

**FARELERDE NİKOTİN YOKSUNLUĞUNUN  
HİPOKAMPUS'TAKİ ETKİLERİNİN DAVRANIŞSAL VE  
EPİGENETİKSEL OLARAK İNCELENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**BURÇİN ÜN**

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ANATOMİ  
ANABİLİM DALI**

**MERSİN  
TEMMUZ - 2018**

**FARELERDE NİKOTİN YOKSUNLUĞUNUN  
HİPOKAMPUS'TAKİ ETKİLERİNİN DAVRANIŞSAL VE  
EPIGENETİKSEL OLARAK İNCELENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**BURÇİN ÜN**

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ANATOMİ  
ANABİLİM DALI**

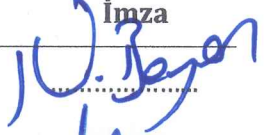


**Danışman  
Dr. Öğr. Üyesi Nail Can ÖZTÜRK**

Bu tez, Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından  
2016-2-TP2-1834 nolu proje olarak desteklenmiştir.

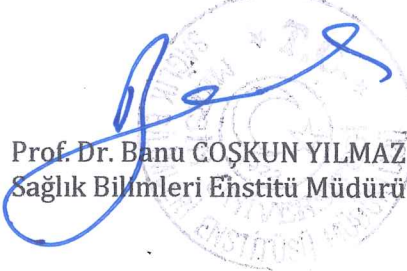
**MERSİN  
TEMMUZ - 2018**

## ONAY

Burçin ÜN tarafından Dr. Öğr. Üyesi Nail Can ÖZTÜRK danışmanlığında hazırlanan "Farelerde Nikotin Yoksunluğunun Hipokampus'taki Etkilerinin Davranışsal ve Epigenetiksel Olarak İncelenmesi" başlıklı çalışma aşağıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından 19.07.2018 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavı sonucunda oy birliği ile Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Görevi	Ünvanı, Adı ve Soyadı	İmza
Başkan	Prof. Dr. Neslihan BOYAN	
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Leyla ŞAHİN	
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Nail Can ÖZTÜRK	

Yukarıdaki Jüri kararı Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 29.08.2018 tarih ve 2018/350 sayılı kararıyla onaylanmıştır.

  
Prof. Dr. Banu COŞKUN YILMAZ  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

*Bu tezde kullanılan özgün bilgiler, şekil, tablo ve fotoğraflardan kaynak göstermeden alıntı yapmak 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunu hükümlerine tabidir.*

## ETİK BEYAN

Mersin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliğinde belirtilen kurallara uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada,

- Tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
  - Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlâk kurallarına uygun olarak sunduğumu,
  - Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
  - Atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak kullandığımı,
  - Kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
  - Bu tezin herhangi bir bölümünü Mersin Üniversitesi veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı,
  - Tezin tüm telif haklarını Mersin Üniversitesi'ne devrettiğimi
- beyan ederim.

## ETHICAL DECLARATION

This thesis is prepared in accordance with the rules specified in Mersin University Graduate Education Regulation and I declare to comply with the following conditions:

- I have obtained all the information and the documents of the thesis in accordance with the academic rules.
- I presented all the visual, auditory and written informations and results in accordance with scientific ethics.
- I refer in accordance with the norms of scientific works about the case of exploitation of others' works.
- I used all of the referred works as the references.
- I did not do any tampering in the used data.
- I did not present any part of this thesis as an another thesis at Mersin University or another university.
- I transfer all copy rights of this thesis to the Mersin University.

19 Temmuz 2018 / 19 July 2018

İmza / Signature



Burçin ÜN

## ÖZET

### FARELERDE NİKOTİN YOKSUNLUĞUNUN HİPOKAMPUS'TAKİ ETKİLERİNİN DAVRANIŞSAL VE EPİGENETİKSEL OLARAK İNCELENMESİ

İnsanlarda kronik sigara içiciliğinin bırakılması sonucunda oluşan nikotin yoksunluğu (NY) sırasında davranışsal fonksiyonların normal dışı seyrettiği sağlık problemleri görülebilmektedir. Bu olgu deney hayvanları üzerinde gerçekleştirilen araştırmalarda da bazı boyutlarıyla teyit edilmiştir. Literatürdeki deneysel çalışmalardan elde edilen davranışsal, hücresel ve moleküler düzeydeki bilgiler konunun halen önemli deneysel sorulara gebe olduğunu ortaya koymaktadır.

Çalışmamızda erkek C57BL6 farelere 12 gün boyunca günde 6 mg/kg dozunda nikotin subkutan enjeksiyonla verilmiş, en son nikotin uygulamasından 24 saat sonra yoksunluk modeli oluşturulduğu kabul edilmiştir. NY grubu farelere denk yaş ve ağırlıkta Sham grubu farelere ise aynı zaman ve şekilde serum fizyolojik enjeksiyonu uygulanmıştır. Sham grubuna kıyasla NY grubu farelerde; enjeksiyon günlerindeki vücut ağırlığı değişimleri; açık alan (ATT) ve yükseltilmiş artı labirent testleriyle (YALT) lokomotor aktivite ve anksiyete/anksiyolite durumları; akım sitometrik analizler ile hipokampus (HP) dokusunda aktif nöron oranı ve RT-PCR ile HP'da DNA metilasyon/demetilasyon ve nöral farklılaşma/aktifleşme ile ilişkili genlerinin ekspresyon seviyeleri değerlendirilmiştir.

Sham grubuna kıyasla NY grubunda vücut ağırlığı, ATT ve YALT parametreleri, akım sitometrik analizle aktif nöron oranı ve ekspresyonu belirlenen genlerin çoğunluğu açısından anlamlı bir farklılık görülmemiştir ( $p>0,05$ ). Fakat akım sitometrik olarak saflaştırılan aktif nöronların tüm olgun nöronlara oranı ayrıca Tet2 ve Arc genlerinin ekspresyon düzeylerinin, Sham grubuna kıyasla anlamlı düzeyde artmış olduğu tespit edilmiştir.

Yoksunluk oluşturduğumuzu kabul ettiğimiz hayvanlarda naif kontrollere kıyasla vücut ağırlığı, lokomotor kabiliyet, anksiyete/anksiyolite durumlarında anlamlı farklılık bulunmaması, çok yönlü sonuçlar içeren NY literatürüyle kısmen örtüşmektedir. Ayrıca, yoksunluk neticesinde HP'da aktif nöron oranının ve aktifleşen nöronlarda verimli biçimde eksprese olduğu bilinen Arc geni ekspresyonunun artması literatürle büyük ölçüde tutarlılık göstermektedir. DNA metilasyon/demetilasyon dinamiklerinin NY sırasında durumunu ortaya koyan bir araştırma görülmemiş: DNA metilasyonunu katalizleyen DNMT1/3a enzimlerini kodlayan gen ekspresyonlarının oluşturduğumuz yoksunluktan etkilenmediği, DNA demetilasyonunu oluşturan Tet1/2/3 enzimlerinden ise yalnızca Tet2'nin ekspresyonunun kontrollere kıyasla anlamlı artış gösterdiği literatürde yeni bilgilerdir.

**Anahtar Kelimeler:** Nikotin Yoksunluğu, Anksiyete/Anksiyolite, DNA metilasyon/demetilasyon Dinamikleri, Epigenetik

**Danışman:** Dr. Öğr. Üyesi Nail Can ÖZTÜRK, Mersin Üniversitesi, Anatomi Anabilim Dalı, Mersin.

## ABSTRACT

### INVESTIGATION OF NICOTINE WITHDRAWAL ON BEHAVIORAL AND EPIGENETICS EFFECTS ON HIPPOCAMPUS IN MICE

Health problems can be seen when behavioral functions are abnormally observed during nicotine withdrawal (NY) as a result of chronic cessation in humans. This phenomenon has also been confirmed in some studies on experimental animals. Behavioral, cellular and molecular level information obtained from experimental studies in the literature reveals that the subject is still conceived of important experimental questions.

In our study, male C57BL6 mice were given a subcutaneous injection of nicotine at a dose of 6mg/kg daily for 12 days, and the deprivation model was accepted to be established 24 hours after the last nicotine administration. NY group mice were given saline injections at the same time and in the same age and weight as Sham group mice. NY group mice compared to sham group; body weight changes on the days of injection; locomotor activity and anxiety/anxiolytic states with open area (ATT) and elevated plus maze test (YALT); flow cytometric analyzes and expression levels of genes associated with DNA methylation/demethylation and neural differentiation/activation in HP by RT-PCR and the ratio of active neurons in the hippocampus (HP) tissue.

There was no significant difference in body weight, ATT and YALT parameters, flow cytometric analysis, active neuron ratio, and the majority of genes whose expression was determined in NY group compared to sham group ( $p>0,05$ ). However, it was observed that the ratio of flow cytometricly purified active neurons vs. all mature neurons and the expression levels of Tet2 and Arc genes were significantly increased compared to Sham group.

The absence of significant differences in body weight, locomotor ability, anxiety/anxiolytic status compared to naïve control in the animals that accepted to be deprived were partially in agreement with the NY literature with multifaceted outcomes. In addition, the increment in the active neuron ratio in HP as a result of withdrawal and the increase in the expression of Arc gene that widely known to be abundantly expressed in active neurons, are most partially concordant with the literature. Yet, no research reveals the state of DNA methylation/demethylation dynamics in NY; but newly generated in this study that the expression of genes encoding DNMT1/3a enzymes that catalyze DNA methylation is not affected by nicotin deprivation model, plus among the three DNA demetylation catalyzers that analyzed (Tet1/2/3), only Tet2 exhibited a marked alternation, an increment in NY hippocampi as compared to the counterparts.

**Keywords:** Nicotine deprivation, Anxiety/Anxiolite, DNA methylation/demethylation dynamics, Epigenetics

**Advisor:** Nail Can ÖZTÜRK, PhD, Department of Anatomy, University of Mersin, Mersin

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca deneyimlerini ve bilgi birikimlerini paylaşarak, bana sabırla yol gösteren, her konuda desteğini gördüğüm, beni pek çok konuda aydınlatan ve en iyi şekilde yetiştirmem için elinden gelen yardımı hiçbir şekilde esirgemeyen danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Nail Can ÖZTÜRK'e tezimin hazırlanması süresince gösterdiği titizlik ve akademik katkılarından dolayı sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Akademik eğitimime yön veren, insani değerleri ve akademik kişilikleriyle de örnek aldığım başta Anatomi Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Zeliha KURTOĞLU olmak üzere, Prof. Dr. Hakan ÖZTÜRK, Doç. Dr. Alev KARA ve Doç. Dr. Deniz UZMANSEL hocalarıma her konuda yardım ve destekleri için sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım sırasında, davranış testlerini uygulamam konusunda tecrübe ve bilgi birikimiyle bana her konuda yardımcı ve destek olan MEÜ Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Dr. Öğr. Üyesi Leyla ŞAHİN hocam ve Arş. Gör. Özge Selin BATUR'a, İleri Teknoloji Eğitim Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde deneylerim süresince geç saatlere kadar bizimle çalışan ve yardımlarını esirgemeyen Öğr. Gör. Derya YETKİN'e, Öğr. Gör. Turan KOÇ'a, her türlü teorik ve teknik desteklerini sunan MEÜ Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvar'ında görev yapan Dr. Vet. Hek. Tamer YENER'e ve tüm çalışanlarına yardım ve desteklerinin yanında bu süreçte göstermiş oldukları sabır ve özveri için sonsuz teşekkür ederim.

Lisansüstü eğitimim sırasında yardımlarını hiç esirgemeyen birlikte çalıştığım Anatomi Anabilim Dalı'nda görev yapan arkadaşlarıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamı "Lisansüstü Tez Araştırma Bursu Destek Programı" kapsamında destekleyen TÜRKİYE YEŞİLAY CEMİYETİ'ne desteklerinden dolayı sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca, beni maddi ve manevi her konuda destekleyerek sonsuz emek harcayan, başta annem olmak üzere, sevgili ailem ve yakın arkadaşım Seda KOYUNGÖZLÜ'ye her zaman her koşulda yanımda oldukları için teşekkür ederim.

Bu tez çalışması; Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 2016-2-TP2-1834 nolu proje olarak desteklenmiştir. Desteklerinden dolayı teşekkür ederiz.

Burçin ÜN

Mersin, 2018

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇ KAPAK	ii
ONAY	iii
ETİK BEYAN	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
TABLolar DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
KISALTMALAR ve SİMGELER	xii
<b>1. GİRİŞ</b>	<b>1</b>
<b>2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI</b>	<b>2</b>
2.1. Nikotin	2
2.2. Nikotinin Farmakokinetik Özellikleri	2
2.3. Nikotinin Sinir Sistemi Üzerine Etkileri	2
2.4. Nikotin Yoksunluğu	3
2.5. Deney Hayvanlarında Nikotin Yoksunluğu	4
2.6. Hipokampus	4
2.7. Nikotin Yoksunluğu ve Hipokampus İlişkisi	7
2.8. Gen İfadesinin Düzenlemesi	8
2.9. Erken Cevap Genleri	9
<b>3. MATERYAL ve YÖNTEM</b>	<b>12</b>
3.1. Deney Hayvanlarının Elde Edilmesi	12
3.2. Nikotin Yoksunluğu Modelinin Oluşturulması ve Çalışmanın Aşamaları	13
3.3. Nikotin Dozunun Hesaplanması	14
3.4. Vücut Ağırlıklarının Kayıt Altına Alınması	15
3.5. Açık Alan Testi	15
3.6. Yükseltilmiş Artı Labirent Testi	16
3.7. Fare Beyinlerinden Hipokampus Dokularının Elde Edilmesi	17
3.8. Hipokampal Hücrelerin Enzimatik Yöntemle Tekli Canlı Hücre Süspansiyonlarına Ayrıştırılması	20
3.9. Akım Sitometrik Analiz	21
3.10. Akım Sitometrik Saflaştırma	24
3.11. Total RNA İzolasyonu	27
3.11.1. Akım Sitometrik Olarak Saflaştırılan Örneklerden RNA İzolasyonu	27
3.11.2. Tek Beyin Hemisferinden Elde Edilen HP Dokusundan RNA İzolasyonu	27
3.12. cDNA Sentezi	28
3.13. RT-PCR ile Gen Ekspresyon Tayini	28
3.14. İstatiksel Analiz	29
<b>4. BULGULAR</b>	<b>31</b>
4.1. Vücut Ağırlığı Değişimi	31
4.2. Açık Alan Testi İle Lokomotor Aktivite ve Stres Durumlarının Değerlendirilmesi	31
4.3. Yükseltilmiş Artı Labirent Testi Bulguları ve Davranışsal Durumların Değerlendirilmesi	33
4.4. Akım Sitometrik Analizlerin Değerlendirilmesi	34
4.5. Akım Sitometrik Saflaştırma İle Elde Edilen Nöral Alt Popülasyon Oranlarının Değerlendirilmesi	35
4.6. HP'tan Akım Sitometrik Olarak Saflaştırılan Popülasyonlardan RT-PCR ile Gen Ekspresyonu Belirlenmesi	36
4.7. HP Dokularından Direk Olarak RT-PCR İle Gen Ekspresyonu Belirlenmesi	37



	<b>Sayfa</b>
<b>5. TARTIŞMA</b>	40
5.1. Sham ve NY Grupları Arasında Vücut Ağırlığı Durumlarının Değerlendirilmesi	40
5.2. Davranışsal Testlerden Elde Edilen Bilgilerin Değerlendirilmesi	41
5.3. Akım Sitometrik Deneylerin Değerlendirilmesi	45
5.3.1. Akım Sitometrik Analizle Belirlenen Nöral Popülasyon Oranlarının Değerlendirilmesi	46
5.3.2. Akım Sitometrik Saflaştırma Verilerine Göre Belirlenen Nöral Popülasyon Oranlarının Değerlendirilmesi	47
5.4. Hipokampus Dokularından Elde Edilen Gen Ekspresyonu Verilerinin Değerlendirilmesi	49
5.5. Epigenetik Dinamiklere Ait Gen Ekspresyonu Verilerinin Değerlendirilmesi	50
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER</b>	<b>51</b>
KAYNAKLAR	52
ÖZGEÇMİŞ	63



## TABLolar DİZİNİ

	<b>Sayfa</b>
<b>Tablo 4.1.</b> Açık alan testinde Sham ve NY grubu farelerden elde ettiğimiz üç adet parametreye (% merkezde geçirilen süre, hız ve kat edilen mesafe) ait median, minimum ve maksimum değerleri, gruplar arasında Mann Whitney U testi açısından anlamlılık değerleri	33
<b>Tablo 4.2.</b> Yükseltilmiş artı labirent testinde Sham ve NY grubu farelerden elde ettiğimiz iki adet parametreye (% açık kol ve kapalı kolda geçirilen süre) ait median, minimum ve maksimum değerleri, gruplar arasında Mann Whitney U testi açısından anlamlılık değerleri	34
<b>Tablo 4.3.</b> Endojen kontrol geni Hprt'ye kıyasla hedef genlerde elde edilen dCT ekspresyon değerlerinin normalite sonuçları	38
<b>Tablo 4.4.</b> Sham ve NY HP dokuları arasında endojen kontrol geni Hprt'ye kıyasla hedef genlerde elde edilen kat ( $2^{-ddCT}$ ) cinsinden değişim ve istatistiksel olarak anlamlılık tablosu	38
<b>Tablo 5.1.</b> Nikotin maruziyeti ve yoksunluğu çalışmalarında ortaya çıkan vücut ağırlığı değişimleri ile ilgili literatür özeti	41
<b>Tablo 5.2.</b> Nikotin yoksunluğu çalışmalarında ortaya çıkan farklı davranışsal durumlar ile ilgili literatür özeti	44
<b>Tablo 5.3.</b> Nikotin maruziyeti ve yoksunluğu çalışmalarında nörogenez basamaklarında gözlenen farklı durumlar ile ilgili literatür özeti	47

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
<b>Şekil 2.1.</b> İnsanlarda sağ beyin hemisferinde HP'un yerleşimi	6
<b>Şekil 2.2.</b> İnsan beyninde HP'un yerleşimi (koronal kesit)	6
<b>Şekil 2.3.</b> İnsan beyninde HP, GD, fornix ve ilgili yapıların yerleşimi	7
<b>Şekil 2.4.</b> Rat beyninde hipokampal devreler ve yolakların görüntüsü	7
<b>Şekil 2.5.</b> Hipokampus'a bağlı bilişsel fonksiyonların altında yattığı düşünülen moleküler mekanizmalar	11
<b>Şekil 3.1.</b> Çalışma süresince C57BL6 soy erkek farelerin laboratuvar ortamında barındırılması	12
<b>Şekil 3.2.</b> Farelere subkutan enjeksiyon yoluyla nikotin ve SF uygulanması	13
<b>Şekil 3.3.</b> Çalışmamızın akım sitometrik analizlerin gerçekleştirildiği BD FACS Aria III cihazı	14
<b>Şekil 3.4.</b> Açık alan testi düzeneği	16
<b>Şekil 3.5.</b> Yükseltilmiş artı labirent testi düzeneği	17
<b>Şekil 3.6.</b> Soğuk PBS içerisine yerleştirilen beyin dokusunun görüntüsü	18
<b>Şekil 3.7.</b> Hipokampus diseksiyonunun şematik resmi	18
<b>Şekil 3.8.</b> Beyin sapı, Cerebellum, BO ve Thalamus'un beyin dokusundan uzaklaştırılması	19
<b>Şekil 3.9.</b> Hipokampus dokusunun diseksiyon aşamaları	19
<b>Şekil 3.10.</b> Kontrol 1, hücrelerin hiçbir boya ile muamele edilmediği negatif kontrol okuması (Unstained popülasyon)	22
<b>Şekil 3.11.</b> Kontrol 2, yalnızca mouse-anti-NeuN + Alexa 488 konjuge goat-anti-mouse sekonder antikor boyaları ile NeuN-immün-reaktif NeuN-(+) hücrelerin işaretlendiği kontrol boyaması	22
<b>Şekil 3.12.</b> Kontrol 3, sadece rabbit-anti-c-Fos + Alexa 633 konjuge goat-anti-rabbit sekonder antikor boyaları ile c-Fos-immün-reaktif c-Fos-(+) hücrelerin işaretlendiği kontrol boyaması	23
<b>Şekil 3.13.</b> Esas akım sitometrik okutma	24
<b>Şekil 3.14.</b> Sham grubuna ait akım sitometrik saflaştırma işlemlerinin tasarlanma ve gerçekleştirilmesine ait cihazın yazılımından alınan görüntü	25
<b>Şekil 3.15.</b> Nikotin yoksunluğu grubuna ait akım sitometrik saflaştırma işlemlerinin tasarlanma ve gerçekleştirilmesine ait cihazın yazılımından alınan görüntü	26
<b>Şekil 4.1.</b> Gruplar arasında vücut ağırlığı ortalamalarının değişimi	31
<b>Şekil 4.2.</b> Açık alan testinde toplam kat edilen mesafenin gruplar arasındaki değişimi	32
<b>Şekil 4.3.</b> Açık alan testinde gruplar arasında ortalama hız (cm/sn) değişimi	32
<b>Şekil 4.4.</b> Açık alan testinde merkezde geçirilen sürenin gruplar arası karşılaştırılması	32
<b>Şekil 4.5.</b> Yükseltilmiş artı labirent testinde açık kollarda geçirilen yüzdelerin gruplar arası karşılaştırılması	33
<b>Şekil 4.6.</b> Yükseltilmiş artı labirent testinde kapalı kollarda geçirilen yüzdelerin gruplar arası karşılaştırılması	34
<b>Şekil 4.7.</b> Sham ve NY gruplarında Pasif =% NeuN-(+)/c-Fos(-) nöronların karşılaştırılması	35
<b>Şekil 4.8.</b> Sham ve NY gruplarında Aktif =% NeuN-(+)/c-Fos(+) nöronların karşılaştırılması	35
<b>Şekil 4.9.</b> Saflaştırılan aktif nöronların tüm olgun nöronlara oranını gösteren grafik	36
<b>Şekil 4.10.</b> Akım sitometrik olarak ayrıştırılan popülasyonlar kullanılarak RT-PCR reaksiyonu sonucu yazılımın verdiği grafik	37
<b>Şekil 4.11.</b> HP dokusunda RT-PCR ile gerçekleştirilen bazı genlerin ekspresyonuna ait CT grafik görüntüleri	38
<b>Şekil 4.12.</b> Sham grubu HP dokularına kıyasla NY grubu dokularda, Hprt geni baz alındığında hedef genlerdeki değişim grafiği	39
<b>Şekil 5.1.</b> Deneysel tasarımızda gerçekleştirdiğimiz stratejik planlar	46

## KISALTMALAR ve SİMGELER

Kısaltma/Simgesi	Tanım
AD	Anabilim Dalı
AMPA	Alfa-amino-3-hidroksi-5-metilizoazol-4-propiyonik asit
APC-A	Allophycocyanin
ATT	Açık Alan Testi
BO	Bulbus olfactorius
C°	Santigrat
CA	Cornu ammonis
c-Fos	Finkel-Biskis-Jenkins murin osteojenik sarkom
CORT	Kortizol
DEHAL	Mersin Üniversitesi Deneysel Hayvanları Araştırma Laboratuvarı
DNA	Deoksiribo nükleik asit
DNMT	DNA metil transferaz enzimleri
DSM-V	Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders
ECG	Erken cevap genleri
EHN	Erişkin hipokampal nörojenesis
EK	Entorhinal korteks
FAAS	Floresan aktive akım sitometri
FSC-A	Forward Scatter Area
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FH	Formatio hippocampi
GD	Gyrus dentatus
GC	Glukokortikoid
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HP	Hipokampus
5mC	5-metilsitozin
5hmC	5-hidroksimetilsitozin
KŞT	Korku şartlanması testi
kDa	Kilodalton
LTP	Uzun süreli potansiyalizasyon
M	Molarite
MEİTAM	Mersin Üniversitesi İleri Teknoloji ve Araştırma Merkezi
MEÜ	Mersin Üniversitesi
MSTT	Morris Su Tankı Testi
mg	Miligram
µg	Mikrogram
mL	Mililitre
mRNA	Mesajcı ribonükleik asit
NeuN	Nükleer nöronal antijen
NY	Nikotin yoksunluğu
NACRs	Nikotinik asetil kolin reseptörleri
P	Popülasyon
PBS	Fosfatlı tuz tamponu
RT-PCR	Revers-Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SB	Subiculum
SSC-A	Side Scatter Area
SF	Serum Fizyolojik
YALT	Yükseltilmiş Artı Labirent Testi
ZYT	Zorunlu Yüzdürme Testi
Q	Kadran

## 1. GİRİŞ

Tüm dünyada halk sağlığını ağır biçimde tehdit eden sağlık problemlerinin başında sigara kullanımı gelmektedir [1]. Nikotin; sigaradaki en güçlü toksik bileşendir ve düzenli sigara kullanımı sonucu bağımlılığa yol açmaktadır [2]. Nikotin bağımlılığının ise kronik ve yinelenen riski yüksek olan bir bozukluk olduğu, en az 5-7 başarısız bırakma girişiminin bulunduğu belirtilmektedir [3]. Nikotin bağımlılığı gelişmiş bir bireyin nikotin alımını azaltması ya da bırakması durumunda yaşadığı yoksunluk belirtileri nikotin yoksunluğu (NY) olarak tanımlanmıştır [4]. NY'nun oluşum sürecinde beyindeki özellikle hipokampus (HP), nucleus accumbens gibi spesifik bazı bölgelerde normal nörobiyolojik işleğin değişimlere uğradığı ve bunun sonucunda depresyon, stres, anksiyete, uykusuzluk, huzursuzluk, lokomotor aktivitenin zayıflaması, öğrenme ve hafıza bozuklukları vb. bir takım davranışsal bozuklukların ortaya çıkabileceği bilinmektedir [5-9]. NY'nda meydana gelen bu değişimlerin daha derin düzeyde deneysel soruların cevaplanması gerektiği düşünülmektedir.

