dr.	Eczacılık Fakültesi	
Zeynep SOYER SARICA	Dr.	Deneyel Araştırmalar Uygulama ve Arş.Mrkz.	
Özge AL	Arş. Gör. Dr.	Genom ve Kök Hücre Merkezi (GENKÖK)	
Ali KOÇ	Kurumla İlişkisi Olmayan Üye	Sivil Üye	KATILMADI
Mehmet TAV	Dernek Üyesi (Avukat)	Sivil Toplum Kuruluşu Temsilcisi	KATILMADI

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji A.D.'dan Prof. Dr. Nurcan DURSUN tarafından sunulan "RhoA/Rho Kinaz İnhibisyonun Kalp Yetmezliği Parametreleri Üzerine Olan Etkisinin Deneyel Yetmezlik Modelinde İncelenmesi" başlıklı proje incelenerek çalışmanın yapılmasının uygun olacağına ve Rektörlük makamına sunulmasına oybirliğiyle karar verildi.

Tarih : 16.07.2018  
Etik Kurul Başkanı : Prof. Dr. Fahri OĞUZKAYA  
İmza :

# RHO/RHO-KİNAZ'IN FASUDİL İLE İNHİBİSYONUNUN HİPOKAMPAL SİNAPTİK PLASTİSİTE ÜZERİNE OLAN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

## ORIJINALLIK RAPORU

%**4**

BENZERLİK ENDEKSI

%**1**

İNTERNET  
KAYNAKLARI

%**3**

YAYINLAR

%

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

## BİRİNCİL KAYNAKLAR



BÖLÜKBAŞI HATİP, Funda F., HATİP-AL-KHATİB, İzzettin, ÜLKER, Sibel and DÖKMECİ, İsmet. "Adjuvanla artrit oluşturulmuş sıçan modelinde izole aort preparatının reaktif yanıtları ve allopürinol'ün gevşeme yanıtlarına etkisi", Pamukkale Üniversitesi, 2009.

Yayın

%**1**



Satish Rattan, Benjamin R. Phillips, Pinckney J. Maxwell. "RhoA/Rho-Kinase: Pathophysiologic and Therapeutic Implications in Gastrointestinal Smooth Muscle Tone and Relaxation", Gastroenterology, 2010

Yayın

%**1**



Xosé R. Bustelo. "GTP-binding proteins of the Rho/Rac family: regulation, effectors and functions in vivo", BioEssays, 04/2007

Yayın

<%**1**



[norosirurji.dergisi.org](http://norosirurji.dergisi.org)

## EK 18. ÖZ GEÇMİŞ ÖRNEĞİ

### ÖZ GEÇMİŞ

#### KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı: Hatice SARAY  
Uyruğu: Türkiye (TC)  
Doğum Tarihi ve Yeri: 08 Ağustos 1987, Kaman/KIRŞEHİR  
Medeni Durumu: Bekâr  
Tel: 0531 780 89 28  
email: haticesaray87@gmail.com  
Yazışma Adresi: Ahi Evran Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi KIRŞEHİR

#### EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Lisans	AEÜ Sağlık Yüksek Okulu, Hemşirelik	2016
Ön Lisans	EÜ Halil Bayraktar SHMYO, Elektronörofizyoloji	2007
Lise	Sağlık Meslek Lisesi, Kaman/KIRŞEHİR	2005

#### İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görev
2017- Halen	Ahi Evran Üniv. Eğitim ve Araştırma Hastanesi, KVC yoğun Bakım, Kırşehir	Hemşire
2013-2017	Ahi Evran Üniv. Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Acil Servis, Kırşehir	Hemşire
2007-2013	Şarkışla Devlet Hastanesi, Sivas	Hemşire

#### YABANCI DİL

İngilizce

## EK 19. İÇİNDEKİLER