Öğrenme ve hafıza gibi bilişsel fonksiyonların düzenlendiği HP, aynı zamanda stres ve anksiyete gibi anormal durumların da yönetildiği bir nörobiyolojik fabrika ve yönetim merkezi gibi düşünülebilir [10, 11]. NY'nda en çok olumsuz etkilenen nörobiyolojik olaylardan birinin HP'da gerçekleşen erişkin hipokampal nörogenez (EHN) olduğu bilinmektedir [12-14]. EHN sonucunda olgun nöronlar oluşmaktadır, fakat ilk etapta bu nöronlar sinaps içermeyen pasif durumdadır, yani henüz fonksiyonel değildir. Daha sonra bu olgun ve pasif nöronların önemli bir kısmı iç ve dış etmenlerin etkisiyle sinaps yapar yani elektrofizyolojik olarak aktif nöronlara (EFAN) dönüşürler. HP'daki mikro-sinaptik ağ içerisinde işlev gören bu EFAN'lar hipokampal bağımlı oluşan birçok davranışsal fonksiyonun temelini oluşturmaktadır. Literatürde NY'nun EHN'in proliferasyon, farklılaşma ve olgunlaşma gibi çeşitli basamaklarını sekteye uğrattığını gösteren çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmalar NY'nda hücrel dönüşüm kararlarının bozulduğuna dair bilgi birikimi sunmakla birlikte, NY durumunda gerçekleşen nöronal aktifleşme mekanizma/larının altında yatan moleküler olaylar ve bu durumla ilişkili ortaya çıkabilecek farklı davranışsal durumlar göz önüne alındığında aydınlatılmayı bekleyen birçok soru bulunmaktadır. C57BL6 erkek fareler kullanılarak oluşturulan bu NY modelinde; stres durumu, HP içerisindeki nöronal aktifleşme ve altında yatan DNA metilasyon/demetilasyon dinamikleri; fizyolojik, akım sitometrik ve gen ekspresyon teknikleri kullanılarak davranışsal ve epigenetiksel bir bakış açısıyla analiz edilmiş ve yorumlanmıştır.

## 2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI

### 2.1. Nikotin

Sigara kullanımının pek çok kanser türüne sebep olduğu rapor edilmiştir [15-17]. Sigara dumanı, içeriğinde 7000'den fazla zehirli kimyasal madde barındırmasına rağmen sigara dumanının zararlı içeriğini oluşturan en önemli bileşeni nikotin olarak bilinmektedir [18].

Nikotin, doğada *Nicotiana tabacum* ve *Nicotiana rustica* olarak bilinen tütün bitkilerinin yapraklarında yüksek oranda bulunan toksitesi oldukça yüksek sıvı alkaloid bir maddedir [19].

### 2.2. Nikotinin Farmakokinetik Özellikleri

Nikotinin, ilk absorpsiyonunun solunum yolları ile akciğer alveollerinde gerçekleştiği, beyne yaklaşık 7 saniyede, tüm dokulara ise 15-20 saniye gibi kısa bir süre içerisinde hızla yayıldığı ve bu aşamada arteriyel kanda bulunan nikotinin, venöz kandakinden altı kat fazla olduğu bilinmektedir [20, 21].

Nikotin absorpsiyonu, sigara dumanının inhalasyon süresi ve derinliğine bağlı olarak farklılık göstermektedir fakat her bir sigara kullanımı sonunda duman inhalasyonu ile yaklaşık 0,5-1,5 mg nikotin insan vücuduna absorbe olmaktadır [22, 23]. İnsanlarda nikotinin yarı ömrünün yaklaşık 2 saat olduğu ve vücuda alınan nikotin miktarına göre plazmadaki nikotin seviyesinin farklılık gösterdiği belirtilmektedir [24, 25]. Nikotinin en hızlı absorpsiyonunun akciğer alveollerinde gerçekleştiği, en yavaş absorpsiyonunun ise asidik ortamı nedeniyle mide de gerçekleştiği bilinmektedir [26].

### 2.3. Nikotinin Sinir Sistemi Üzerine Etkileri

Nikotin sinir sistemini aktive eden psikoaktif bir maddedir ve bu tür keyif artırıcı etkinliği olan maddelerin düzenli olarak kullanılması zaman içerisinde bağımlılığa yol açmaktadır [27]. Yapılan araştırmalarda, düzenli olarak sigara kullanan kişilerin eroin ve kokain bağımlılığına benzer bir bağımlılık karakteri gösterdiği [28, 29], sigara ve tütün kullanımı olanlarda depresyon, anksiyete, huzursuzluk vb. psikotik bozukluklar gibi bazı psikiyatrik sorunların bunları kullanmayanlara göre daha fazla olduğu belirtilmektedir [30-33]. Uzun yıllardır gerçekleştirilen araştırmalar, nikotine bağlı ortaya çıkan bu belirtilerin önemli bir kısmının hangi beyin bölgelerinde değişimlere yol açtığının haritasını çıkarmıştır. Örneğin, akut nikotin uygulamasının, dopamin, nöröadrenalin, serotonin gibi beyin mono amino oksidazlarının salınımını değiştirdiğini ve beyinde spesifik anatomik bölgelerde (HP, nucleus accumbens,

insular korteks, corpus striatum vb) hasara neden olduğu [34-37] ve bu hasar derecesinin dozla doğru orantılı olduğu bildirilmektedir [38, 39].

#### **2.4. Nikotin Yoksunluğu**

Herhangi bir maddeye karşı bağımlılık gelişmiş kişilerde bağımlılığın psişik ve fiziksel (fizyolojik) bağımlılık olmak üzere iki durumu ayırt edilmektedir. Bağımlının, madde kullanımını sürdürme arzusu psişik bağımlılık olarak ifade edilirken, madde kullanımının kesildiği zaman bağımlının madde arama davranışı fizyolojik bağımlılık olarak tanımlanmıştır. Fizyolojik bağımlılığın en belirgin göstergesi ise, yoksunluk sendromu olarak bilinmektedir [40].

Nikotine bağımlı kişilerde, nikotin kullanımını bıraktıktan veya azalttıktan sonra gelişen duysal, bilişsel ve somatik yoksunluk belirtileri NY olarak ifade edilmektedir [8]. NY'nun sigara kullanan kişilerde, sigaranın günlük içilme sıklığı ve ne kadar süredir kullanıldığına bağlı olarak haftalar veya aylar boyunca devam edebileceği belirtilmektedir [41]. NY'nun genellikle son nikotin maruziyetinden 2-3 saat sonra oluşmaya başladığı 24-48 saat içerisinde ise, zirveye çıktığı bilinmektedir [42]. NY'da en sık görülen bulguların şiddetli bir açlık hissi, stres, anksiyete, konsantrasyon güçlüğü, uyku bozuklukları, kalp hızının ve kan basıncının düşmesi, iştah artışına bağlı olarak vücut ağırlığı artışı, motor aktivitede azalma, depresyon ve kas gerginliğinde artış olduğu bilinmektedir [43, 44]. Nikotin kullanımının bırakılması veya azaltılmasından sonra bu bulgulardan en az dördünün ortaya çıkması, DSM-V (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders) zihinsel hastalıkların tanı ölçütüne göre; NY kriteri olarak sayılmaktadır ve bu klinik bulguların toplumda önemli sorunlara neden olabileceği düşünülmektedir [45].

Yapılan bir çalışmada, sigarayı bırakan kişiler bir yıl boyunca izlenmiş, süre sonunda elde edilen bulgularda vücut ağırlığı değişimi ve sinirlilik durumunun halen devam etmekte olduğu; NY'nun, fazla sigara kullanan kişilerde daha az sigara kullanan kişilere kıyasla oldukça şiddetli seyrettiği bildirilmiştir [46]. NY'nun beyinde nörotransmitter seviyeleri, nikotinic asetil kolin reseptörleri (nAChRs) yoğunluğu, nörotrofik faktörlerin ekspresyonlarında ve kortikosteron plazma konsantrasyonlarında değişimlere yol açtığı [47-49] bu nedenle insanlarda; duygu durumu, motivasyon, öğrenme ve hafıza gibi çeşitli bilişsel davranışları etkileyebileceği düşünülmektedir [50-52]. Araştırmalar, NY sonucunda ortaya çıkan stres, anksiyete, depresyon, sinirlilik ve uykusuzluk gibi bir takım davranışsal sorunlardan kaçınmak için insanların sigara içme davranışını sürdürdüğü ve bu nedenle sigara kullanımının yeniden nükseden bir davranış olduğu ileri sürülmektedir [53-55].

## 2.5. Deney Hayvanlarında Nikotin Yoksunluğu

İnsanlarda gelişen NY'nun pek çok belirtisi, kemirgenler üzerinde de deneysel nikotin bağımlılığı ve NY modeli oluşturularak incelenebilmektedir. Literatürde kemirgenlerde NY modeli oluşturulması değişkenlik göstermektedir. Kemirgenlere, farklı doz ve uygulama yöntemleriyle (ozmotik mini pompa (omp), subkutan, transdermal, oral, intraperitoneal vb) akut veya kronik nikotin uygulamaları gerçekleştirilmiş, bu uygulamaların sonlandırılmasıyla birlikte insanlarda görülen duyuşsal, somatik ve bilişsel yoksunluk belirtilerinin hayvanlarda da geliştiği gözlenmiştir [56-59]. Kemirgenlerde en sık gözlenen somatik belirtiler; bruksizim (diş gıcırdatma), dispne (solunum güçlüğü), pitozis (gözkapağı düşüklüğü), kas seğirmesi, göz kırpma, titreme ve huzursuzluk olarak bilinmektedir [60]. Yoksunluğun şiddetine göre ise bu belirtilerin sıklığı arttığı belirtilmektedir [61]. Nikotin uygulamasının sonlandırıldığı durumlarda ortaya çıkan bu davranışsal semptomlar takip edilerek yoksunluk durumunun zirve yaptığı zaman aralıkları belirlenebilmekte (uygulanan doz miktarına, süresi ve şekline göre farklılıklar göstermektedir) ve NY modellemeleri yapılmaktadır [47-50, 56]. Yoksunluk durumunda davranışsal durumların değerlendirilmesinin yanında kanda kortikosteron ve kortizol seviyeleri analiz edilerek ortaya çıkabilecek stres durumlarının dereceleri ve ortaya çıktığı zaman aralıklarının belirlendiği bildirilmektedir [62]. Tüm bu bilgiler ışığında literatürde oldukça geniş ölçekte farklı NY çalışmaları bulunmaktadır [9, 48, 63-65].

Yukarıda bahsedilen belirtilere ek olarak, kemirgenlerde, NY'na bağlı ortaya çıkan stres, anksiyete, anksiyolite ve depresyon gibi bozukluklar çeşitli davranışsal testlerle de kısmen ölçülebilmektedir. Söz konusu bozuklukları ölçmek için en sık kullanılan testler; Açık Alan Testi (ATT), Yükseltilmiş Artı Labirent Testi (YALT), Zorunlu Yüzdürme Testi (ZYT) ve Korku Şartlanması Testi (KŞT)'dir [48, 51, 60, 65 ].

## 2.6. Hipokampus

Limbik sistem, öğrenme ve hafıza fonksiyonları açısından oldukça önemli olan formatio hippocampi (FH); HP, gyrus dentatus (GD), subiculum (SB) ve entorhinal korteks (EK)'i içeren primitif kortikal bir yapıdır [66].

İnsan beyninde lobus temporalis'in derinine yerleşmiş olarak bulunan HP, ventriculus lateralis'in cornu inferius'unun tabanı boyunca uzanan yaklaşık 5cm uzunluğunda limbik sistemin en önemli oluşumlarından biridir (Şekil 2.1). İnsanlarda fissura choroidea'nın dış kısmından gelişen HP, bu bölgede gelişmiş olan nöral progenitörlerin çoğalıp göç etmesi ve

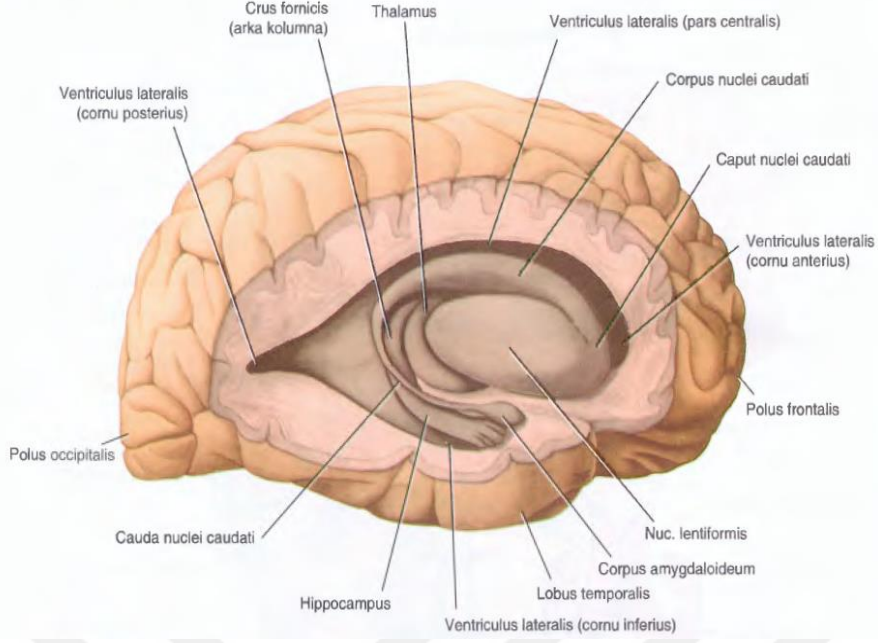


ventrikül duvarının medial'ine doğru giderek kalınlaşan bir çıkıntı oluşturması sonucu meydana gelmektedir [67, 68].

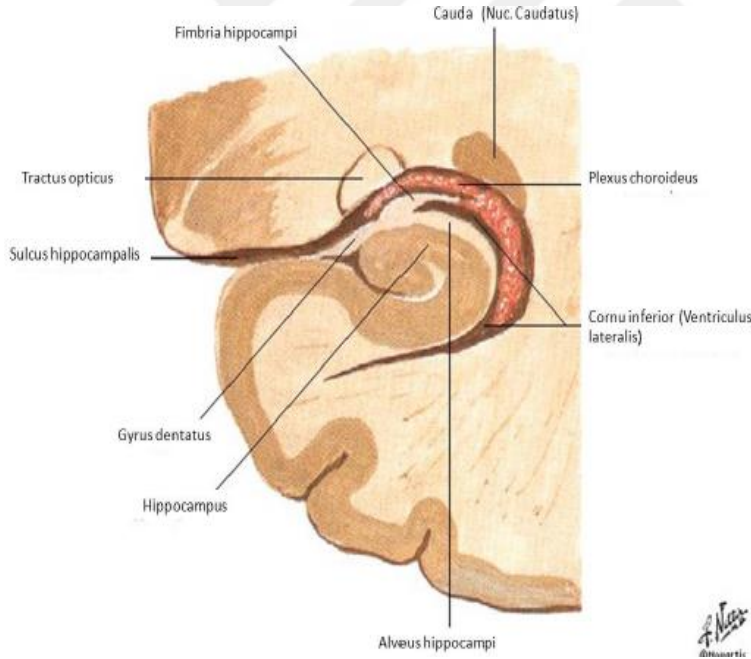
Hipokampus, içe doğru katlanarak Cornu Ammonis (CA) bölgelerini (CA1,CA2,CA3) oluşturan ve GD olarak uzanan iki laminadan oluşmaktadır ve bu morfolojik yerleşmeden dolayı koronal beyin kesitlerinde C harfi şeklinde görüldüğü bilinmektedir [68] (Şekil 2.2). Ayrıca, *Pes hippocampi* olarak isimlendirilmiş geniş bir ön uca sahiptir ve burada bulunan çıkıntılar *digitationes hippocampi* olarak isimlendirilmektedir [69, 70].

Hipokampus'un ventriküler yüzeyi konveks olup ependim hücreleri ile örtülmüş durumdadır ve burada hipokampal aksonların oluşturduğu *alveus* denilen beyaz cevher tabakası yer almaktadır. Ependim hücrelerinin altında yerleşmiş olarak bulunan *alveus*'un lifleri ise medial'e doğru bir araya gelerek hipokampal aksonların izlediği ana efferent yolu (fornix) oluşturmaktadır [71, 72](Şekil 2.3).

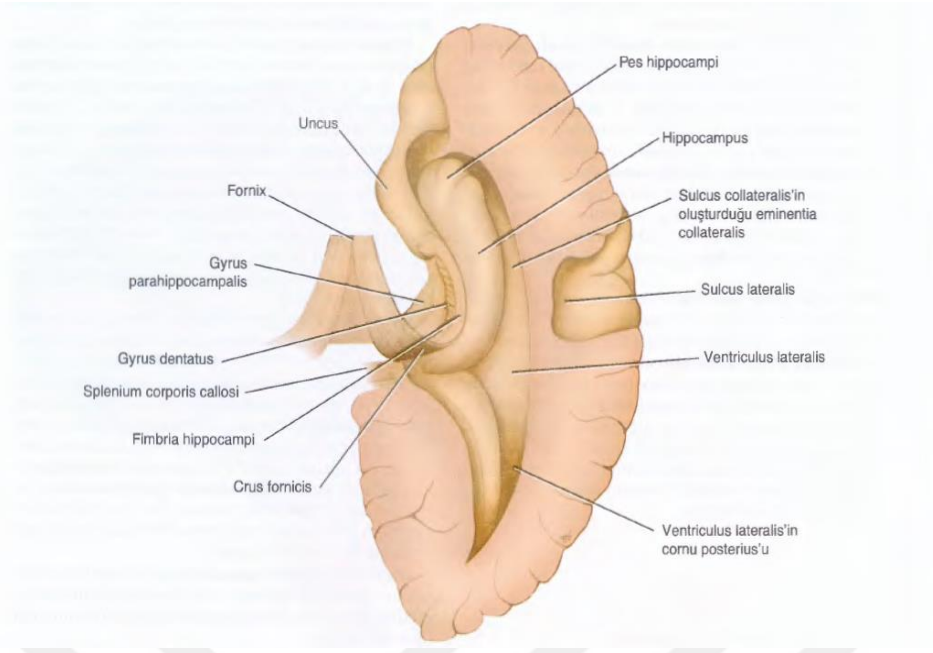
Hipokampus'ta düzenlenen fonksiyonların işlerliğini sağlayan en temel hücresel işleyiş EHN olarak bilinmektedir. EHN; HP'un GD'unun subgranüler tabakasında kök hücrelerin olgun nöronlara dönüştüğü adeta bir nöronal fabrikasyon süreci olarak iş gören ve öğrenme, hafıza gibi davranışsal durumların gerçekleşmesinde görevli yolaklarda esas rolü üstlenecek fonksiyonel nöronların aktifleşmesi olarak sonuçlanan bir hücresel farklılaşma basamakları bütünü olarak tanımlanmıştır [73-75]. Bunun yanı sıra, HP'un bağlantı oluşturduğu yapılar ile ilişkisi oldukça önemlidir. EK'ten perforant lifler ile tek yönlü iletilen sinyaller; GD'da sinaps yapmakta, GD'dan CA3 bölgesine mossy lifleri ile yönlendirilmektedir (Şekil 2.4). Bu bölgeden ise karşı tarafa yönlendirilen kommissural lifler schaffer kollateral yolağını oluşturarak CA1 bölgesinde sonlanmaktadır. HP ve bu yolakların öğrenme ve bellek gibi davranış fonksiyonları üzerinde etkili olduğu bilinmektedir [76-78].



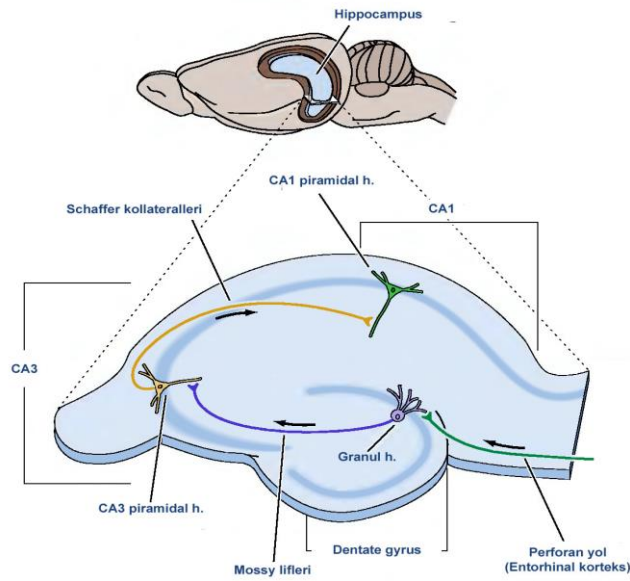
Şekil 2.1. İnsanlarda sağ beyin hemisferinde HP'un yerleşimi [79].



Şekil 2.2. İnsan beyininde HP'un yerleşimi (koronal kesit) [80].



Şekil 2.3. İnsan beyinde HP, GD, fornix ve ilgili yapıların yerleşimi [79].



Şekil 2.4. Rat beyinde hipokampal devreler ve yolakların görüntüsü [81].

## 2.7. Nikotin Yoksunluğu ve Hipokampus İlişkisi

Hipokampus, beyinde her biri önemli işlevlere sahip olan; cortex cerebri, amigdala, hipotalamus ve corpus mamillare gibi hareketlerin davranışlara dönüştürülmesinde etkili olan temel limbik sistem bölgeleriyle sayısız ama dolaylı pek çok bağlantı göstermekte ve böylece davranışların düzenlenmesinde rol oynamaktadır [82]. Ayrıca her türlü duyuşsal uyaran HP'ü aktive etmektedir. Bu nedenle HP, öğrenme ve hafıza gibi normal; stres, anksiyete, anksiyolite ve depresyon gibi patolojik davranışsal durumların düzenlendiği en önemli merkezlerden birisi olarak kabul edilmektedir [83, 84]. Hem insanlarda hem de kemirgenlerde NY'da gelişen semptomların çeşitliliği göz önüne alındığında, HP'un yoksunluk durumundan etkilenen önemli anatomik oluşumlardan biri olduğu bilinmektedir [8].

Literatürde akut ve kronik nikotin kullanımının davranış fonksiyonları üzerinde farklı etkilere neden olduğu bildirilmektedir. Örneğin; sigara kullanımına yeni başlayan bireylerde, nikotinin sürekli dikkat gerektiren işlerde performansı arttığı fakat düzenli kullanım sonucunda nikotine karşı gelişen tolerans ile bu etkinin giderek azaldığı belirtilmektedir [85]. Bununla birlikte sigara kullanan insanların stresli olduklarında daha fazla sigara tükettiği, stresin insanlarda sigara içme davranışında önemli bir faktör olduğu belirtilmektedir [86]. Sigara kullanımını bırakan bireylerin incelendiği çalışmalarda, NY yaşayan bireylerde gelişen davranış bozukluklarının durumu: nikotin maruziyetinin süresi, şiddeti (ağır ya da hafif) vb. faktörlere bağlı olarak çeşitlilik göstermektedir [87-88]. Deneysel hayvan çalışmalarında ise, hipokampal fonksiyona dayanan öğrenme ve hafıza gibi önemli bilişsel süreçlerin, akut ve kronik nikotin maruziyetinin etkilerine karşı oldukça duyarlı olduğu gözlenmiştir [84]. Kemirgenlerde akut veya kronik nikotin maruziyetinin sonlandırılmasının ardından NY'na bağlı olarak ortaya çıkan stres ve anksiyete vb. gibi bilişsel bozuklukların HP'a bağlı öğrenme ve bellek fonksiyonlarını değiştirdiği bildirilmektedir [89-91]. HP'un öğrenme ve bellek fonksiyonları üzerindeki rolü, hipokampal nöronlarda gerçekleşen uzun süreli potansiyalizasyon (LTP) ile açıklanmaktadır [92]. Bugün yapılan pek çok çalışmada, NY'da ortaya çıkan bu bozuklukların LTP'a zarar verdiği ve böylece HP'ta gerçekleşen gen transkripsiyon dolayısıyla gen ekspresyon mekanizmalarını etkileyerek söz konusu davranış fonksiyonlarının temelini oluşturan EHN'de değişikliklere neden olabileceği ileri sürülmektedir [93-95].

## 2.8. Gen İfadesinin Düzenlenmesi

Tüm canlı organizmalar için kalıtım materyali olan DNA'nın, her hücredeki dizisi aynı olmasına rağmen hücrelerin şekil ve fonksiyonel açıdan farklılaşarak birbirlerinden ayrıldığı bilinmektedir [96]. Hücrelerin çoğalması ve farklılaşması için gen ekspresyon mekanizmalarının

belirli bir düzende işlemesi gerekmektedir. Hücrelerin fonksiyonlarına göre bazı genlerin açık (aktif) bazı genlerin ise kapalı (pasif) konumda olduğu bilinmektedir. Canlılık devam ettiği sürece her bir proteini kodlayan genin, çeşitli hücrel ve moleküler mekanizmalar ile transkripsiyon durumu devamlı olarak kontrol altındadır. Örneğin; pasif ya da diğer bir söylemle uyku halindeki nöronların aktif moda geçmeleri çevredeki diğer nöronların uyarısıyla gerçekleşebilmektedir [97, 98]. Burada önemli olan, hücreye gelen uyarının; protein üretimi, hormonlar ve nörotransmitter gibi maddelerin açığa çıkması için gerekli olan kimyasal tepkimelerin başlatılmasını sağlayan enzimlerin üretilmesini sağlamasıdır [99, 100].

Hücre çekirdeğinde DNA ve bazik proteinden (histon) meydana gelmiş nükleoprotein kompleksi kromatini oluşturmaktadır [101]. Kromatin yapısı ise; yüksek oranda yoğunlaşan ve esas olarak inaktif genleri içeren heterokromatin ile nispeten az olan ve aktif genlerin çoğunu içeren ökromatin olarak ikiye ayrılmaktadır [102]. Yapılan çalışmalar, epigenetiksel mekanizmaların gen ifadesinin düzenlenmesi için önemli ipuçları sunduğunu ortaya koymaktadır. Bugün en iyi bilinen epigenetiksel mekanizmalar DNA metilasyon/demetilasyon ve çeşitli histon modifikasyonları olarak bilinmektedir [103, 106].

DNA metilasyon/demetilasyon döngüsünün, normal (gelişim, hücrel göç ve farklılaşma vb) ve patolojik (kanser, gelişimsel bozukluklar vb) biyolojik işleyiş üzerinde kilit öneme sahip epigenetik mekanizmalardan olduğu bilinmektedir [107, 108]. Basit bir ifadeyle, DNA metilasyonu, DNA metil transferaz enzimlerinin (DNMT) DNA'nın 5 ucundaki karbon grubuna (5C) bir metil grubu eklenmesi (5 metilsitozin-5mC) işleminin katalizlendiği bir kovalent modifikasyon olarak bilinmektedir [109]. Öte yandan, Ten Eleven Translocation (Tet1/2/3) ailesi enzimleri 5mC'ni oksidatif yolla 5 hidrosimetilsitozine (5hmC) çevirerek metile olmuş DNA'yı aktif bir şekilde demetilasyona uğratabilmektedir [110]. 5mC'nin varlığı kromatinin paketlenmesi (heterokromatin) ve ilgili kromatin bölgesindeki transkripsiyonel aktivitenin baskılanması (Transcriptional Repression) ile karakterize olduğu, 5hmC'nin ise paketlenmiş (heterokromatin) durumdaki kromatini açarak ökromatine dönüştürdüğü, böylece pasif durumda bulunan gen ekspresyonlarının aktifleştiği bilinmektedir [110, 111]. Ayrıca (Tet1/2/3=5hmC; DNMT1/2/3a/3b/3L=5mC) enzim ailelerinin ayrı ayrı DNA'nın 5mC ve 5hmC hallerini katalizleyebilme fonksiyonuna sahip olduğu bilinmekle birlikte, bu genlerin manipüle edildiği çalışmalarda her bir genin hücrel farklılaşma aşaması, farklı yaşamsal evre vb. durumlardaki davranışlarının değişkenlik gösterdiği anlaşılmıştır. Örneğin: fetal beyin gelişimi için DNMT1 geninin nöral gelişim için olmazsa olmaz işleve sahip olduğu gözlenirken, DNMT3a geninin bu evrede baskılanmış olduğu fakat postnatal beyin gelişimi sırasında bunun tam tersinin olduğu gözlenmiştir [112]. Literatür Tet enzimlerine ait de benzer mukayeseler içermektedir. DNA metilasyon çalışmalarında gelinen noktada artık 5mC/5hmC'nin öneminden

öte bu iki temel epigenetik faktörün kanser ve birçok hastalıkla çok yakından ilişkisi olduğu gösterilmiştir [113, 114].

## 2.9. Erken Cevap Genleri

Yaşamımız boyunca edindiğimiz her duyuşsal deneyim, beynin düzgün gelişimi ve nöral plastisite için oldukça önemlidir [115]. Beyin; madde bağımlılığı, madde yoksunluğu, stres, heyecan, korku vb. gibi dışarıdan gelen uyarılara adaptasyon ya da cevap oluşturabilme özelliğine sahiptir. Örneğin, nikotin maruziyetinin HP'un düzenlediği normal fonksiyonları olumsuz yönde etkileyerek çeşitli derecelerde sağlık problemlerine yol açtığı [9, 116, 117], benzer şekilde stresin ileri yaş dönemlerinde depresyon ve anksiyete başta olmak üzere çeşitli davranışsal bozukluklara neden olduğu belirtilmektedir [118-120].

Canlıların stres gibi dışarıdan gelen herhangi bir uyarana karşılaşması, davranışları oluşturmaya yönelik enerjileri harekete geçiren fizyolojik değişimlerin başlamasına neden olmaktadır [121]. Basit bir ifadeyle bu süreç, belirli duyuşsal uyarıların ilgili nöral devrelerde nöronal aktivasyonu başlatması ve böylece aktifleşen nöronların hücre dışı sinyalleri olarak bir cevap oluşturmaya dayanır [115].

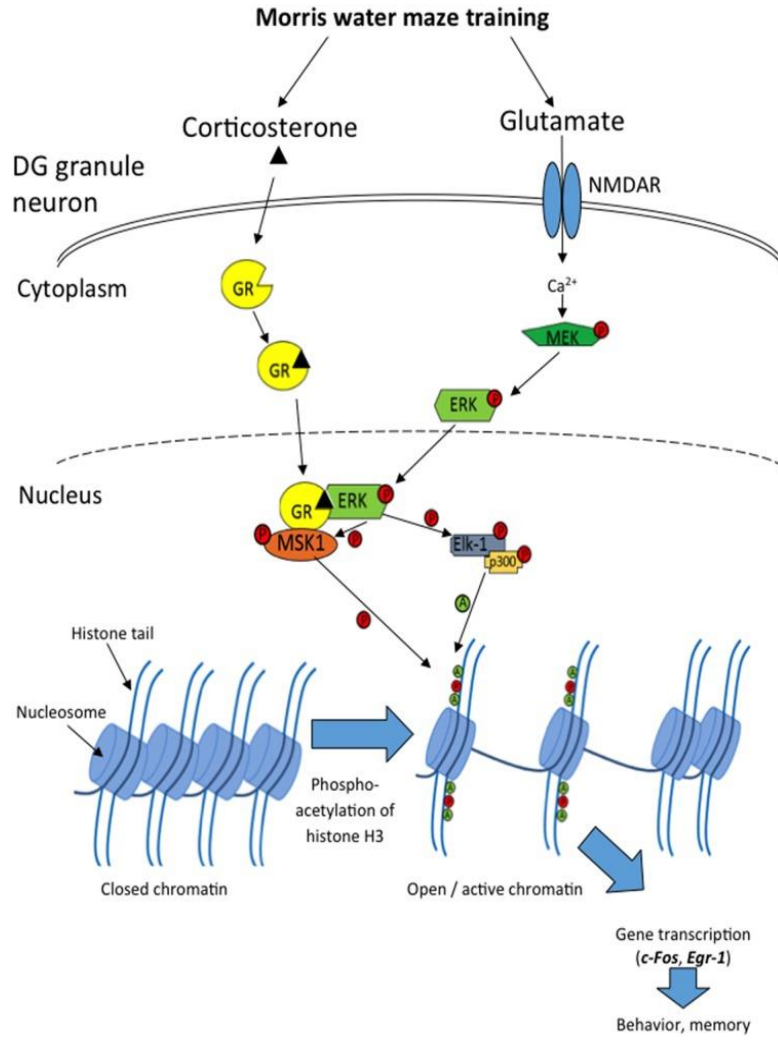
Stres durumunda hipotalamo pitüiter adrenokortikal (HPA) aktivasyon artışına bağlı olarak açığa çıkan adrenokortikotropik hormonun (AHT), adrenal bezleri uyarılmasıyla kanda stres hormonu olarak bilinen kortizol (KORT) seviyesi artmaktadır [122]. KORT'un kan beyin bariyerlerini geçerek, glikokortikoid (GK) reseptörlerine bağlandığı ve böylece limbik sistemde her biri önemli işlevlere sahip olan; HP, amigdala ve prefrontal kortekside içeren nöronların aktivasyonunu (nöronların uyarılır olması, nöronal ateşleme (nöronal firing) vb durumları) başlattığı bilinmektedir [123, 124].

Stres ve strese bağlı olayların uzun dönemde etkilerinin açığa çıkmasını hücre içi gen transkripsiyon sisteminde oluşan değişikliklerin yönettiği düşünülmektedir [125]. Bu hücreşel değişikliklerin ise, erken cevap genleri (ECG- Immediate Early Genes ) olarak tanımlanmış bir grup transkripsiyon faktörünün stres, heyecan, korku vb gibi durumlarda hızla transkripsiyona uğraması ve devamında ilgili proteinlerin sentez edilmesi yani eksprese edilmesine bağlı olduğu keşfedilmiştir [126, 127]. Herhangi bir hücreşel uyarana karşı çok kısa bir süre içerisinde cevap oluşturan bu genlerin uyarılması; kısa dönemde nörotransmitter, peptit ve reseptör seviyelerinde değişikliğe neden olurken, uzun dönemde yapışel değişikliklere neden olmaktadır [128].

Erken cevap genlerinin transkripsiyonu ile ilişkilendirilen stresin; hipokampal bağımlı bellek fonksiyonlarının altında yatan moleküler mekanizmalarda oluşturduğu değişiklikler, sıçanlarda morris su tankı testi (MSTT) kullanılarak yapılan bir çalışmada incelenmiştir. MSTT

sonunda; NMDA (N-metil-D-aspartat) reseptörlerinin harekete geçmesi nöronlarda MAPK/ERK (Mitojenle aktive edilmiş kinaz/ dış sinyal düzenleyici kinaz ) sinyal yolağının aktivasyonunu ve böylece nükleusta ERK1/2'nin fosforilasyonunu (pERK 1/2) başlattığı bildirilmektedir. Bir yandan GC'nin nükleer kinazların (MSK1 ve Elk-1) aktivasyonunu başlattığı ve bunun sonucunda; pERK1/2 ile nükleusta etkileşime girdiği, daha sonra ise epigenetiksel mekanizmalar (histon H3'te serin-10 fosforilasyonu ve lizin-14 asetilasyonu) uyarılarak kromatin yapısının açıldığı bilinmektedir [129](Şekil 2.5).

Yapılan çalışmalara göre, ECG'leri; Jun (C-Jun, JunB, JunD), Fos (c-Fos, FosB) ve Krox (Krox20, Krox24) olarak sınıflandırılmaktadır. Bu sınıfta tanımlanan ilk proto-onkogen, hücrel işlevler yönünden ana anahtar olarak tanımlanan Fos grubuna ait olan c-Fos genidir. c-Fos geninin, nükleer bir transkripsiyon faktörü olarak hücre çoğalması ve hücre farklılaşması sırasında gen ekspresyonlarının düzenlenmesinden sorumlu olduğu bilinmektedir [130, 131]. Sinir sisteminde, c-Fos geninin nöronal aktifleşme belirteci olduğu kabul edilmektedir fakat araştırmalar, bu genlerin aktif nöronların belirteci olmasının dışında nöral plastisitenin sağlanması ve hafıza oluşumunun düzenlenmesi gibi önemli bilişsel işlevlerde de görev aldığını belirtmektedir [132, 133].



**Şekil 2.5.** Hipokampus'a bağlı bilişsel fonksiyonların altında yattığı düşünülen moleküler mekanizmalar [129].



### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

Bu tez çalışması, Mersin Üniversitesi (MEÜ) Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı'nın 23.02.2016 tarihinde 52602694-050/E.43172 nolu onay raporu ile yürürlüğe girmiştir. Çalışmamızda deney hayvanı modeli oluşturulması, gerekli dokuların elde edilmesi ve dokuların kullanım aşamasına kadar muhafaza edilmesi işlemleri, MEÜ Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvar'ı (DEHAL) ile MEÜ Anatomi Anabilim Dalı (AD) Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir. Çalışmamızın esas tasarısını oluşturan NY modelinin, davranış testleri ile değerlendirilmesi MEÜ Fizyoloji AD Davranış Laboratuvarı'nda, akım sitometrik ve Revers-Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) ile gen ekspresyon analizleri ise MEÜ İleri Teknoloji ve Araştırma Merkezi'nde (MEİTAM) gerçekleştirilmiştir.

#### 3.1. Deney Hayvanlarının Elde Edilmesi

Çalışmamızda, DEHAL'den elde edilmiş olan 44 adet 60 günlük C57BL6 soy erkek fareler kullanılmıştır. DEHAL'den resmi olarak teslim alınan fareler, MEÜ Fizyoloji AD Davranış Laboratuvar'ına taşınmış ve deneyler başlamadan önce bir hafta süre ile bu yeni ortama alışmaları sağlanmıştır. Bu laboratuvarda, alıştırma ve asıl deneylerin gerçekleştirildiği tüm süreçler boyunca deney fareleri 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık döngüsünde, uygun nem ve sıcaklık (22-25°C) koşullarının kontrolü altında barındırılmıştır. İçme suları kafeslerinin üzerine hayvanların erişebileceği şekilde yerleştirilmiş ve herhangi bir kısıtlama uygulanmamıştır. Hazır pellet yem kullanılmış ve haftada 2 gün farelerin barındıkları kafesler temizlenmiştir. Alıştırma süreci boyunca deney fareleri tek bir deneyci tarafından günde iki kez kafeslere müdahale edilmeden izlenmiştir (Şekil 3.1).



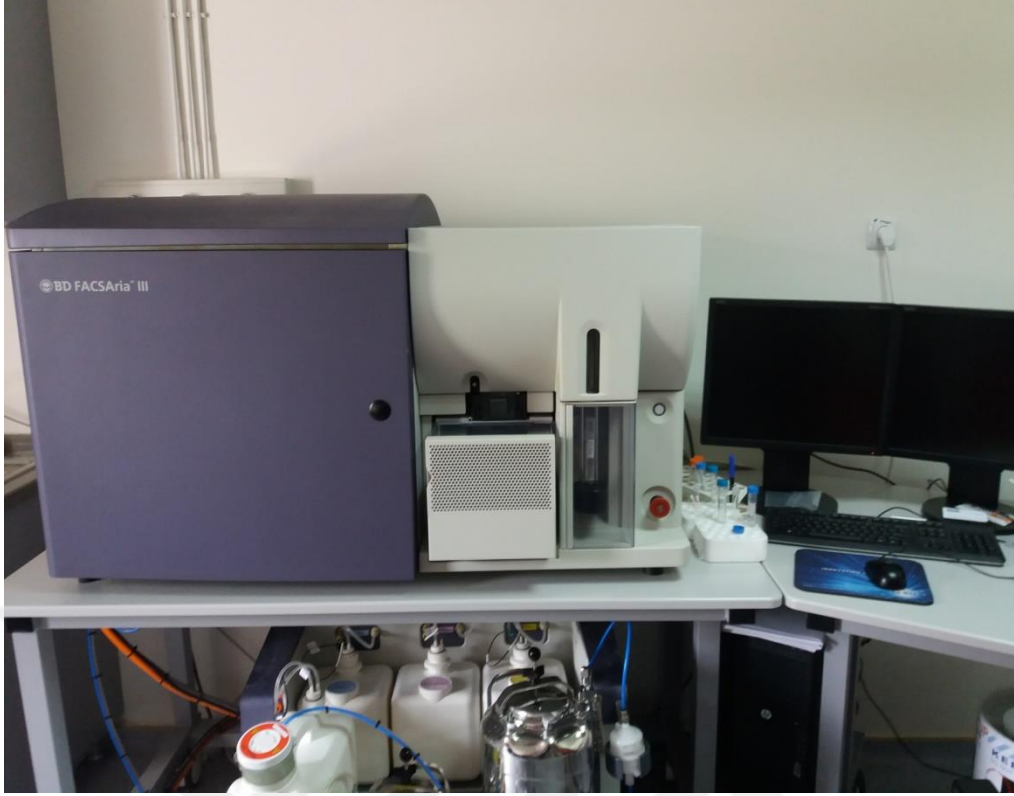
Şekil 3.1. Çalışma süresince C57BL6 soy erkek farelerin laboratuvar ortamında barındırılması

### 3.2. Nikotin Yoksunluğu Modelinin Oluşturulması ve Çalışmanın Aşamaları

Çalışmamız, NY ve Sham olmak üzere iki ana grubu içermektedir. NY grubu farelere 12 gün boyunca her gün vücut ağırlıklarına göre her seferinde 2 mg/kg dozunda olmak üzere günde üç kez serum fizyolojik (SF) içerisinde çözdürülmüş nikotin solüsyonu subkutan enjeksiyon yoluyla verilmiştir (Şekil 3.2). Sham grubuna ise 12 gün boyunca NY grubuna uygulanan enjeksiyon saatlerine eş olacak şekilde her gün toplam üç kez SF solüsyonu enjekte edilmiştir. Enjeksiyon uygulamaları laboratuvarın aydınlık evresinde saat 09.00, 12.00 ve 15.00 saatlerinde gerçekleştirilmiştir. Son nikotin ve SF enjeksiyon uygulamalarından (12. gün) 24 saat sonra yoksunluk oluşturulduğu varsayılmıştır [56]. NY'nun farelerde oluşturabileceği stres, anksiyete vb. normal dışı durumların davranışsal olarak test edilmesi için aynı laboratuvarda bulunan ATT ve YALT testlerinin uygulamalarına başlanmıştır. Davranışsal testlerin uygulanmasının ardından uygun anestezi altında HP dokuları diseke edilmiş ve elde edilen HP dokuları akım sitometrik analizlerde kullanılmak üzere diasosiyasyon işlemine alınmıştır. Çalışmamızın akım sitometrik analizleri için MEİTAM'da bulunan BD Facs Aria III cihazı kullanılmıştır (Şekil 3.3).



**Şekil 3.2.** Farelere subkutan enjeksiyon yoluyla nikotin ve SF uygulanması



**Şekil 3.3.** Çalışmamızın akım sitometrik analizlerinin gerçekleştirildiği BD FACS Aria III cihazı

### 3.3. Nikotin Dozunun Hesaplanması

Çalışmamızda NY grubu farelere 2 mg/kg dozunda sıvı nikotin solüsyonu ve Sham grubu farelere ise ona denk hacimde serum fizyolojik sıvısı günde üç kez subkutan enjeksiyon yoluyla verilmiştir. Nikotin dozu hesaplanmadan önce tüm farelerin vücut ağırlıkları ölçülmüştür. Ölçüm sonucuna göre, 12 günlük deney süresince tüm farelerin ortalama 22,5 gram ağırlığında olduğu kabul edilerek nikotin dozu hesaplanmıştır. Her bir fareye tek seferde 2 mg/kg dozunda nikotin solüsyonu 1 dizyem (100 µl) hacim içerisinde enjekte edilmiştir.

2 mg/kg doz için; 22,5 gram bir farenin alması gereken nikotin miktarı 0,045 mg olarak hesaplanmıştır. Çalışmamız için ticari olarak elde ettiğimiz nikotin solüsyonu, 98 µl olup içinde 100 mg nikotin içermektedir. Buna göre bu solüsyonun 0,044 µl hacminde 0,045 mg nikotin olduğu hesaplanmıştır. Söz konusu hacimdeki nikotin solüsyonuna 99,956 µl hacminde steril serum fizyolojik solüsyonu ekleyerek bir fareye tek seferde vereceğimiz 100 µl hacimde ve 2mg/kg dozunda nikotin solüsyonu elde edilmiştir. Fakat söz konusu hacimlerin küçüklüğü ve 12 gün boyunca her gün 22 fareye nikotin uygulaması yapılacağı düşünüldüğünde ilgili solüsyonun çoklu hazırlık aşamalarındaki hata payının yüksek olabileceği öngörüldüğünden dolayı, tek seferde tüm deneyler için gerekli olan (12 gün X 22 fare X günde 3 kez) nikotin solüsyonu hazırlanmıştır.

Bunun için, ticari olarak elde ettiğimiz nikotin solüsyonundan;

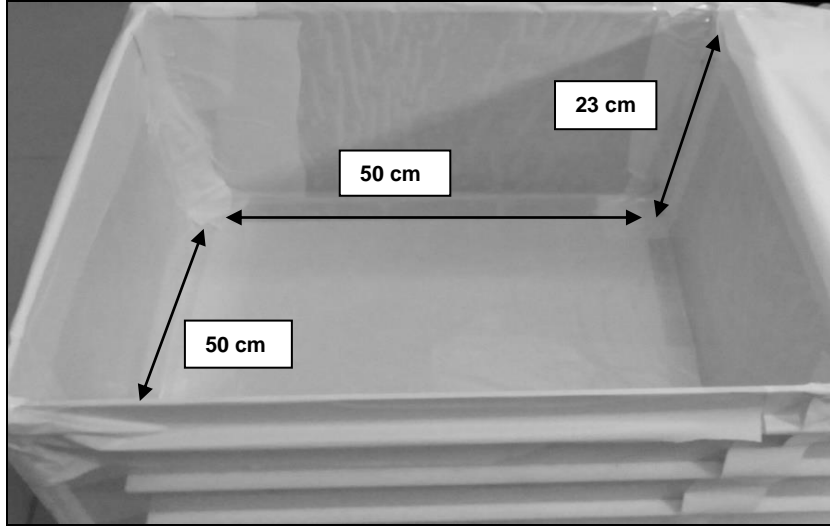
12 gün X 22 fare X günde 3 kez X 0,044 µl = 34,848 µl hacminde nikotin solüsyonu uygun bir mikro pipet aracılığıyla çekilerek; üzerine 12 gün X 22 fare X 3 kez X 99,956 µl = 79165.152 µl serum fizyolojik solüsyonu eklenmek suretiyle nikotin solüsyonu hazırlanmıştır. Tüm bu işlemler steril koşullarda gerçekleştirilmiş, ortam her defasında %70'lik alkol ile temizlenmiştir. Hazırlanan bu ana stoktan her 3-4 deney gününde bir yeteri miktarda solüsyon 5mL'lik steril 50mL'lik tüp içerisine alınıp daha sonra her deney günü steril insülin enjektörlerine 1 dizyem (100µl = 0,1cc = 0,1mL) çekilerek farelere subkutan enjeksiyon yoluyla verilmiştir. Sham grubu farelerine ise; NY grubu farelere denk olarak her bir uygulamada 1 dizyem hacmindeki SF solüsyonu aynı yöntemle uygulanmıştır. Deney süresince her bir farenin subkutan enjeksiyonu her seferinde yeni ve steril insülin enjektörü kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

### **3.4. Vücut Ağırlıklarının Kayıt Altına Alınması**

Çalışmamızda NY ve Sham grubu farelerin vücut ağırlıkları 12 günlük deney süresince her gün ilk enjeksiyon uygulamalarından önce (saat 08.30-09.00) ölçülerek elektronik ortamda düzenli olarak kayıt altına alınmıştır. Vücut ağırlığının ölçümünde kullanılan hassas terazinin her kullanımdan önce kalibrasyonu kontrol edilmiştir.

### **3.5. Açık Alan Testi**

Çalışmamızda, NY ve Sham grubu farelerin stres ve lokomotor aktivite kabiliyetlerini değerlendirebilmek için MEÜ Fizyoloji AD Davranış Laboratuvarı'nda bulunan düzenek kullanılmıştır. Üstü açık kare şeklindeki platformun tabanının bir kenarının uzunluğu 50 cm ve yan duvarların yüksekliği 23 cm ölçülerinden oluşup, beyaz opak pleksiglastan yapılmıştır (Şekil 3.4). ATT'ne başlamadan bir gün önce fareler platforma serbest bir şekilde bırakılarak 5 dakika ortamı keşfetmelerine izin verilmiştir. Deney aşamasında çalışmaya alınan her bir fare düzeneğe merkez bölgeden bırakılarak 10 dakika süreyle teste tabi tutulmuş, her bir farenin kat ettiği toplam mesafe (cm), hızı (cm/sn) ve merkezde geçirdikleri süre (sn) Noldus Ethovision XT (Version 4) kayıt sistemi ile kayıt altına alınmıştır. Düzenek her hayvan uygulamasından sonra %50'lik alkol ile temizlenmiştir.



**Şekil 3.4.** Açık alan testi düzeneği

### 3.6. Yükseltilmiş Artı Labirent Testi

Çalışmamızda YALT, MEÜ Fizyoloji AD Davranış Laboratuvarı'nda bulunan, farelerin yüksek ve açık alana karşı korku hissetmeleri prensibine göre geliştirilen düzenek ile gerçekleştirilmiştir. Düzenek beyaz opak pleksiglastan yapılmış olup; artı şeklinde ve yerden 40 cm yükseklikte, 2'si kapalı (35 cm uzunluk x 5 cm genişlik x 15 cm yükseklik), 2'si ise açık (35 cm uzunluk x 5 cm genişlik) olmak üzere toplam 4 koldan oluşmaktadır (Şekil 3.5). YALT'ne başlamadan bir gün önce fareler platforma serbest bir şekilde bırakılarak 5 dakika ortamı keşfetmelerine izin verilmiştir. Ana deney gününde, 5 dakikalık deney süresi içerisinde düzenekün merkezine bırakılan farelerin açık ya da kapalı kola giriş çıkış sayıları ve bu kollarda geçirdikleri süre Noldus Ethovision XT (Version 4) kayıt sistemi ile kayıt altına alınmıştır. Düzenek her hayvan uygulamasından sonra %50' lik alkol ile temizlenmiştir.



Şekil 3.5. Yükseltilmiş artı labirent testi düzeneği

### 3.7. Fare Beyinlerinden Hipokampus Dokularının Elde Edilmesi

Davranış testlerinin ardından kesim saati gelen fareler vücut ağırlığına göre 10 mg/kg Ksilazin ve 100 mg/kg dozda Ketamin kullanılarak intraperitoneal enjeksiyon yoluyla derin anestezi altına alındı ve sırasıyla aşağıdaki işlemler uygulandı.

İlk olarak, büyük cerrahi makas kullanılarak farelerin baş kısmı kraniyoservikal bileşkedeki kesildi. Ardından ince uçlu cerrahi makas kullanılarak rostrokaudal hattın ortasından bir kesi yapılarak deri kafatasından ayrıldı.

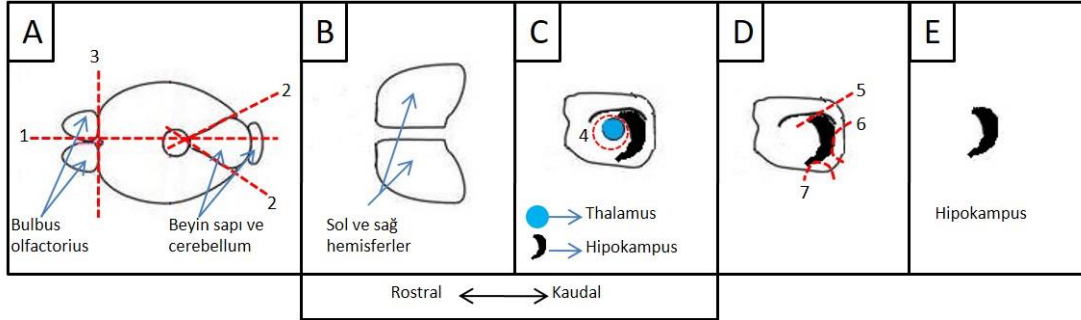
Yine ince uçlu cerrahi makas yardımıyla kafa tabanına yakın bir noktadan longitudinal bir insizyon yapılarak sutura sagittalis superior boyunca kesi ilerletildi. Orta hattın ikiye ayrılan kafatası uygun uçlu forseps kullanılarak her iki hemisfer tarafına doğru kaldırılarak beyin ortaya çıkarıldı. Çıkarılan beyin dokusu +4°C sıcaklıkta 0,1 M'lık sodyum fosfat tampon (PBS) içeren ve buz üzerinde tutulan petri kabına yerleştirildi (Şekil 3.6.).

Beyin dokusu fissura longitudinalis cerebri'den sagittal bir kesi ile iki hemisfere ayrıldı (Şekil 3.7 ve 3.8) ve koronal kesiler ile sırasıyla beyin sapı-cerebellum bileşkesi (colliculus superior'ların birleşim yerinden kesilerek) ve her iki bulbus olfactorius (BO) beyin dokusundan uzaklaştırıldı. Çıkarılan her iki hemisfer petri kabına medial yüzleri görünecek şekilde yerleştirildi (Şekil 3.9) ve mikropenset yardımı ile thalamus diseke edilerek çıkartıldı (Şekil 3.7 ve 3.8). HP'un hem rostral hem kaudal bölümünü serbestleştirebilmek için rostral ve kaudal hatta cortex cerebri ile olan bağlantıları kesilerek HP'un ön-arka kompartmanı serbestleştirildi

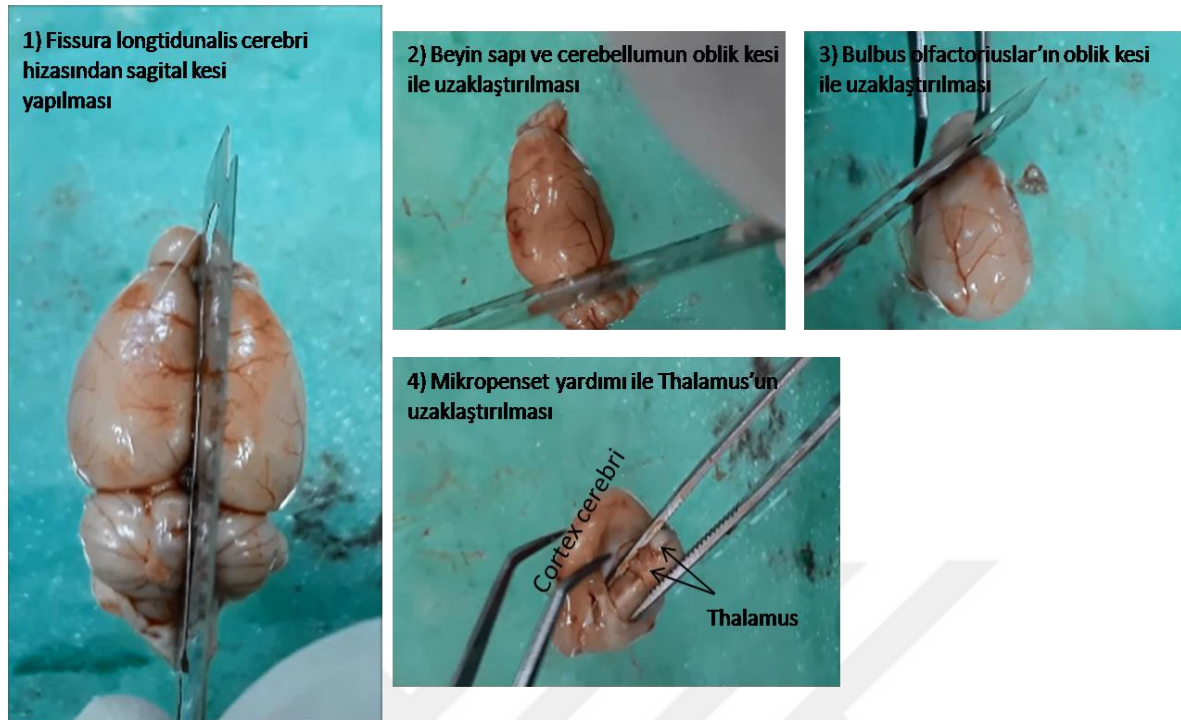
(Şekil 3.7 ve 3.9). Daha sonra HP'un dorsal ve ventral bölümleri üzerinde iğne yardımı ile kesiler yapılarak HP dağılmadan ittirilerek (kesilerek) dikkatlice diseke edildi (Şekil 3.9).



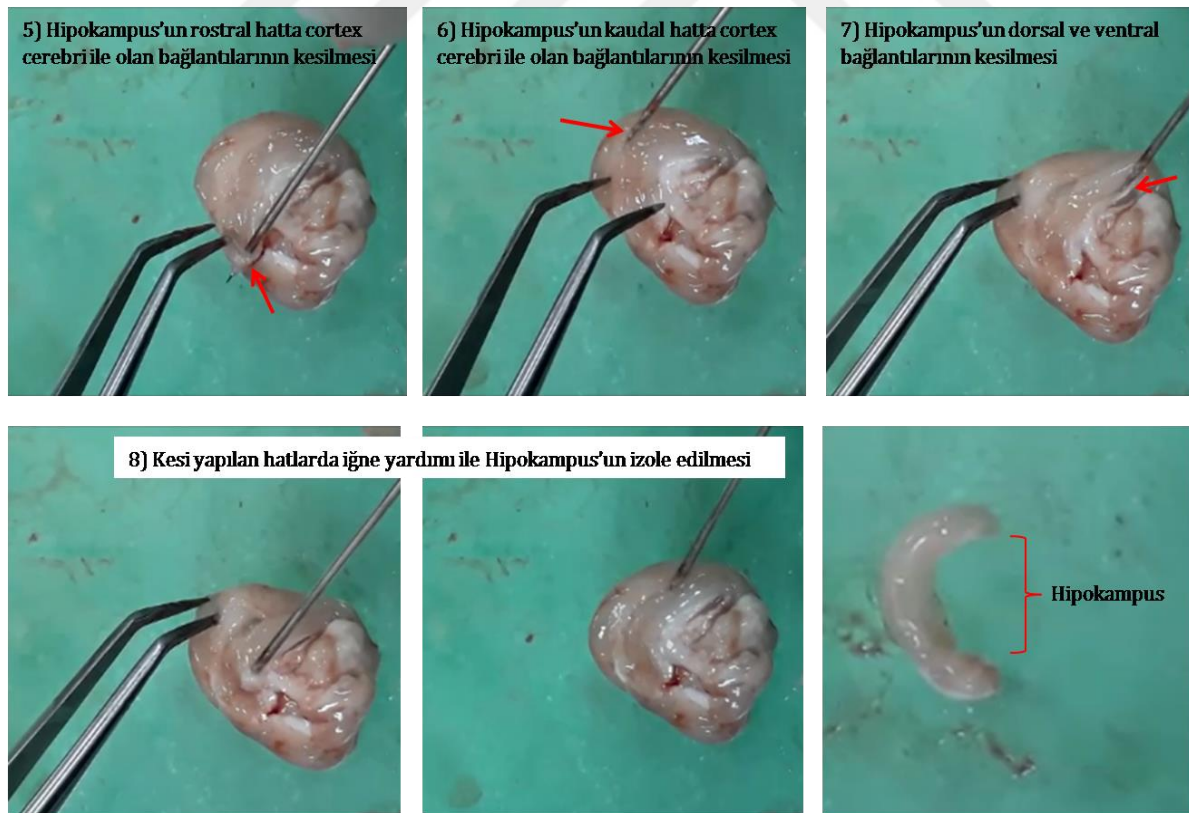
Şekil 3.6. Soğuk PBS içerisine yerleştirilen beyin dokusunun görüntüsü



Şekil 3.7. Hipokampus diseksiyonunun şematik resmi. Beyin dokusu üzerinde bulbus olfactorius'lar, beyin sapı ve cerebellumun uzaklaştırılması (A), sagittal kesi ile sağ ve sol hemisferin ayrılması (B), bir hemisferin medial yüzünde Thalamus'un diseke edilip çıkartılması (C), HP'un dorsal ve ventral bölümlerinde kesiler yapılarak çıkartılması (D), diseke edilen HP dokusu (E).



Şekil 3.8. Beyin sapı, Cerebellum, BO ve Thalamus'un beyin dokusundan uzaklaştırılması



Şekil 3.9. Hipokampus dokusunun diseksiyon aşamaları



### **3.8. Hipokampal Hücrelerin Enzimatik Yöntemle Tekli Canlı Hücre Süspansiyonuna Ayrıştırılması**

Yukarıda tarif edildiği şekilde izole edilen HP dokuları ivedimle soğuk HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) tamponu içine alındı. Tüm HP dokuları, mikro cerrahi makas ile HBSS içinde takriben 1 mm<sup>3</sup>'lük küçük parçalara ayrıldı ve parçalar üzerine DNase1 içeren soğuk HBSS eklenerek ajite edildi ve dokular insülin enjektörüyle yıkandı. Bu sürede, HBSS'nin fazlası çekilerek atıldı ve her bir dokunun üzerine 37°C sıcaklıktaki ticari olarak elde edilmiş olan TrypleSelect (rProtease ve EDTA içeren enzimli tampon solüsyonu) enziminden 1 mL hacminde eklendi.

Dokular bu enzim içinde orbital çalkalayıcı inkübatörde devamlı ajite edilerek ve 15 dakikada bir sırasıyla; bir kez plastik transfer pipeti, iki kez 1000 µL ve son olarak 200 µL' lik mikropipet ucu ile pipetaj yapılarak, 37°C sıcaklıkta 60 dakika inkübe edildi. Bu süreç sonunda görsel olarak solüsyon içerisinde doku parçası kalıp kalmadığı kontrol edildi. Neredeyse tüm deneylerde bir saat sonunda tüp içerisinde beyaz bulutsu renkte ve yoğun kıvamda bir hücre süspansiyonu olduğu teyit edildi.

İnkübasyon süresi dolunca örnekler soğutuculu bir santrifüjde 4°C sıcaklıkta 300 g (RCF) devir hızında 10 dakika santrifüj edildi. Çöktürme işleminden sonra üst fazı atılarak dipteki hücre pelletinin üzerine DNase1 içeren 1 mL soğuk HBSS konuldu ve 1000 µL'lik mikropipet ile yumuşak hareketlerle resüspande edildi.

Süspansiyon buz üzerinde 5 dakika bekletilerek parçacıkların çökmesi beklendi. Çökeltinin üzerinde kalan bulanık üst faz bir pipetle yavaşça çekilerek buz üzerindeki 15 mL'lik tüpe toplandı. Tüpte kalan çökelti üzerine çekilen süspansiyon hacmi kadar soğuk HBSS eklenip yine yumuşak bir şekilde 8 kez olmak üzere 1000 µL'lik mikropipet pipetle resüspande edildi ve süspansiyon yine buz üzerinde 5 dakika bekletilerek büyük parçaların çökmesi beklendi. Daha sonra ise, üstte kalan bulanık faz mikropipetle alınarak yine daha önce toplanan ve buz üzerinde tutulan süspansiyonun üzerine eklendi. Yine çökeltinin üzerinden alınan miktarda soğuk HBSS çökelti üzerine konularak 1000 µL'lik mikropipet ile yumuşak hareketlerle resüspande edildi. Süspansiyon yine buz üzerinde 5 dakika bekletilerek büyük parçaların çökmesi beklendi. Aynı şekilde çökelti üzerindeki sıvı faz mikropipetle alınarak daha önce toplananların üzerine eklendi.

Toplanan hücre süspansiyonu önce 50 mL'lik tüp üzerine yerleştirilmiş ve önceden PBS ile ıslatılmış 70 µm gözenek çapına sahip hücre eleğinden geçirildi. Elekten geçirilen süspansiyon tekrardan başka bir 50 mL'lik tüp üzerine konan ve HBSS ile ıslatılan 40 µm gözenek çapına sahip hücre eleğinden geçirildi. Daha sonra tüp 200 g hızında 30 dakika çevrildi. Hedeflediğimiz hücreler, hücre süspansiyonu arasındaki arayüzde kalırken, hücresel debrisler

(hücre kalıntıları) tüpün dibine çöktü. Ara yüzdeki hücreler toplanarak bir tüpe alındı ve üzerine 3 mL kadar soğuk HBSS eklendikten sonra pipetle karıştırıldı. Hücrelerin üzerine 500 µL-1 mL arası soğuk HBSS eklenerek resüspande edildi.

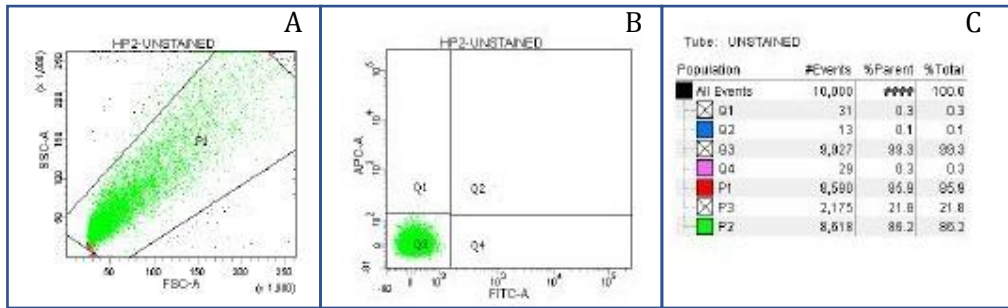
Diasosiyasyon işlemleri başarılı bir şekilde gerçekleştirildikten sonra akım sitometri öncesinde ilgili hücre gruplarının immünfloresan olarak işaretlenmesi işlemleri gerçekleştirildi.

### 3.9. Akım Sitometrik Analiz

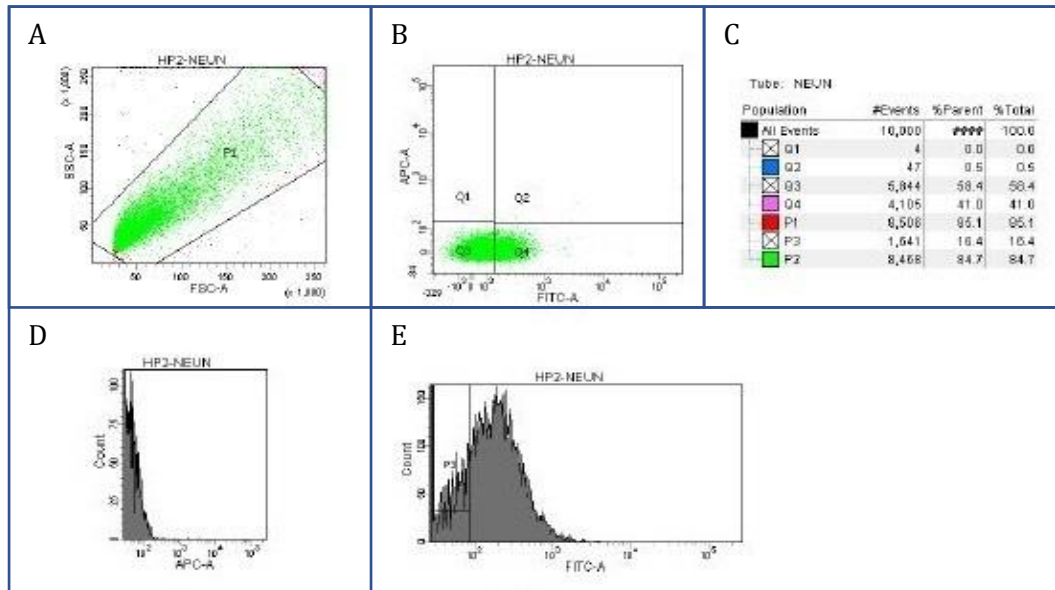
- FAAS ve saflaştırma için Mersin Üniversitesi İleri Teknoloji ve Araştırma Merkezi'nde (MEİTAM) bulunan BD Facs Aria III cihazı kullanıldı.
- Her kullanım öncesi cihazın uzmanı olan Öğr. Gör. Derya Yetkin tarafından 70'lik nozzle ile performans kontrolü ve drop delay değeri tespiti yapıldı.
- İlk etapta,  $1 \times 10^6$  sayıda kontrol hücre grubu (hiçbir boya ile işaretlenmemiş) cihaza yüklenerek hücre ve debris ayrımı yapmak amaçlı Forward Scatter Area (FSC-A)/Side Scatter Area (SSC-A) plotunda analiz edildi ve istenen popülasyon (P) P1 kapısı içerisine alındı (Şekil 3.10).
- P1 kapısı içerisine alınan örnekler daha sonra APC-A'ya (*Allophycocyanin*) karşın FITC (*Fluorescein isothiocyanate*) plotunda analiz edilerek, P1 kapısında bulunan işaretli hücrelerimizin APC-A ve FITC lazerleri açısından negatif kontrol değerlendirmesi yapıldı (Şekil 3.10). Buna göre P1 kapısındaki işaretli hücrelerimizin %85,9'unun söz konusu iki lazerle de ışına vermediği kadran (Q) olan Q3 kadranında görüldü (Şekil 3.10). Geriye kalan %14,1 popülasyon çalışma dışı bırakılarak, Q3 kadranı işaretli hücrelerin kullanılacağı analizler için taslak olarak kullanıldı.
- Daha sonra  $1 \times 10^6$ /ml'er konsantrasyonunda hücre örnekleri alınarak primer antikorla uygun dilüsyonda (1/1000'er dilüsyonlarda mouse-Anti-NeuN ve rabbit-Anti-c-Fos primer antikorlar)  $+4^\circ\text{C}$  40'ar dakika inkübe edildi.
- Primer antikor inkübasyonları biten örnekler soğutuculu santrifüjde  $+4^\circ\text{C}$  sıcaklıkta 300 g devir hızında 5 dakika çevrildi. Süpernatant atıldıktan sonra, pellet üzerine 1 mL içerisinde sekonder antikor içeren (1/500'er dilüsyonlarda Alexa-488 konjuge goat-anti mouse ve Alexa-633 konjuge goat-anti-rabbit sekonder antikorlar) tampon eklenerek  $+4^\circ\text{C}$  sıcaklıkta ve karanlıkta 20 dakika inkübe edildi. Bu işlemten sonra örnekler aynı

şekilde çöktürülmüş ve pellet üzerine 1 mL soğuk tampon eklenerek örnekler Akım Sitometri cihazına alınana dek buz üzerinde muhafaza edildi.

**Not:** Yukarıdaki dilüsyon değerleri baz alınarak; 1mL'de  $2-3 \times 10^5$  sayıda hücre içeren 3 ayrı tüpte (1- Hiçbir boya içermeyen **Kontrol 1**; 2- mouse-anti-NeuN + Alexa 488 konjuge goat-anti-mouse sekonder antikor boyaması içeren **Kontrol 2** (Şekil 3.11); 3- rabbit-anti-c-Fos + Alexa 633 konjuge goat-anti-rabbit sekonder antikor boyaması içeren **Kontrol 3** (Şekil 3.12); 4- Tüm boyamaları içeren esas deneyi temsil eden popülasyonlar cihazda okutturularak floresan boyalar arasında emisyon çakışmaları (spillover) var ise voltaj ayarları optimize edilerek kompensasyon ayarları oluşturuldu (Şekil 3.13). Bu ayarlar her akım sitometri deneyi günü tekrarlandı.

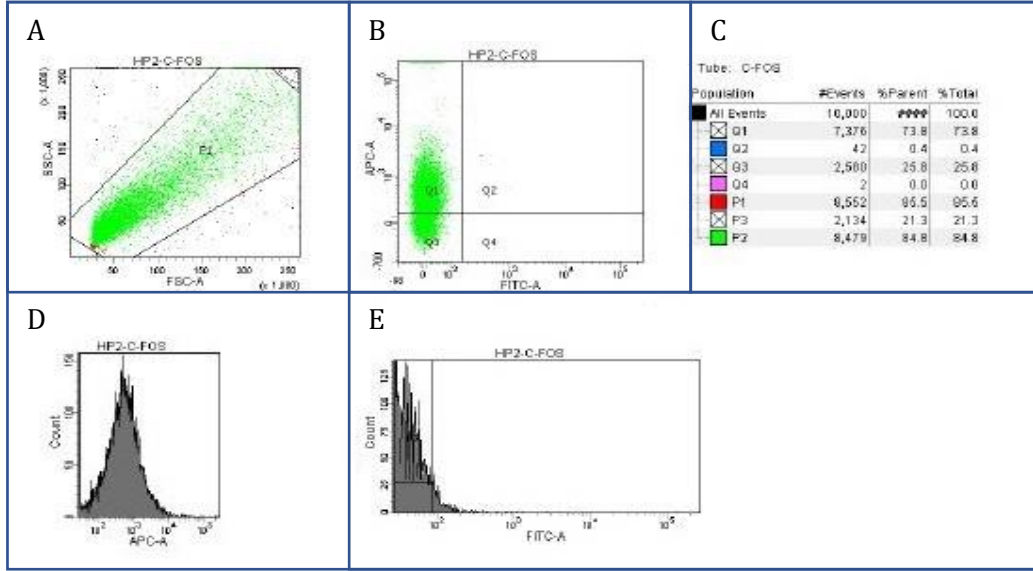


**Şekil 3.10.** Kontrol 1, hücrelerin hiçbir boya ile muamele edilmediği negatif kontrol okuması (Unstained popülasyon). Tüm hücrelerin P1 kapısında debris eliminasyonu görülmektedir (A), P1 kutusu/kapısı dışında kalan hücreler debris olarak kabul edilmiş ve analize katılmamıştır. P1 popülasyonunun APC-A/FITC plotunda toplanması (B), Q3 kadranı (B) ve bu Q3'ün temsil ettiği popülasyonun tüm popülasyon içerisindeki oranı görülmektedir (C).

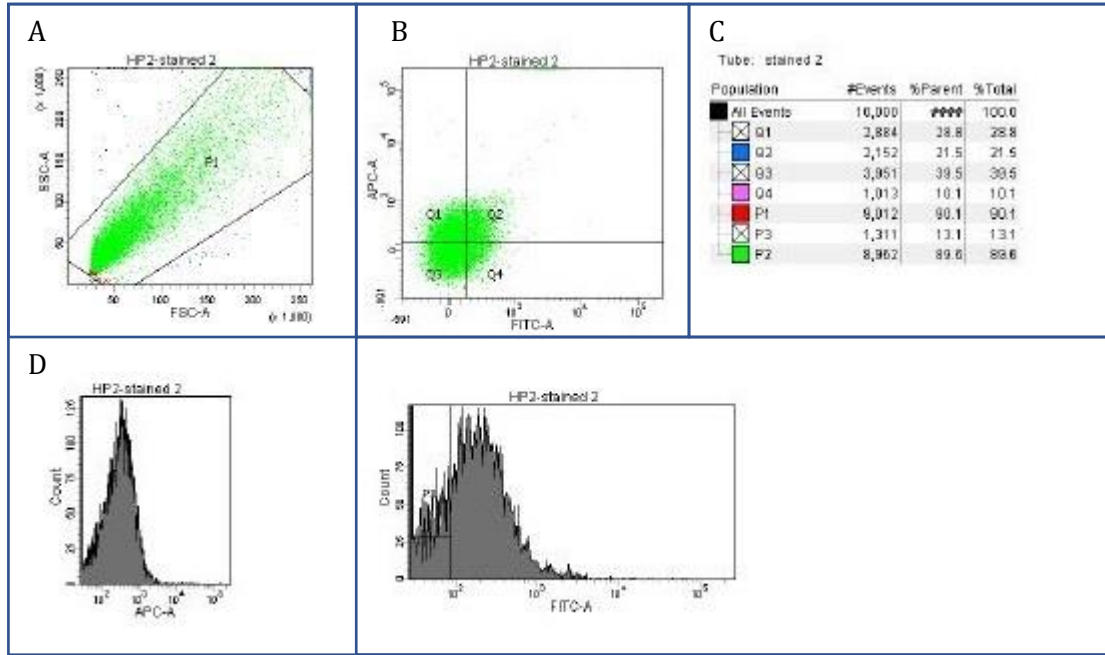


**Şekil 3.11.** Kontrol 2, yalnızca mouse-anti-NeuN + Alexa 488 konjuge goat-anti-mouse sekonder antikor boyaları ile NeuN-immün-reaktif NeuN(+) hücrelerin işaretlendiği kontrol boyaması.

Şekil 3.11’de tüm hücrelerin P1 kapısında debris eliminasyonu (A), P1 popülasyonunun APC-A/FITC plotunda toplanması (B), Q3= NeuN(-), Q4 = NeuN(+) alt popülasyonları (B) ve bu alt-popülasyonların tüm popülasyon içerisindeki oranları görülmektedir (C). Okutulan örneklerin FITC ve APC-A kanallarında voltaj değerlerini göstermektedir (D,E). Alexa-488 konjuge sekonder antikor ile işaretli NeuN(+) hücreler APC-A kanlında okutulduğunda, düşey eksendeki voltaj değerinin  $10^{-2}$  civarlarında kaldığı görülmektedir (D). Aynı hücreler FITC kanalında okutulduğunda ise düşey eksendeki voltaj değerlerinin  $10^{-3}$ ’ün sağına kadar kaydığı görülmektedir (E).



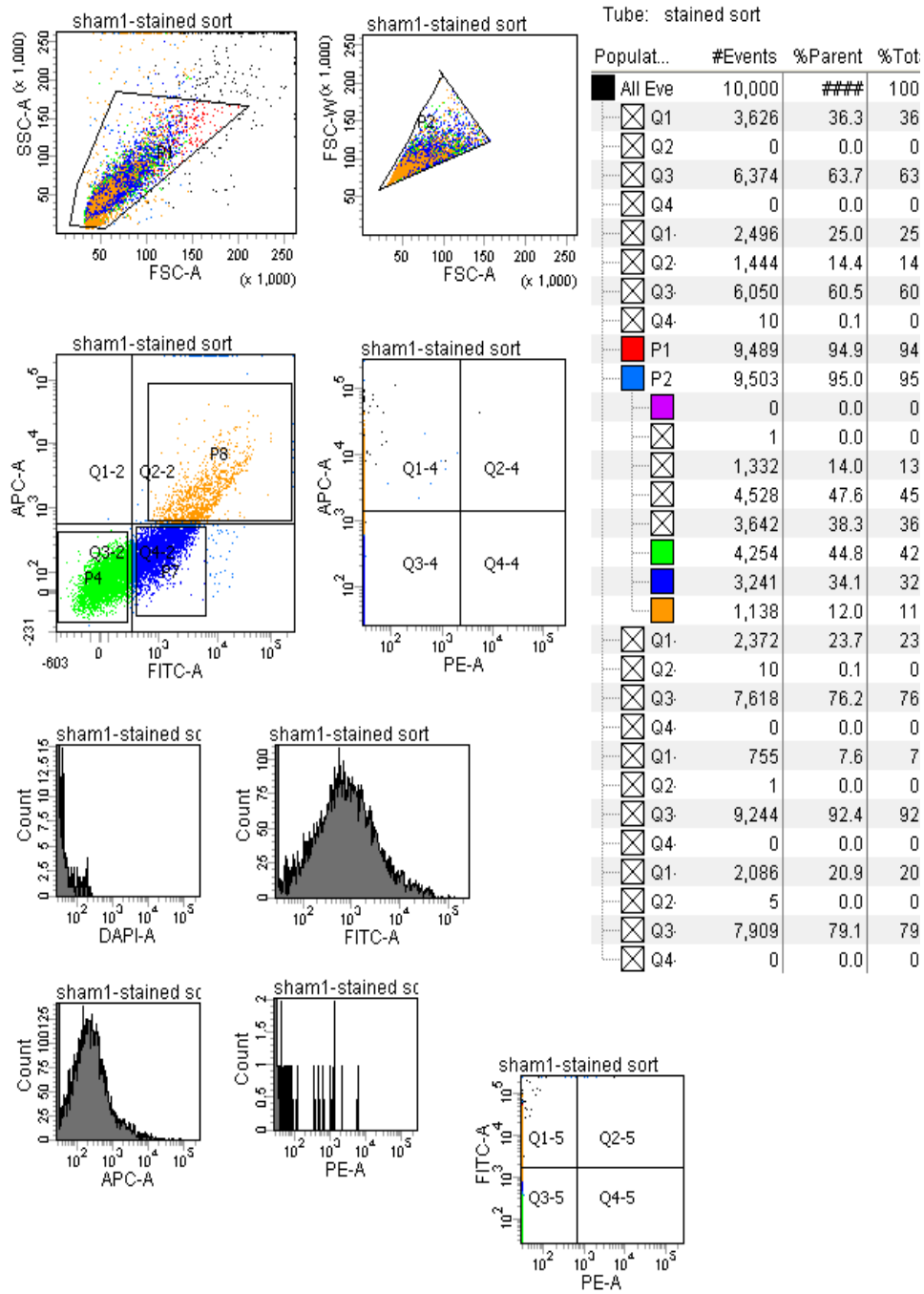
**Şekil 3.12.** Kontrol 3, sadece rabbit-anti-c-Fos + Alexa 633 konjuge goat-anti-rabbit sekonder antikor boyları ile c-Fos-immün-reaktif c-Fos(+) hücrelerin işaretlendiği kontrol boyaması. Tüm hücrelerin P1 kapısında debris eliminasyonu (A), P1 popülasyonunun APC-A/FITC plotunda toplanması (B), Q3= c-Fos(-), Q1= c-Fos(+) alt popülasyonları ve bu alt-popülasyonların tüm popülasyon içerisindeki oranları görülmektedir (C). Okutulan örneklerin FITC ve APC-A kanallarında voltaj değerlerini göstermektedir (D,E). Alexa-633 konjuge sekonder antikor ile işaretli c-Fos(+) hücreler APC-A kanlında okutulduğunda, düşey eksendeki voltaj değerinin  $10^{-4}$  civarlarında kaldığı görülmektedir (D). Aynı hücreler FITC kanalında okutulduğunda ise düşey eksendeki voltaj değerlerinin  $10^{-2}$  değerinin biraz sağına kadar kaydığı görülmektedir (E).



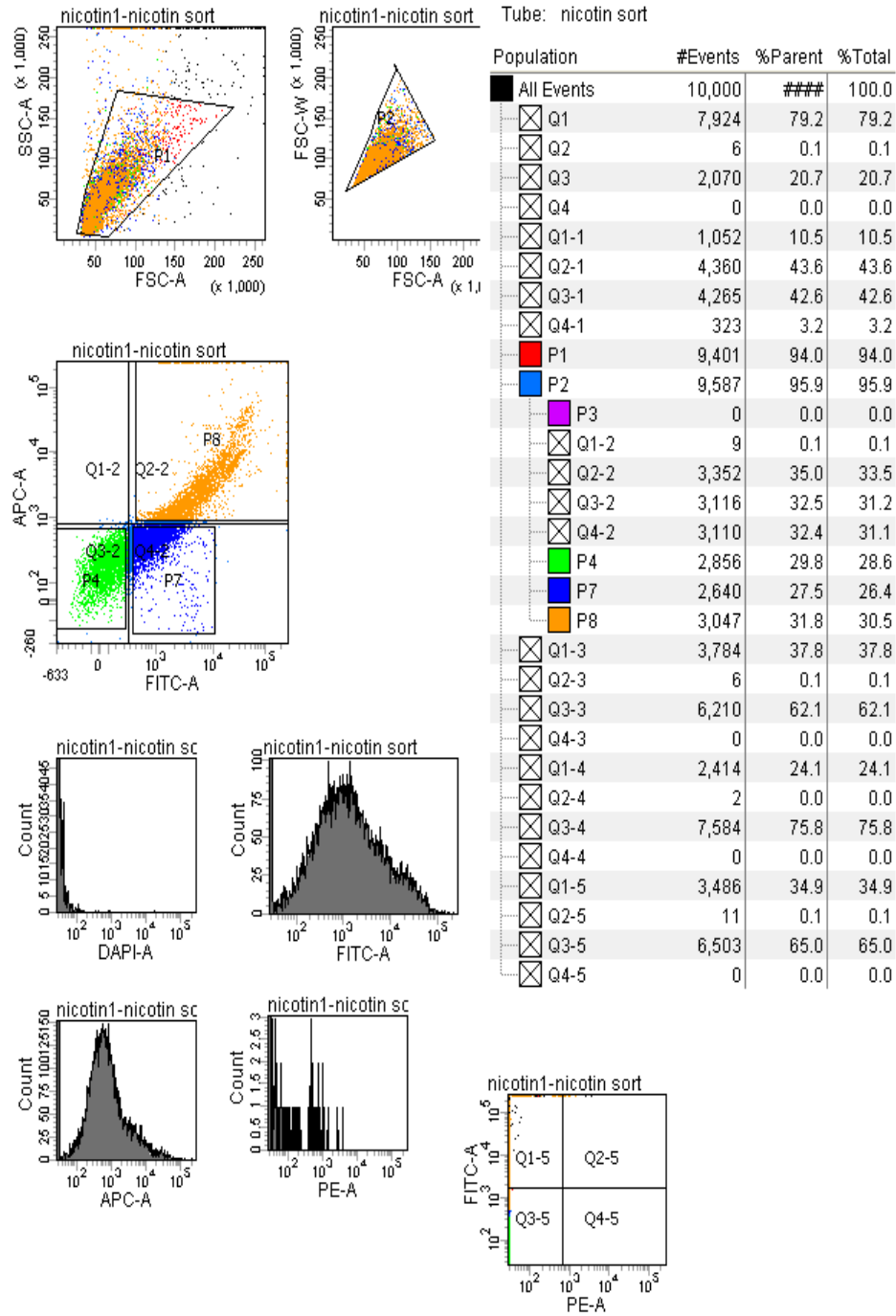
**Şekil 3.13.** Esas akım sitometrik okutma. Kontrol 3, Şekil 2 ve 3'teki her iki boyama kombinasyonunun bir arada gerçekleştirilmiştir. Tüm hücrelerin P1 kapısında debris eliminasyonu (A), P1 popülasyonunun APC-A/FITC plotunda toplanması (B), Q1 = NeuN(-)/c-Fos(+), Q2= NeuN(+)/c-Fos(+), Q3= NeuN(-)/c-Fos(-), Q4= NeuN(+)/c-Fos(-) alt popülasyonları görülmektedir. (B,C). Okutulan örneklerin FITC ve APC-A kanallarında voltaj değerlerini göstermektedir (D,E). Alexa-633 ve Alexa 488 konjuge sekonder antikolar ile işaretli c-Fos(+) ve NeuN(+) hücreler APC-A ve FITC kanallarında okutulduğunda düşük eksenlerdeki voltaj değerleri görülmektedir (D,E)

### 3.10. Akım Sitometrik Saflaştırma

Yukarıda verildiği üzere diasosiyasyon ve işaretleme protokollerini sılandıktan sonra geriye kalan bir sıçan beynine ait iki ayrı tüm HP'un birleştirilmesiyle elde edilen Sham ve NY grubu hücre popülasyonunun saflaştırılmasına ait örnek bir cihaz görüntüsü eklenmiştir (Şekil 3.14 ve 3.15). Saflaştırma işlemi üç adet steril akım sitometri tüpü içerisine gerçekleştirilmiştir. Akım sitometri tüpleri içerisine önceden RNA izolasyon kitinin lizis tamponu eklenmiştir. Saflaştırılan popülasyonlar: 1-NeuN(+)/c-Fos(+), 2-NeuN(+)/c-Fos(-) ve 3-NeuN(-)/c-Fos(-).



**Şekil 3.14.** Sham grubuna ait akım sitometrik saflaştırma işlemlerinin tasarlanma ve gerçekleştirilmesine ait cihazın yazılımından alınan görüntü. Saflaştırılan popülasyonlar 1- NeuN(+)/c-Fos(+)= Q2-2 (turuncu renkli), 2-NeuN(+)/c-Fos(-)= Q4-2 (mavi renkli) ve 3- NeuN(-)/c-Fos(-)= Q3-2 (yeşil renkli) kadranları içerisinde görülmektedir.



**Şekil 3.15.** Nikotin yoksunluğu grubuna ait akım sitometrik saflaştırma işlemlerinin tasarlanma ve gerçekleştirilmesine ait cihazın yazılımından alınan görüntü. Saflaştırılan popülasyonlar 1- NeuN-(+)/c-Fos-(+)= Q2-2 (turuncu renkli), 2-NeuN-(+)/c-Fos(-)= Q4-2 (mavi renkli) ve 3- NeuN-(-)/c-Fos(-)= Q3-2 (yeşil renkli) kadranları içerisinde görülmektedir.

### **3.11. Total RNA İzolasyonu**

#### **3.11.1. Akım Sitometrik Olarak Saflaştırılan Örneklerden RNA İzolasyonu**

Yukarıda bahsedilen akım sitometrik saflaştırma toplamda n=5/grup sayıda fareden 1- NeuN-(+)/c-Fos-(+), 2-NeuN-(+)/c-Fos(-) ve 3-NeuN(-)/c-Fos(-) üçer adet hücre alt popülasyonu saflaştırılmış ve sonrasında total RNA izolasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Hedef popülasyonlar, ticari olarak elde ettiğimiz (Plus Micro Kit-74034) kitlerinin lizis tamponu olan RLT Plus içeren saflaştırma tüpleri içerisine gerçekleştirilmiştir. Devamında ise bekletilmeksizin ilgili kitin protokolüne harfiyen uyularak tRNA izolasyonu gerçekleştirildi.

Protokolün en son aşamasında önerilen elüsyon hacmi 14µl'lik kitin verdiği distile su ile gerçekleştirildikten sonra, MEİTAM'da bulunan 1,5 µl'lik örnekle spektrofometrik Q-Drop cihazında RNA'nın miktar ve saflık tayini yapıldı ve geriye kalan RNA sıvı azot içerisinde hızla dondurularak -80°C'lik derin dondurucuda muhafaza edildi.

#### **3.11.2. Tek Beyin Hemisferinden Elde Edilen HP Dokusundan RNA izolasyonu**

Gerçekleştirilen ikinci grup deneylerde her bir farenin tek bir beyin hemisferindeki HP dokusundan Qiagen RNeasy Mini (74104) Kit, (aynı üretici fakat yukarıda belirtilen kitten farklı), kullanılarak total RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

- HP dokuları farelerden çıkarıldıktan sonra RNase etkisini minimize etmek dolayısıyla örneğimizdeki RNA'yı korumak için RNase inhibitörü içeren RNA-Later solüsyonu içerisinde +4°C'de 24 saat bekletildi ve -86°C'lik derin dondurucuya alındı.
- Nükleik asit tutucu spin kolona sahip bu kiti kullanmaya başlamadan önce, doku örnekleri tüpleriyle birlikte kısa süre (1 dakika) sıvı nitrojen içine alındı, tüpün lümenine uygun bir metal doku ezici yardımıyla örnek doku 7-8 kez ezilerek toz haline getirildi.
- Elde edilen soğuk doku tozu ısınmadan, ticari kitin lizis tamponu (buffer RLT) tüpün içerisine eklenerek uygun parçalama işlemi sağlandı. Böylece doku örneklerinin tüpün içerisinden çıkarılıp ortamdaki çeşitli kontaminantlara maruziyeti önlendi.
- Sonraki tüm işlemler ticari kitin protokolüne uygun şekilde gerçekleştirildi. Bu basamaklar sonucu elde edilen total RNA örnekleri, ivedimle MEİTAM'da bulunan Q-Drop cihazında konsantrasyon ve nükleik asit saflık analizi için ölçüldü, sonrasında ise



sıvı nitrojen içerisinde hızlıca dondurularak bir sonraki işlemlere kadar -80°C derin dondurucuda saklandı. Okutma sonucu sadece 280/260 ve 260/230 absorbans değeri  $1,7 \leq X$  olan örnekler çalışmaya dahil edildi.

### 3.12. cDNA Sentezi

- Her bir total RNA örneği MEİTAM'da bulunan RT-PCR cihazının gerektirdiği başlangıç miktarı olan 100 ng'a uygun sulandırma ile normalize edildi.
- Örnekler bu miktara göre sulandırılarak (Not: Saflaştırılmış total RNA numunelerinin yarısından fazlasında miktar 100 ng'dan aşağıda kalmıştır) üretici firmanın önerdiği Reverse Transcription Master Mix kitinden (Fluidigm, Cat.No: 100-6298) 1µl ile 96'lı plate içerisinde karıştırılarak cDNA sentezi için üstten ısıtmalı bir thermal cycler cihazında uygun programa alındı.
- cDNA Thermal Program: 5 dakika 25°C, 30 dakika 42°C, 5 dakika 85°C ve 4°C. Daha sonra yine üretici firmanın önerdiği protokoller takip edilerek örnekler 2<sup>18</sup> döngüde preamplifikasyon işlemine alındı.
- PreAmp Thermal Programı: 2 dakika 95°C, (15 saniye 94 °C +4 dakika 60 °C) X 18 döngü ve 4°C.

### 3.13. RT-PCR ile Gen Ekspresyon Tayini

- Çalışmamızda araştırmak istediğimiz hedef genlerden dokuz tanesi (DNMT1/3a, Tet1/2/3, c-Fos, Arc, Doublecortin, Ascl1) ve üç adet endojen kontrol geninin (Gapdh, Hprt, Ppia) ekspresyon seviyelerini çalışmak için gereken primer dizileri, Taqman Assay kitleri şeklinde ticari olarak elde edildi.
- Daha sonraki işlemler için gerektirdiği üzere bu assay'ler kullanılarak primer havuzu oluşturuldu. Her assay'den ikişer µl alınarak (12 assay için 24 µl) DNase ve RNase içermeyen 176 µl'lik su ile 200 µl'ye tamamlandı.
- Öte yandan preamplifikasyon işlemi bittikten sonra örneklerimizi içeren plate thermal cycler cihazından oda sıcaklığına çıkarıldı ve her örnek içeren kuyuya 20 µl DNA süspansiyon tamponu eklendi.

- Plate üzerine film bant yapıştırılarak plate karıştırıcıda 3000 rpm'de 3 dakika karıştırıldı. Daha sonra plate vorteks ile 2 saniye karıştırılarak (bu işlem 2 kez tekrarlandı) plate santrifüjünde 1 dakika santrifüj ettirildi.
- En son işlemde sonra cDNA örnekleri Felxsix adındaki tek kullanımlık nano-chip teknolojisi ile çalışan plate içerisine çalışılması planlanan 12 primer Taqman Assay örnekleri ile birlikte üretici firmanın protokollerine uygun şekilde yüklendi. Felxsix plate'e tek bir seferde elimizdeki her bir cDNA örneğinden üçer adet, pozitif ve ticari negatif kontrollerden ise ikişer adet örnekleri yüklendi. Bu işlem iki defa tekrar edildi. Böylece elimizdeki her bir biyolojik örnek için üç veya dört kez tekrar gerçekleştirilmiş oldu. Bu işlemler birlikte üretici firmanın protokolleri takip edilerek gerçekleştirildi [133, 134].
- RT-PCR cihazının verdiği ham CT ekspresyon değerlerinden delta (d) CT değerleri, dCT'den ise ddCT, sonrasında ise  $2^{-ddCT}$  değerleri elde edildi. Böylece hedef genlerin endojen kontrol Hprt genine kıyasla rölatif ekspresyon seviyelerinin Sham ve NY grupları arasındaki değişimleri analiz edildi [135, 136].

### 3.14. İstatistiksel Analiz

Çalışmamızda istatistiksel olarak analiz edilen günlük vücut ağırlığı değişim, ATT'de kat edilen mesafe, ortalama hız, merkezde geçirilen sürenin tüm süreye oranı, YALT'de açık ve kapalı kollarda geçirilen sürenin tüm süreye oranları, akım sitometrik analizlerde hedef alt-popülasyonların oranları, akım sitometrik saflaştırmayla elde edilen alt popülasyonlarının oranları ve son olarak endojen kontrol Hprt genine kıyasla hedef genlerde elde edilen dCT ekspresyon değerleri SPSS yazılımı kullanılarak normalite testlerine tabi tutuldu.

- Kolmogorov-Smirnov ve Shapiro-Wilk testlerinde  $p > 0,05$  anlamlılık değeri elde edilen veri setleri normal olarak kabul edilip, Student-t testi ile parametrik olarak analiz edildi.
- $p \leq 0,05$  olan veri setleri için ise non-parametrik Mann Whitney U testi uygulandı.
- Student-t testi içerisindeki Levene testinde anlamlılık düzeyi  $p > 0,05$  çıkan veri setleri varyans değişkenliği açısından eşit,  $p \leq 0,05$  olanlar ise varyans değişkenliği açısından

eşit olmayan şekilde değerlendirildi. T-testi uygulanmış veri setlerini temsil eden nihai p değerleri Levene testine göre belirlendi.

- Non-parametrik Mann Whitney U uygulanan veri setleri içinse SPSS yazılımının verdiği Asymp Sig. 2 tailed anlamlılık değeri p değeri olarak alındı. Mann Whitney U değeri de ayrıca verildi.
- T testi uygulanan veri setleri ortalama, standart sapma içeren tablo ve uygun grafiklerle; non-parametrik testler ise median, minimum ve maksimum değerleri içeren tablo ve box-plot şeklindeki grafiklerle sunuldu. Grafikler Microsoft sürüm 15.32’de oluşturuldu.

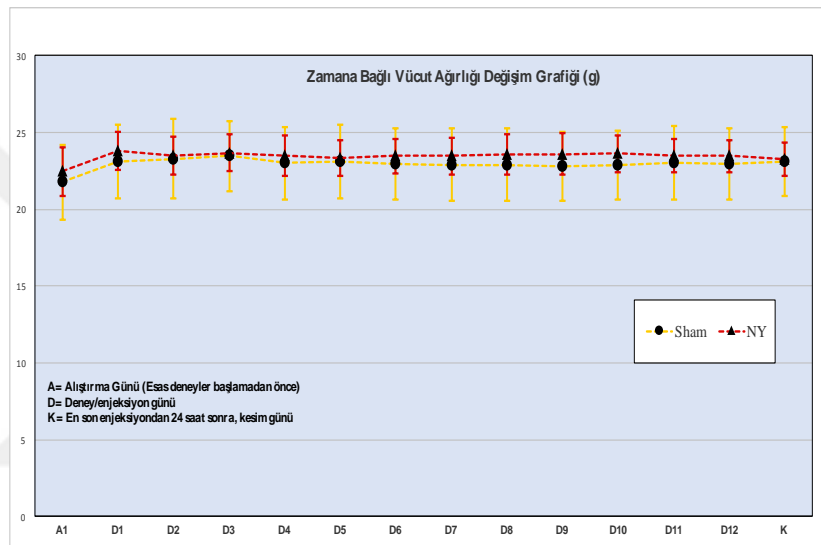


## 4. BULGULAR

### 4.1. Vücut Ağırlığı Değişimi

Çalışmamızda nikotin veya SF uygulamalarına bağlı ortaya çıkması muhtemel normal vücut ağırlık değişimlerini karşılaştırmak amacıyla her bir gruba ait farelerin düzenli zaman aralıklarıyla kesim gününe kadar vücut ağırlıkları kayıt altına alınmıştır.

Şekil 4.1’de elde edilen vücut ağırlık ölçüm ortalamalarının gruplar arası değişimi verilmiştir.



Şekil 4.1. Gruplar arasında vücut ağırlığı ortalamalarının değişimi

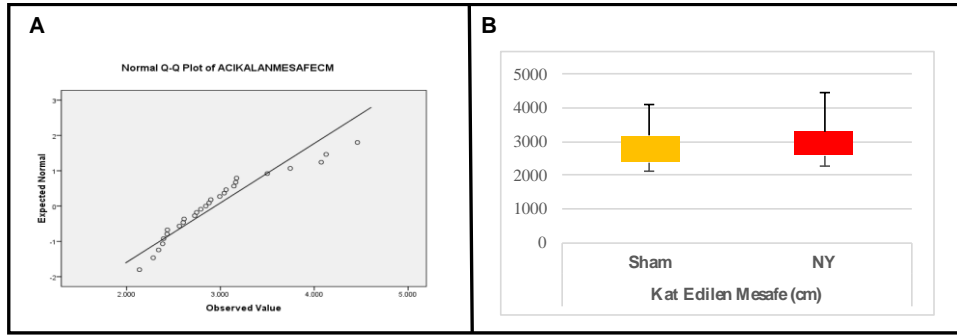
Çalışmamızda alıştırma enjeksiyonu yapıldığı ilk günden başlamak üzere, devam eden on iki günlük esas enjeksiyon günleri ve son olarak kesim günü de dahil hiçbir günde Sham ve NY grubu farelerin vücut ağırlıkları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir ( $p \geq 0,05$ ).

### 4.2. Açık Alan Testi ile Lokomotor Aktivite ve Stres Durumlarının Değerlendirilmesi

Sham ve NY gruplarının stres ve lokomotor aktivite kabiliyetlerini değerlendirmek için ATT’nde hayvanların merkezde geçirdikleri süre ve total olarak kat ettikleri mesafe (cm), ortalama hız (cm/sn) açısından değerlendirilmiştir (Şekil 4.2 ve 4.3).

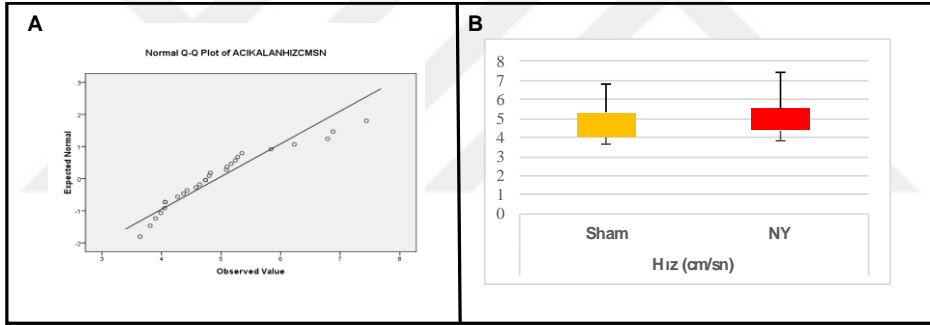
Sham ve NY gruplarının kat ettikleri toplam mesafe (cm) ve hız (cm/sn) parametreleri karşılaştırıldığında lokomotor aktivite kabiliyeti açısından aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı ( $p > 0,05$ ) tespit edilmiştir (Tablo 4.1). Bunun yanı sıra, merkezde geçirilen

sürenin tüm süreye oranı baz alındığında gruplar arasında yine istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı tespit edilmiştir ( $p>0,05$ ) (Şekil 4.4 ), (Tablo 4.1).



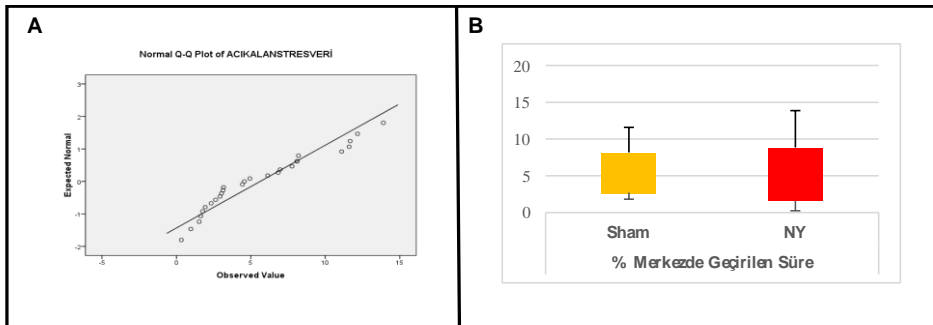
Şekil 4.2. Açık alan testinde toplam kat edilen mesafenin gruplar arasındaki değişimi.

Gruplara ait verilerin normal dağılıma uymadığı ( $p<0,05$ ) tespit edildi (A). Non-parametrik Mann Whitney U testine göre gruplar arasında istatistiksel anlamlılık bulunamadı ( $p>0,05$ ) (B).



Şekil 4.3. Açık alan testinde gruplar arasında ortalama hız (cm/sn) değişimi

Gruplara ait verilerin normal dağılıma uymadığı ( $p<0,05$ ) tespit edildi (A). Non-parametrik Mann Whitney U testine göre gruplar arasında istatistiksel anlamlılık bulunamadı ( $p>0,05$ ) (B).



Şekil 4.4. Açık alan testinde merkezde geçirilen sürenin gruplar arası karşılaştırılması.

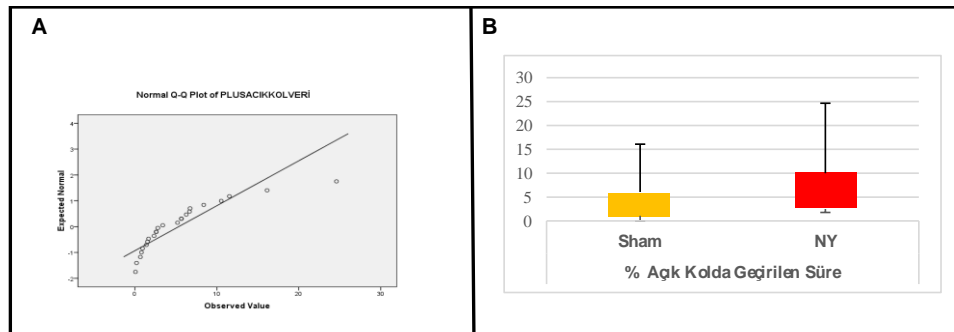
Gruplara ait verilerin normal dağılıma uymadığı ( $p < 0,05$ ) tespit edildi (A). Non-parametrik Mann Whitney U testine göre gruplar arasında istatistiksel anlamlılık bulunamadı ( $p > 0,05$ ) (B)

**Tablo 4.1.** Açık alan testinde Sham ve NY grubu farelerden elde ettiğimiz üç adet parametreye (% merkezde geçirilen süre, hız ve kat edilen mesafe) ait median, minimum ve maksimum değerleri, gruplar arasında Mann Whitney U testi açısından anlamlılık değerleri  
\*Med (ortanca); Min (minimum); Max (maksimum)

Test İsmi	Açık Alan Testi					
	%Merkezde Geçirilen Süre		Hız (cm/sn)		Kat Edilen Mesafe (cm)	
	Sham	NY	Sham	NY	Sham	NY
Med	6,13	4,43	4,58	4,81	2747	2889
Min	1,76	0,33	3,63	3,8	2137	2285
Max	11,66	13,9	6,79	7,43	4074	4459
P değeri (Asymp Sig. 2 tailed)	0,577		0,369		0,382	
Mann Whitney-U Değeri	79,5		72,5		73	

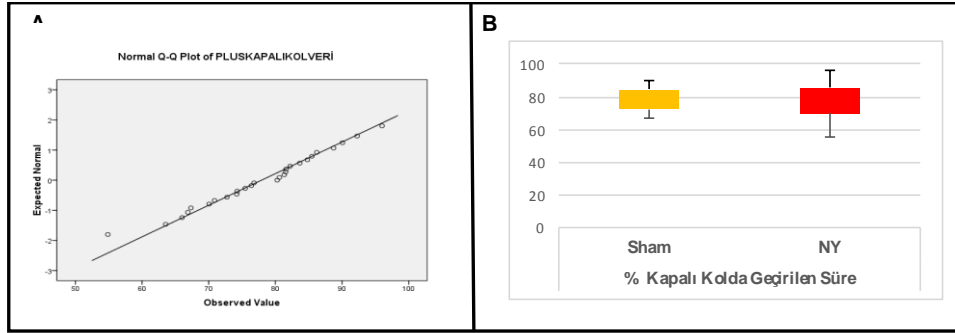
#### 4.3. Yükseltilmiş Artı Labirent Testi ve Davranışsal Durumların Değerlendirilmesi

Sham ve NY grupları arasında YALT testinde açık ve kapalı kollarda geçirilen süre (sn) arasındaki farklılıklar değerlendirilmiştir (Şekil 4.5 ve 4.6).



**Şekil 4.5.** Yükseltilmiş artı labirent testinde açık kollarda geçirilen yüzdelerin gruplar arası karşılaştırılması.

Gruplara ait verilerin normal dağılıma uymadığı ( $p < 0,05$ ) tespit edildi (A). Non-parametrik Mann Whitney U testine göre gruplar arasında istatistiksel anlamlılık bulunamadı ( $p > 0,05$ ) (B).



**Şekil 4.6.** Yükseltmiş artı labirent testinde kapalı kollarda geçirilen yüzdelerin gruplar arası karşılaştırılması.

Gruplara ait verilerin normal dağılıma uymadığı ( $p < 0,05$ ) tespit edildi (A). Non-parametrik Mann Whitney U testine göre gruplar arasında istatistiksel anlamlılık bulunamadı ( $p > 0,05$ ) (B).

NY ve Sham gruplarının YALT'nde açık ve kapalı kollarda geçirdikleri sürelerin yüzdeleri (geçirilen sürenin toplam süreye oranı) değerlendirildiğinde benzer davranışlara sahip olduğu ve gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı ( $p < 0,05$ ) tespit edilmiştir (Tablo 4.2).

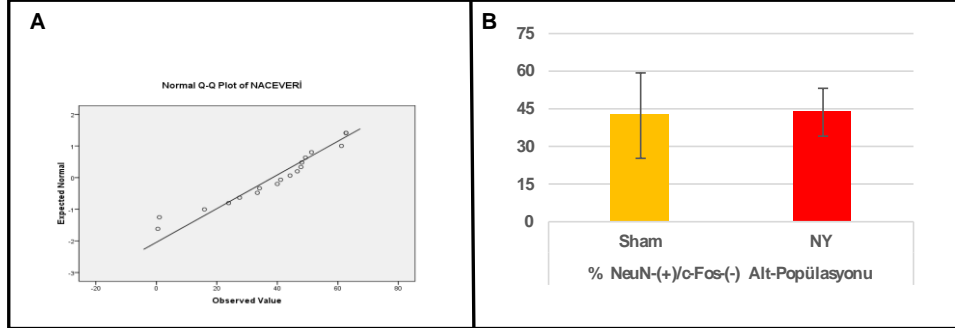
**Tablo 4.2.** Yükseltmiş artı labirent testinde Sham ve NY grubu farelerden elde ettiğimiz iki adet parametreye (% açık kol ve kapalı kolda geçirilen süre) ait median, minimum ve maksimum değerleri, gruplar arasında Mann Whitney U testi açısından anlamlılık değerleri  
\* Med (ortanca); Min (minimum); Max (maksimum)

Test İsmi	Yükseltmiş Artı Labirent Testi			
	%Açık Kolda Geçirilen Süre		%Kapalı Kolda Geçirilen Süre	
Parametre	Sham	NY	Sham	NY
Med	2	5,67	81,3	76,6
Min	0,2	0,07	66,8	54,87
Max	16,13	24,6	90,07	96,0
P değeri (Asymp Sig. 2 tailed)	0,149		0,627	
Mann Whitney-U Değeri	47		81	

#### 4.4. Akım Sitometrik Analizlerin Değerlendirilmesi

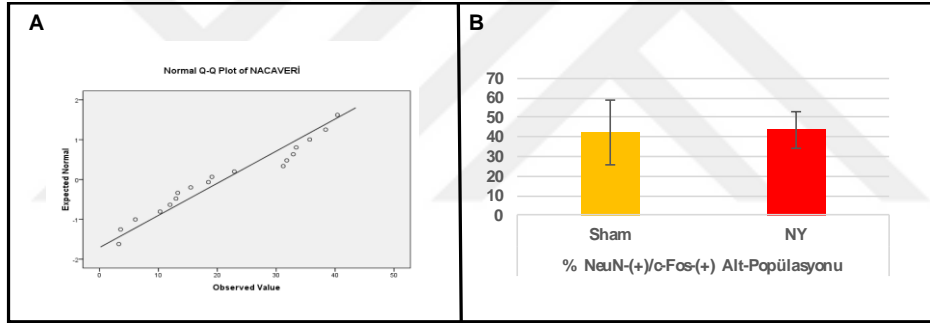
Çalışmamızda Sham ve NY gruplarına ait HP'lar enzimatik olarak diasosiye edildikten sonra pasif ve aktif durumdaki olgun nöronları belirlemek için immün olarak işaretlenmiş ve yöntemler kısmında etraflıca bahsedildiği üzere söz konusu nöral alt popülasyonların tüm

popülasyonlara oranları akım sitometrik olarak analiz edilmiştir. Pasif =% NeuN-(+)/c-Fos(-) ve aktif=% NeuN-(+)/c-Fos(+) alt popülasyonlar açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemiştir ( $p>0,05$ ).



**Şekil 4.7.** Sham ve NY gruplarında Pasif =% NeuN-(+)/c-Fos(-) nöronların karşılaştırılması.

Gruplara ait verilerin normal dağılıma uyduğu ( $p\geq 0,05$ ) tespit edilmiştir (A). Student-t testi uygulandığında gruplar arasında istatistiksel anlamlılık bulunamamıştır ( $p>0,05$ ) (B).



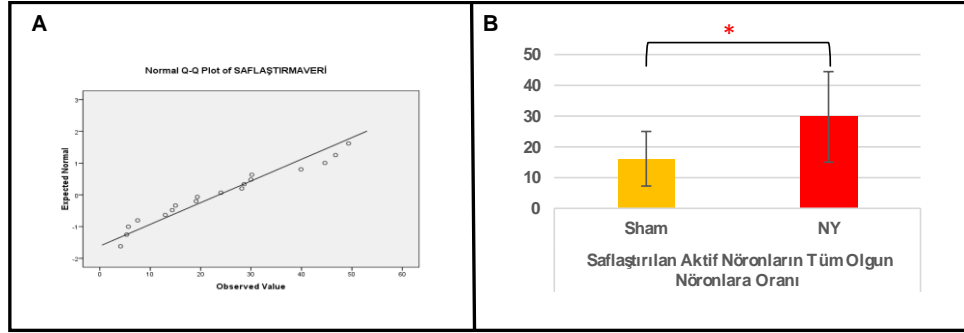
**Şekil 4.8.** Sham ve NY gruplarında Aktif =% NeuN-(+)/c-Fos(+) nöronların karşılaştırılması.

Gruplara ait verilerin normal dağılıma uyduğu ( $p\geq 0,05$ ) tespit edildi (A). Student-t testi uygulandığında gruplar arasında istatistiksel anlamlılık bulunamamıştır ( $p>0,05$ ) (B).

#### 4.5. Akım Sitometrik Saflaştırma ile Elde Edilen Nöral Alt Popülasyon Oranlarının Değerlendirilmesi

Çalışmamızda Sham ve NY gruplarında akım sitometrik saflaştırma ile ayrıştırılan Neun (+) / c-Fos (+) işaretli aktif nöron sayısının Neun (+) / c-Fos (-) işaretli tüm olgun nöron sayısına oranı Sham ve NY grupları arasında karşılaştırılmış ve bu oranın NY grubunda Sham grubuna kıyasla anlamlı biçimde artmış olduğu görülmüştür ( $p=0,044$ ).



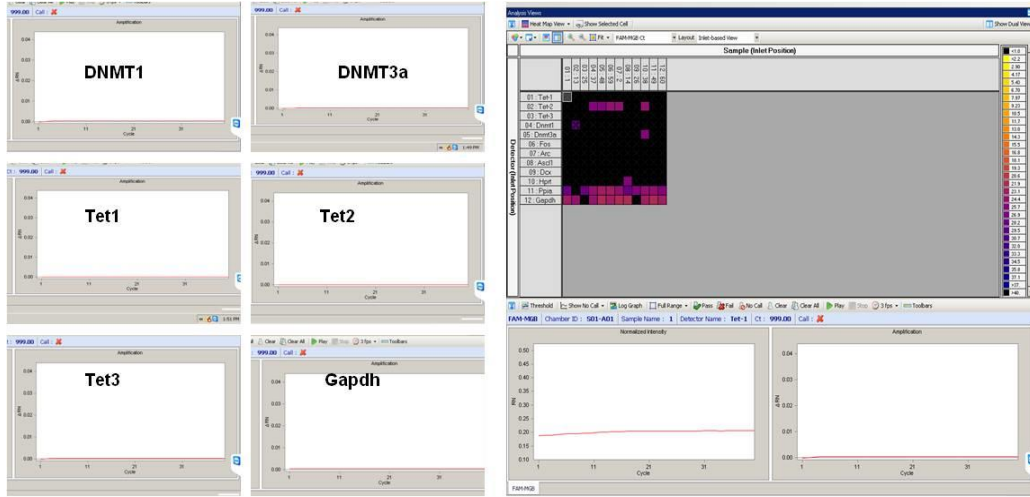


**Şekil 4.9.** Saflaştırılan aktif nöronların tüm olgun nöronlara oranını gösteren grafik

Saflaştırılan aktif nöron (NeuN-+)/c-Fos-(+) ) sayısının tüm olgun nöron sayısına ( NeuN-+)/c-Fos-(+) + NeuN-+)/c-Fos-(-) ) oranı her bir grup içerisinde hesaplandı. Bu oranların normal dağılıma uyduğu ( $p \geq 0,05$ ) tespit edildi (A). Bu oran iki grup arasında karşılaştırmak için Student-t testi uygulandığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edildi  $p=0,044$  (B). \*  $(p \leq 0,05)$ .

#### 4.6. HP'tan Akım Sitometrik Olarak Saflaştırılan Popülasyonlardan RT-PCR ile Gen Ekspresyonu Belirlenmesi

DNA metilasyonunu katalizleyen DNMT1, DNMT3a, DNA demetilasyonunu katalizleyen Tet1, Tet2, Tet3, kök hücre belirteci olarak bilinen Ascl1 proteinini kodlayan Ascl1, aktif nöron belirteçlerinden olan Arc ve c-Fos proteinlerini kodlayan Arc ve c-Fos hedef genlerinin ekspresyon seviyeleri Sham ve NY grupları arasında karşılaştırmak için MEİTAM'da bulunan RT-PCR cihazı kullanılmıştır. RT-PCR cihazının yazılımı her bir reaksiyon neticesinde her bir numune için cycle threshold/eşik döngü değeri adı verilen CT değeri vermektedir. Fakat ilgili yazılım, numunelerimizin büyük çoğunluğu için ekspresyon değeri vermemiştir. CT değeri aldığımız örnek sayısı (her bir gen için grup başına hayvan sayısı  $n < 3$ ) ise istatistiksel analiz yapmaya yeterli görülmemiştir.

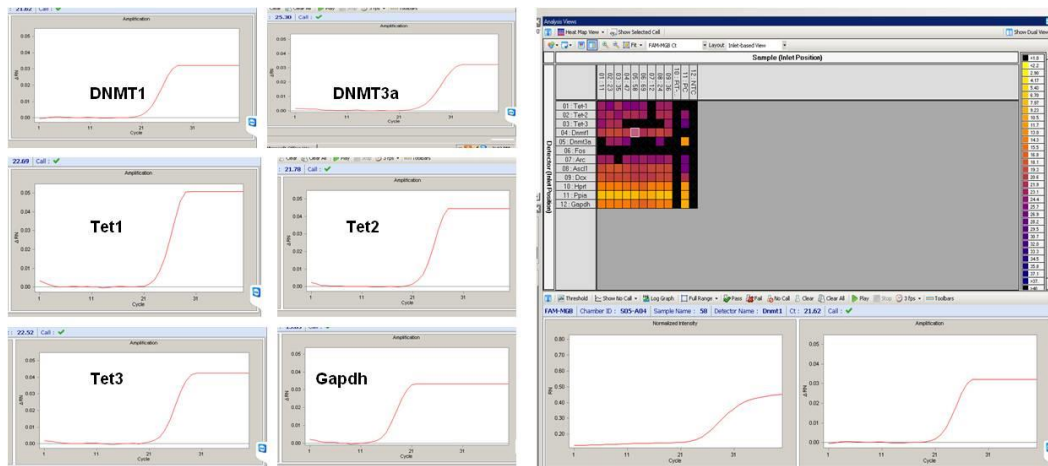


**Şekil 4.10.** Akım sitometrik olarak ayrıştırılan popülasyonlar kullanılarak RT-PCR reaksiyonu sonucu yazılımın verdiği grafik

Şekil 4.10'da görüldüğü üzere akım sitometrik olarak ayrıştırılan alt popülasyonlar kullanılarak gerçekleştirilen RT-PCR reaksiyonu sonucunda yazılımın verdiği grafiklerde, CT değeri görülmemektedir.

#### 4.7. HP Dokularından Direkt Olarak RT-PCR ile Gen Ekspresyonu Belirlenmesi

Her bir hayvana ait tek HP dokusundan sentez edilen cDNA örnekleri kullanılarak endojen kontrol Hprt ve Gapdh genlerine kıyasla 4.6. bölümde de verilen hedef genlerin Sham ve NY grupları arasındaki ekspresyon değişimleri test edilmiştir. Hprt endojen kontrol en tutarlı kontrol olarak tespit edilmiştir. Hprt endojen geninin ekspresyon seviyesi baz alındığında Sham ve NY grupları HP dokularında DNMT1, DNMT3a, Tet1, Tet3, Ascl1 ve Dcx genleri ekspresyon seviyeleri açısından anlamlı bir değişim gözlenmemiştir ( $p>0,05$ ). Tet2 ve Arc gen ekspresyonlarının NY grubu HP dokularında Sham grubuna kıyasla anlamlı derece yüksek olduğu tespit edilmiştir. Öte yandan, ilgili yazılım c-Fos gen ekspresyonu için hiçbir biyolojik numune açısından CT yani ekspresyon değeri vermemiştir. Dolayısıyla c-Fos gen ekspresyonu açısından bir değerlendirme yapılamamıştır.



**Şekil 4.11.** HP dokusunda RT-PCR ile gerçekleştirilen bazı genlerin ekspresyonuna ait CT grafik görüntüleri

Şekil 4.11’de görüldüğü üzere yazılımın verdiği CT raporunda, RT-PCR reaksiyonu neticesinde elde edilen CT grafiklerinin kalitesi yeterli görülmüş ve CT değerleri istatistiksel olarak değerlendirmeye alınmıştır.

**Tablo 4.3.** Endojen kontrol geni Hprt’ye kıyasla hedef genlerde elde edilen dCT ekspresyon değerlerinin normalite sonuçları

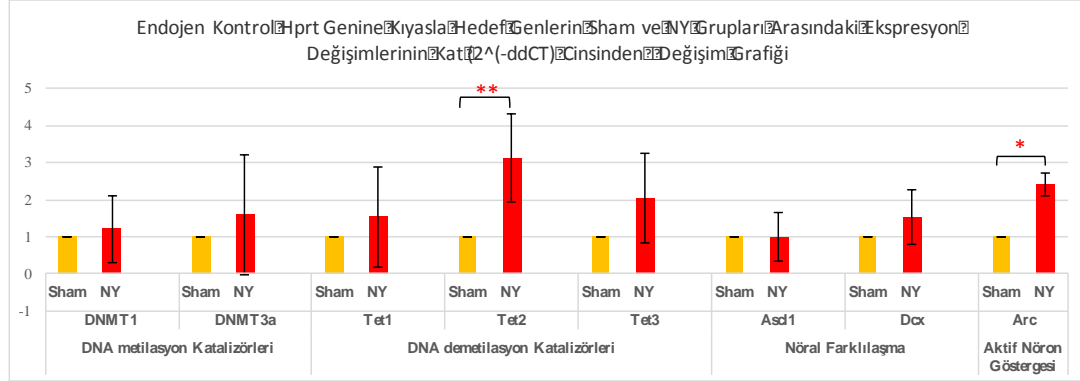
Gen İsmi	DNMT1	DNMT3a	Tet1	Tet2	Tet3	Ascl1	DCX	Arc
Kolmogorov-Smirnov	0,2	0,112	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,175
Shapiro-Wilk	0,823	0,120	0,622	0,958	0,691	0,131	0,516	0,079

Tablo 4.3’ e göre, HP dokusunda RT-PCR ile elde edilen CT değerlerinin normal dağılıma uyduğu ( $p \geq 0,05$ ) tespit edildi.

**Tablo 4.4.** Sham ve NY HP dokuları arasında endojen kontrol geni Hprt’ye kıyasla hedef genlerde elde edilen kat ( $2^{-ddCT}$ ) cinsinden değişim ve istatistiksel olarak anlamlılık tablosu

Gen İsmi	DNMT1	DNMT3a	Tet1	Tet2	Tet3	Ascl1	DCX	Arc
Sham Grubuna Kıyasla NY Grubundaki Kat Değişimi	1,21	1,59	1,53	3,12	2,03	0,99	1,52	2,39
Student-t Testi Anlamlılık Değeri (p)	0,966	0,996	0,979	0,0018	0,247	0,583	0,432	0,036

Gruplar arasında Sham grubuna kıyasla NY grubunda Tet2 ve Arc genleri ekspresyon seviyelerinde 3,12 ve 2,39 kat artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir ( $p \leq 0,05$ ).



**Şekil 4.12.** Sham grubu HP dokularına kıyasla NY grubu dokularda, Hprt geni baz alındığında hedef genlerdeki değişim grafiği.

Tet2 ve Arc gen ekspresyonları dışında hiçbir hedef gen ekspresyonunda gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir değişim görülmemiştir ( $p > 0,05$ ). Tet2 ve Arc gen ekspresyonları açısından gruplar arasındaki istatistiksel anlamlılık Tablo 4.12'de verilmiştir. \*=( $p \leq 0,05$ ); \*\*=( $p \leq 0,005$ ).

## 5. TARTIŞMA

Bu çalışmada, fareler üzerinde oluşturulan NY sırasında ortaya çıkması muhtemel davranışsal bozukluklar davranışsal testler kullanılarak incelenmiş, buna paralel HP içerisindeki nöronal aktifleşme ve DNA metilasyon/demetilasyon dinamikleri akım sitometrik ve RT-PCR yöntemleri ile araştırılmıştır.

### 5.1. Sham ve NY Grupları Arasında Vücut Ağırlığı Durumlarının Değerlendirilmesi

Çalışmamızda 12 gün boyunca farelere günde üçer kez vücut ağırlıklarına göre 2 mg/kg dozunda nikotin uygulanmış ve son uygulamadan sonra 24 saat bekleyerek yoksunluk modeli oluşturulduğu kabul edilmiştir. Deneye başladığımız ilk gün vücut ağırlıkları denk olan Sham ve NY grubu farelerin, nikotin uygulanan 12 gün boyunca ve yoksunluğun oluşturulduğu 13. günde vücut ağırlıkları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir (Şekil 4.1). Literatürde sigara içiciliğinin bırakılmasıyla birlikte gelişen NY'nda huzursuzluk, uykusuzluk, stres, anksiyete, konsantrasyon güçlüğü vb. davranışsal şikayetlere ek olarak vücut ağırlığında anormal artış şeklinde ortaya çıkan sağlık problemleri olabildiği rapor edilmiştir [42, 43]. Bazı çalışmalarda, sigara kullanan bireylerin, aynı yaş ve cinsiyette sigara kullanmayan bireylerden daha düşük vücut ağırlığına sahip olduğu [137] ve sigaranın bırakıldığı durumlarda vücut ağırlığı artışları gözlemlendiği rapor edilmiştir [138]. Bunun yanı sıra, nikotin maruziyeti ve yoksunluk durumlarında insanlarda olduğu gibi kemirgenlerde de beslenme alışkanlıklarının değişmesine bağlı olarak vücut ağırlığı üzerinde oldukça geniş bir ölçekte değişimler gözlemlendiği bildirilmiştir (Tablo 5.1). Aşağıdaki tablo incelendiğinde [65, 66, 139-141] deney hayvanlarında nikotin maruziyetinin vücut ağırlığı üzerindeki etkileri kullanılan deney hayvanına, uygulanan doz, süre vb. faktörlere bağlı olarak değişkenlik gösterebilmektedir. Çalışmamızda ise nikotin uygulamasının vücut ağırlığı üzerinde anlamlı bir değişiklik oluşturmaması aşağıdaki tablo içerisindeki profil ile uyumluluk göstermektedir.

**Tablo 5.1.** Nikotin maruziyeti ve yoksunluğu çalışmalarında ortaya çıkan vücut ağırlığı değişimleri ile ilgili literatür özeti [65, 66, 139-141].

(K: Kontrol grubu, N: Nikotin maruziyeti grubu, NY: Nikotin yoksunluğu grubu, (+): Vücut ağırlığı değişimleri açısından artış, (-): Vücut ağırlığı değişimleri açısından azalma, (X): Vücut ağırlığı değişimleri açısından gruplar arası fark yoktur, (Ø): İlgili gruplar çalışılmamıştır).

Literatür	Nikotin Uygulanan Cinsiyet/Tür/Soy Uygulama Süresi/ Doz	Vücut Ağırlığı Değişimi			
		İstatistiksel Anlamlılık Oranı			
		K	N	K	NY
Falkeborn ve ark. 1981	Sprague Dawley Sıçan/ 28 gün/ 4 mg/kg	+	-	-	+
Ijomone ve ark. 2014	Wistar sıçan/ 28 gün/ 0,25 – 2 - 4mg/kg	+	-	Ø	
Grunberg ve ark. 1987	Sprague Dawley Dişi Sıçan/ 16 gün/ 12mg/kg	+	-	X	
	Sprague Dawley Erkek Sıçan/ 16 gün/ 12mg/kg			-	+
Price ve ark. 2014	C57BL/6 J fare/ 28 gün/24mg/kg	X		Ø	
Iniquez ve ark. 2009	Sprague Dawley sıçan/15 gün/ 0,16-0,32-0,64mg/kg	X			
Abreu-Villaça ve ark. 2007	C57BL/6 fare/ 15 gün/ 50mg/kg	+	-	Ø	

## 5.2. Davranışsal Testlerden Elde Edilen Bilgilerin Değerlendirilmesi

Çalışmamızda oluşturulan yoksunluğun fareler üzerindeki davranışsal etkisini görmek için ATT ve YALT deneyleri gerçekleştirilmiştir. Elde ettiğimiz davranışsal verilere göre NY grubu hayvanların, ATT’nde Sham grubu denklere kıyasla kat edilen toplam mesafe, hızları ve merkezde geçirdikleri sürenin toplam test süresine oranı açısından anlamlı bir farklılıkta performans göstermedikleri ( $p>0,05$ ) tespit edilmiştir (Şekil 4.1, 4.2, 4.3 ve 4.4). YALT’nde ise açık ve kapalı kollarda geçirilen süreler açısından gruplar arasında karşılaştırma yapıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür (Şekil 4.5 ve 4.6). Literatürde ATT testinde kat edilen mesafe, ortalama hız gibi parametreleri lokomotor aktivite kabiliyetini, merkezde geçirilen sürenin ise anksiyolitik (anksiyete azalışı) ya da tam tersi anksiyojenik (anksiyete artışı) gibi davranışsal durumları yorumlamak için kullanıldığı bilinmektedir [64, 65, 143]. YALT’nde ise açık (daha rahat yani daha az anksiyete içeren) ve kapalı kollarda (yüksek

anksiyete yani daha fazla stres içeren) geçirilen sürelerin tüm test süresine oranları ATT'ndeki gibi davranış durumlarını yansıtan belirteçler olarak kullanılabilir [65, 119, 144].

Açık alan ve YALT paradigmalarından alınan verilere göre, oluşturduğumuz yoksunluk modelinde NY grubu farelerimizin naif Sham grubu deneklerine kıyasla benzer (anksiyete ya da anksiyolitik yönde bir farklılık olmayan) davranışsal durumda oldukları tespit edilmiştir.

Literatürdeki nikotin maruziyeti ve NY çalışmaları incelendiğinde, davranış testlerinde deney hayvanlarının anksiyolitik/anksiyojenik durumlarıyla ilgili çok yönlü bilgiler mevcuttur. Literatürdeki çalışmaları daha sağlıklı değerlendirebilmek adına bu testlerle ilgili bazı teknik bilgiler hakkında zihin aritmetiği yapmanın yararlı olacağını düşünmekteyiz. Örneğin; bir NY modelinde, NY grubu hayvanların kontrol grubu deneklerine kıyasla merkezde daha az süre geçirmeleri, kontrollerine kıyasla daha fazla anksiyete yani stres içerisinde oldukları şeklinde yorumlanabilirken; daha fazla vakit geçirmeleri ise anksiyolitik yani daha az stresli ya da daha fazla rahatlamış şeklinde yorumlanabilir [65, 119, 143]. Benzer şekilde YALT deneylerinde NY deneklerinin kontrollerine kıyasla açık kolda daha az süre geçirmeleri, kontrollerine kıyasla daha fazla anksiyete yani stres içinde buldukları; daha fazla süre geçirmeleri ise deneklerine kıyasla daha rahat yani anksiyolitik bir durumda oldukları şeklinde yorumlanabilir [65, 119, 145].

Önceki kısımlarda da vurgulandığı üzere, NY modellerinde kullanılan deneğin türü, uygulanan nikotinin dozu ve süresine göre ATT ve YALT'lerinde söz konusu parametreler açısından çok yönlü davranışsal durumlar oluşabildiği rapor edilmiştir (Tablo 5.2) [48, 51, 60, 63-66, 119, 145, 149- 151]. Daha ayrıntılı incelendiğinde, aynı tür ve benzer dozlar, ya da benzer dozlar ve farklı türler kullanılarak oluşturulan NY modellerinde ATT ve YALT parametrelerine göre birbirlerinin tam tersi davranışsal durumların rapor edildiği görülmektedir [65, 119, 144, 146, 147]. Bu noktada akla gelen ilk sorulardan birisi, YALT ve ATT deney parametrelerine göre anksiyojenik ya da anksiyolitik yönünde değerlendirilen sonuçların, kandaki kortizol ve kortikostreoid seviyelerinin belirlenmesi gibi fizyolojik kontroller ile desteklenip desteklenmediğidir. Fakat biz de dahil olmak üzere birçok çalışmada söz konusu fizyolojik kontrollerin oluşturulmadığı bilinmektedir. Söz konusu fizyolojik kontrollerin oluşturulduğu çalışmalar incelendiğinde ise bir takım çelişkiler olduğu görülmüştür. Örneğin; Varani ve ark. erkek BALB/C fareler üzerinde oluşturduğu NY modelinde, NY grubu ile kontrol grubu hayvanların YALT testine göre benzer anksiyete durumlarına sahip olduğunu fakat kandaki stres faktörlerinin bunun aksini gösterdiğini bildirmişlerdir [50]. Bu çalışmada davranış testleri sonunda her iki grubumuza ait hayvanlardan beyin dokuları çıkarılmadan önce, derin anestezi altındalar iken, kardiyal kan örnekleri toplanmış, bu örneklerden ise denk hacimlerde kan serum ve plazma elde edilip, derin dondurucuda muhafaza edilmiştir. Hayvanlar sakrifiye edilmeden bu kan numunelerin elde edilmesinin amacı

söz konusu stres faktörlerinin ve/veya nikotin seviyelerinin kanda oranlarını belirleme gereksinimi için olmuştur. Buna göre ilk etapta, söz konusu analizlerin tarafımızdan neden gerçekleştirilmediği sorusu akla gelebilir. Öyle ki, bu tip analizleri gerçekleştirmek için muhtemel analiz yöntemlerinden en doğrusunun seçilmesi sağlıklı bir değerlendirme için büyük öneme sahiptir. Çoğu araştırmacı ticari olarak elde edilen ELISA kitleri yardımıyla bu tip analizleri gerçekleştirebilmektedir. Öte yandan, bu yöntemin ilgili faktörleri belirlemede kendi başına yeterli olup olmayacağı ile ilgili tartışmalarda mevcuttur [148]. Ayrıca ticari olarak temini oldukça maliyetli olan bu kitlerin, mevcut teknik tartışmalar da göz önünde bulundurulduğunda elde edilmesine, tez projemiz dışı kaynaklara bağımlılıktan dolayı tereddütle yaklaşmış ve ikinci plana alınmıştır.

Çalışmamızın sonuçları ele alındığında; 1-ATT'nde kat edilen toplam mesafe açısından gruplar arasında anlamlı bir fark tespit edilmemesi 2-YALT testinde elde edilen açık kolda kalma sürelerinin arasında fark görülmemesi sonuçları NY grubu deneklerimizin anksiyojenik/anksiyolitik yöndeki davranış durumlarının naif kontrollere kıyasla farklılık göstermediğini işaret etmektedir. Aynı davranış durumlarının ölçülmesinde kullanılan iki farklı testte de benzer yönde sonuçlar elde edilmesi, oluşturduğumuz modelin kendi içerisindeki tutarlılığını göstermektedir. Literatürdeki çok yönlü sonuçlar ele alındığında çalışmamızın sonuçları literatürle kısmen örtüşmektedir [64, 65].

Özetle, birçok içsel ve çevresel faktöre bağlı olarak değişkenlik gösterdiği anlaşılan NY durumunun davranışsal testlerin yanı sıra fizyolojik, hücresel ve moleküler düzeyde argümanlarla desteklenmesinin daha sağlıklı olduğu açıktır.



**Tablo 5.2.** Nikotin yoksunluğu çalışmalarında ortaya çıkan farklı davranışsal durumlar ile ilgili literatür özeti [48, 51, 60, 63-66, 119, 145, 149- 151].

(K: Kontrol Grubu, NY: Nikotin yoksunluğu grubu, Omp: Osmotik pompa ile nikotin enjeksiyon yöntemi, Sc: Subkutanöz (deri altı) nikotin enjeksiyon yöntemini ifade etmektedir. (+): İlgili davranışsal durumlar açısından Artış, (-): İlgili davranışsal durumlar açısından Azalma, (X): İlgili davranışsal durumlar açısından gruplar arası fark yoktur, (Ø): İlgili davranış deneyi uygulanmamıştır).

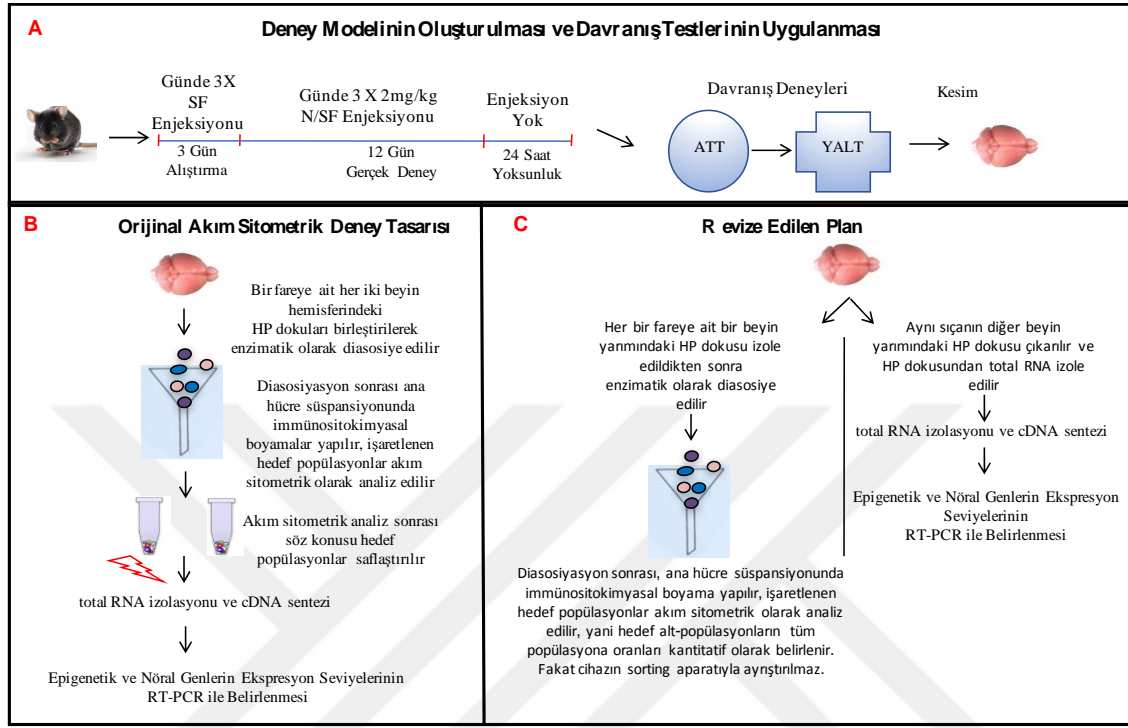
Literatür	Seçilen Cinsiyet/Tür/Soy/Uygulama süresi/Uygulama Yöntemi	Davranış Deneylerinin Yapıldığı Gün	NY' nu Ölçmek İçin Uygulanan Davranış Deneyleri							
			YALT		AAT		KŞT		ZYT	
			Açık kollarda geçirilen zaman		Merkezde geçirilen süre ve Lokomotor aktivite		Anksiyete durumu			
			İstatistiksel Anlamlılık Oranı							
K	NY	K	NY	K	NY	K	NY			
Qix ve ark. 2016	*Sprague Dawley Sıçan *3,16mg/kg*28gün *omp	3 hafta sonra	+	-	+	-	Ø	Ø		
Slawecki ve ark. 2003	*Sprague Dawley Sıçan *5mg/kg *5 gün *Transdermal	17-19 gün sonra	Ø		X		Ø	Ø		
Iniquez ve ark. 2009	*Sprague Dawley Sıçan *0,16-0,32-0,64mg/kg *15 gün *sc	24 saat sonra						X		
		30 gün sonra	X		X		Ø	-	+	
Holiday ve ark. 2016	*C57BL/6 Fare *12,6mg/kg*12 gün *omp	30 gün sonra	-	+	Ø		Ø	-	+	
Raybuck ve Gould 2009	*C57BL/6J Fare *6 mg/kg *12 gün *omp	24 saat sonra			Ø		-	+	Ø	
Abreu-Villaça ve ark. 2007	*C57BL/6 Fare *15 gün *oral *50µg/mL	5 gün sonra	-	+	Ø		Ø	Ø		
Pandey ve ark. 2001	*Sprague Dawley Sıçan *2 mg/kg *10gün *sc	18 saat	+	-	Ø		Ø	Ø		
Jackson ve ark. 2008	*C57BL/6 Fare *10mg/kg *14gün *omp	18 saat	-	+	Ø		Ø	Ø		
Damaj ve ark. 2003	*C57BL/6J Fare *24mg/kg*14gün *omp	24 saat	+	-	Ø		Ø	Ø		
Gould ve ark. 2015	*C57BL/6J Fare *6,3 mg/kg *4gün *omp	24 saat			Ø		-	+	Ø	
Wilkinson ve Gould 2013	*C57BL/6 Fare *18 mg/kg *12 gün *omp	24 saat			Ø		-	+	Ø	
Motaghinejad ve ark. 2016	*Sprague Dawley Sıçan *6,3 mg/kg *12gün *omp	31- 35 gün	+	-	+	-	Ø	Ø		
Davis ve Gould 2009	*C57BL/6 Fare *6mg/kg*12 gün *omp	24 saat			Ø		-	+	Ø	
Portugal ve ark. 2012	*C57BL/6J Fare *6,3 mg/kg *12gün *omp	24 saat			Ø		-	+	Ø	
Bu çalışma	*C57BL6 Fare *2 mg/kg 12 gün/günde 3 kez	24 saat	X		X		Ø	Ø		

### 5.3. Akım Sitometrik DeneYlerin Değerlendirilmesi

Özetlemek gerekirse, Sham ve NY gruplarına ait HP dokuları enzimatik olarak tekli hücre süspansiyonuna dönüştürülmüş, NeuN ve c-Fos antikoları kullanılarak olgun ve aktif nöronları işaretlenmiş ve daha sonra ise floresan aktive akım sitometri cihazında bu popülasyonlar hem saflaştırılmış hem de tüm popülasyon içerisindeki yüzdesel oranları belirlenmiştir. Akım sitometrik saflaştırma gerçekleştirildikten sonra pasif =% NeuN-(+)/c-Fos-(-) ve aktif=% NeuN-(+)/c-Fos-(+) gruplar olarak isimlendirdiğimiz alt popülasyonlar her bir hayvan için birer tüpe hücre süspansiyonu şeklinde toplanmıştır. Bu tüplerden ivedimle total RNA elde edilmiş ve tüm RNA örneklerinden eş zamanlı olarak cDNA sentez edilip; hedef genlerin (DNMT1, DNMT3a, Tet1, Tet2, Tet3, Ascl1, Dcx, c-Fos ve Arc) ekspresyon seviyelerini Sham ve NY grupları arasında karşılaştırmak için RT-PCR analizi gerçekleştirilmiştir. Çalışmamızda, akım sitometrik olarak saflaştırılan nöral popülasyonlarda epigenetik belirteçlere ait genlerin ekspresyon seviyelerini gruplar arasında mukayese edilmesi amaçlanmıştır. Fakat bulgular bölümünde (4.6) bahsedildiği ve Şekil 4.10'da kanıt sunulduğu üzere, saflaştırdığımız popülasyonlardan elde ettiğimiz cDNA numuneleri ile CT değeri alabilecek kalitede sonuç alınamamıştır. RT-PCR analizinin değerlendirebilecek sonuç vermemesi saflaştırma ile elde edilen popülasyonlardaki hücre sayısının azlığı olarak görülmektedir. Öyle ki, saflaştırma ile elde ettiğimiz popülasyonların sayısı 1000-10000 arasında değişkenlik göstermektedir. Söz konusu skaladaki hücre hacmi genel birçok biyolojik araştırmadaki total RNA izolasyon çalışması için oldukça düşük olarak kabul edilebilir. Bir karşılaştırma yapmak gerekirse erişkin bir fare beyin hemisferi içerisinde çıkarılan 10-20 mg ağırlığındaki tek bir HP dokusu 5-10 milyon kadar hücre ihtiva etmektedir. Böyle bir karşılaştırma içerisinde, maksimum 10000 hücreden verimli RNA elde etmenin zor olabileceği aşıkardır. Kullandığımız RNA izolasyon kitinin kapasitesi bu hücre sayısı profiline uymakla birlikte, RNA izolasyonunun çok çeşitli aşamalarında sorun yaşanmış ve olması mümkün görülmektedir. Özellikle, ampirik tecrübelerimizce, birçok santrifüj aşaması içeren izolasyon protokolünde sıkıntılar olma ihtimali oldukça yüksektir. Öyle ki hücre/numune hacminin verimli olduğu izolasyon protokollerindeki santrifüj işlemleri neticesinde deney tüplerinin dibinde gözle görülebilir pellet oluşmaktadır. Yine tecrübemiz gereği, gözle görülebilecek minimal seviyede bir pellet oluşabilmesi için en az birkaç milyon hücre veya dengi doku izolatu olması gerekmektedir. Çalışmamızda ise akım sitometri cihazının da verdiği raporlar neticesinde maksimum 10000 sayıda hücre tüpler içerisinde saflaştırılabilmıştır. Şaşırtıcı olmayacak şekilde, izolasyon protokolünün hiç bir aşamasında gözle görülebilen bir pellet tespit edilememiştir.

Yaşanan bu sıkıntı neticesinde, yeni bir yol haritası çizilmiştir. Buna göre her bir hayvanın bir beyin yarımındaki HP akım sitometrik analizle popülasyon yüzdesi belirlemek için

(safılaştırma yapmadan) diğere hemisferdeki HP ise total RNA izole edip, RT-PCR analizi yapmak için kullanılmıştır. Yapılan stratejik değışikliğı daha iyi tarif etmek üzere aşağıdaki şematik çizim oluşturulmuştur (şekil 5.1).



**şekil 5.1.** Deneyel tasarımda gerçekteşirdiğimiz stratejik planlar.

(A-Deney modelinin oluşturulması ve davranış testlerinin uygulanması, B-Orijinal akım sitometrik deney tasarısı, C-Revize edilen plan).

### 5.3.1. Akım Sitometrik Analizle Belirlenen Nöral Popülasyon Oranlarının Değerlendirilmesi

Sham ve NY grubu farelerinde akım sitometrik analiz ile pasif ve aktif nöron popülasyon yüzdesel oranlarının arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir (şekil 4.7 ve 4.8). Literatür incelendiğinde, NY modellerinde c-Fos ve Arc gibi genlerin kodladığı proteinlerin immünohistokimyasal ekspresyonlarını inceleyen çalışmalar görölmektedir [12, 83, 117,152-156] (Tablo 5.3). Bu çalışmalarda elektrofizyolojik olarak aktif yani sinaps yapabilir nöronları belirleyen işaretleyicilerin NY gruplarında kontrol deneklerine kıyasla daha yüksek seviyede eksprese oldukları bildirilmiştir [117, 152, 153]. NY'na bağlı oluşan davranışsal değışimlerin bir yansıması olarak HP'da bu belirteçlerin artması nöronal ateşlenme denilen bir kavram olarak yorumlanmıştır [123, 124]. Akım sitometrik analizle elde ettiğimiz sonuçlar ise söz konusu literatürden farklılık göstermektedir.

**Tablo 5.3.** Nikotin maruziyeti ve yoksunluğu çalışmalarında Nörogenez basamaklarından gözlenen farklı durumlar ile ilgili literatür özeti [12, 83, 117,152-156]  
(K: Kontrol grubu, N: Nikotin maruziyeti grubu, NY: Nikotin yoksunluğu grubu, (+) : Vücut ağırlığı değişimleri açısından artış, (-): Vücut ağırlığı değişimleri açısından azalma, (X): Vücut ağırlığı değişimleri açısından gruplar arası fark yoktur, (Ø): İlgili gruplar çalışılmamıştır).

Literatür	Nörogenez basamakları için seçilen işaretleyiciler									
	GFAP		Ki67		PSA-NCAM /DCX		NeuN		c-Fos	
	Nöral kök hücre oluşumu ve farklılaşma		Proferilasyon (Çoğalma)		Nöronal Olgunlaşma ve Farklılaşma		Nöronal Aktifleşme			
	İstatistiksel Anlamlılık Oranı									
	K	NY	K	NY	K	NY	K	NY		
<b>Faillace ve ark. 2015</b>	X		Ø			X		Ø		
<b>Mahar ve ark. 2012</b>	Ø		X			X		Ø		
<b>Cohen ve ark. 2015</b>	Ø		-	+		-	+	Ø		
<b>Abrous ve ark. 2002</b>	X		-	+		X		Ø		
<b>Csabai ve ark. 2016</b>	Ø		Ø			+	-	Ø		
<b>Bachtell ve ark. 2007</b>	Ø		Ø			Ø		-	+	
<b>Sodestrom ve ark. 2007</b>	Ø		Ø			Ø		-	+	
<b>Montana ve ark. 2015</b>	Ø		Ø			Ø		-	+	
<b>Bu çalışma</b>	Ø		Ø			Ø		-	+	

### 5.3.2. Akım Sitometrik Saflaştırma Verilerine Göre Belirlenen Nöral Popülasyon Oranlarının Değerlendirilmesi

Çalışmamızda her seferinde 10000 hücrenin okutulduğu akım sitometrik analiz sonuçlarına göre c-Fos eksprese eden yani nöronal olarak aktifleşen hücre popülasyon yüzdesi NY grubunda Sham kontrollere kıyasla anlamlı değişim göstermemiştir. Bunun üzerine, daha önce her bir seferinde bir milyona yakın hücrenin akım sitometrik olarak taratıldığı saflaştırma verilerinin analiz edilmesi yönünde karar verilmiştir. Buna göre öncelikle Sham grubu içerisinde Neun (+)/c-Fos (+) işaretli aktif nöron sayısı tüm olgun nöron sayısına yani Neun

(+)/c-Fos (+) ve Neun (+)/c-Fos (-) işaretli popülasyonlarının toplam sayısına oranlanmıştır. Bu oran kontrol grubumuzdaki olgun ve aynı zamanda aktif olan tüm nöronların, diğer tüm olgun nöronlara olan yüzdesel oranını ifade etmektedir. Aynı işlem NY grubu içinde gerçekleştirilmiş ve bu oran iki grup arasında karşılaştırıldığında NY grubu fare HP'larında aktif nöronların tüm olgun nöronlara oranının Sham grubuna kıyasla daha yüksek ( $p=0,044$ ) olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.9). Temel sitometrik analiz sonuçlarında gruplar arasında farklılık gözlenmezken, saflaştırma verilerine göre farklılık gözlenmesi ilerleyen cümlelerdeki gibi açıklanabilir. Basit akım sitometrik analiz yapılırken çok süre almaması için analiz eşik değeri 10000 hücre sayısı ile sınırlanmaktadır. Fakat saflaştırma yapılan deneylerde, yani belirli bir hücre grubunun, tek bir tüp içerisine toplandığı ve bu popülasyonlardan daha ileri moleküler analizlerin icrasının tasarlandığı deneylerde maksimum sayıda hücre analiz edilmeye çalışılmaktadır. Bu sebeple çalışmamızda da her bir saflaştırma işlemi için cihazın sitometrik olarak taradığı toplam hücre sayısı, temel sitometrik analiz için eşik değeri olan 10000 hücre sayısının onlarca katı düzeyinde ölçülmüştür. Dolayısıyla elde edilen akım sitometrik verilerimiz ilk yapılan temel analize kıyasla daha güvenilir seviyededir. Sonuç olarak, saflaştırma verilerinin istatistiksel olarak analiz edilmesiyle, NY grubu fare HP'larında kontrollere kıyasla nöronal aktifleşme artışı literatürdeki immünohistokimyasal bilgilerin yönüyle örtüşmektedir.

Öte yandan, başka hiçbir NY çalışmasında akım sitometrik analiz ile aktif nöron popülasyonu belirlendiğine dair bilgiye rastlanmamıştır. Hedef hücrelerin belirlenmesi için kullanılabilecek doku kesitleri üzerinde yapılan immünohistokimyasal işaretleme ve akım sitometrik analiz yöntemlerinin güçleri karşılaştırıldığında birbirlerine kıyasla birtakım avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır. Öncelikle iki yöntemin de ortak yönleri antikor antijen ilişkisine bağlı immünohistokimyasal bir yöntem olmalarıdır. Yani gösterilmek/ sayılmak/ belirlenmek istenen hücreler spesifik antikorlar kullanılarak işaretlenirler. İmmünohistokimya yönteminde işaretlenen hücreler mikroskop altında histolojik olarak görüntülenirken, akım sitometrik yöntemde floresan olarak işaretlenmiş hücreler sitometri cihazının içerisindeki spesifik lazerler yardımıyla seçilirler. İmmünohistokimyasal yöntemin diğerine kıyasla en büyük avantajı, işaretlenen hücrelerin dokunun üzerinde net yerini ve diğer histolojik tabakalardaki hücrelerle lokal ilişkilerinin mikroskobik olarak görüntüleyebilmektir. Sitometrik yöntemde ise, ilgili doku enzimatik olarak bir hücre kokteyline çevrildiği için işaretlenen hücrelerin görsel ve histolojik ayrımını yapmak mümkün değildir. Ayrıca, immünohistokimyasal işaretlemede sayısal olarak doğru bir ölçüm yapabilmek ancak çok meşakkatli stereolojik yöntemlerin uygulanmasıyla mümkün olabilmektedir, yine de tam bir kantitasyon yapmak teknik olarak mümkün değildir, daha ziyade semi-kantitatif düzeyde veriler elde edilmektedir. Akım sitometrik yöntemde ise tüm popülasyon içerisindeki işaretlenen hücre sayısını tam netlikte belirlemek mümkündür, bu nedenle akım sitometrik olarak elde edilen veriler tam

kantitatif olarak kabul edilebilir. İki yöntem karşılaştırılırken değerlendirilmesi gereken önemli bir faktör ise, immünohistokimyasal yöntem birçok araştırma laboratuvarında uygulanabilirken, akım sitometrik imkanın her merkezde olmayışıdır. Çok pahalı bir cihaz olması nedeniyle, bu cihaz her araştırma merkezinde bulunmamaktadır. Ayrıca bulunsa bile çok kozmopolit hücresel çeşitliliğe sahip beyin dokusundan sağlık analiz yapabilmek ancak hatırı sayılır bir teknik tecrübeye mümkün görülmektedir. Ekibimiz iki farklı TÜBİTAK projesinde son beş yıldır beyin dokusu üzerinde kazandığı akım sitometrik tecrübeyi bu tez çalışmasına yansıtmıştır.

#### **5.4. Hipokampus Dokularından Elde Edilen Gen Ekspresyonu Verilerinin Değerlendirilmesi**

Yukarıdaki kısımlarda açıklandığı üzere saflaştırılan popülasyonlar kullanılarak gerçekleştirilen RT-PCR sonucunda CT ekspresyon değeri elde edilememiş ve bunun üzerine deney tasarısı revize edilerek tüm HP dokuları üzerinde RT-PCR analizi yapılmasına karar verilmişti (Şekil 4.10). Bunun üzerine HP dokularında gerçekleştirilen RT-PCR analizleri çok büyük ölçüde kaliteli yani istatistiksel olarak analiz edilebilecek netlikte CT değerleri vermiştir.

Bu analiz neticesinde Hprt endojen geninin ekspresyon seviyesi baz alındığında Sham ve NY grupları HP dokularında DNMT1, DNMT3a, Tet1, Tet3, Ascl1 ve Dcx genleri ekspresyon seviyeleri açısından anlamlı bir değişim gözlenmemiştir ( $p>0,05$ ). Öte yandan, Tet2 ve Arc gen ekspresyonlarının NY grubunda kontrollere kıyasla anlamlı artış gösterdiği tespit edilmiştir (Tablo 4.4) ve (Şekil 4.12). Öte yandan, 2 kez tekrar etmemize rağmen c-Fos geninin RT-PCR ile ekspresyon analizi CT değeri vermemiştir. Bu problem ticari olarak temin ettiğimiz farelerdeki c-Fos genine özgü primer dizilerindeki bir yanlışlığa ya da bozulmuş olduklarına bağlanmıştır. Eğer kullanılan diğer ikincil seviyedeki kimyasal sarflarda veya elde edilen cDNA örneklerinde bir hata ve/veya bozulma olsaydı, diğer 8 hedef ve 2 adet kontrol genin ekspresyon seviyeleri görüntülenemezdi. Yine de ekspresyon seviyesini sağlıklı olarak tespit edebildiğimiz Arc geni, c-Fos gen ekspresyon bilgisinin yokluğunu büyük ölçüde kapatmaktadır. Öyle ki iki genin veya genin kodladığı proteinlerin benzer bir eğilimde aktif nöronlarda ortak şekilde eksprese olduğunu gösteren birçok çalışma bulunmaktadır [153, 157]. Sonuç olarak aktifleşen nöronlarda verimli biçimde eksprese olan, c-Fos ile birlikte en bilindik erken cevap geni sınıfı içerisinde bulunan Arc geninin ekspresyonu NY grubu fare HP'larında kontrollere kıyasla anlamlı düzeyde artış göstermiştir. Bu artış yukarıdaki bölümlerde (5.3) tartışıldığı üzere NY durumunda HP'da gerçekleşen nöronal ateşlenme ya da aktif nöron popülasyon oranlarının arttığı yöndeki literatür bilgileriyle örtüşmektedir. Arc geni ekspresyonundaki artış verisi, akım

sitometrik saflaştırma ile elde ettiğimiz, NY'da gözlenen aktif nöron popülasyon yüzdesindeki artışla da uyusmaktadır.

### 5.5. Epigenetik Dinamiklere Ait Gen Ekspresyonu Verilerinin Değerlendirilmesi

DNA metilasyonunu katalizleyen DNMT1 ve DNMT3a enzimlerini kodlayan genlerin ekspresyon seviyelerinin yoksunluktan etkilenmediği görülmüştür. DNA demetilasyonu kodlayan üç ana enzimden Tet1/2/3'ten sadece Tet2'yi kodlayan genin ekspresyonunda kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir değişim (üç kat artış) olduğu gözlenmiştir. RT-PCR analizi hassaslığında elde ettiğimiz bulgular, DNA metilasyonunun yoksunluk durumunda değişmediğini işaret etmektedir. Fakat demetilasyon mekanizmasında rol oynayan üç kilit enzimden bir tanesinin ekspresyon seviyesinin artması yoksunluk durumunda DNA demetilasyonunun değişime uğrama ihtimalini ortaya koymaktadır. Çünkü Tet2 geninin ekspresyon seviyesinin artması, bu genin kodladığı Tet2 enzimine ait proteini aynı oranda sentez edeceği anlamına gelmemektedir. Peki bu durum daha derin nasıl araştırılabilirdi? Tet2 geninin kodladığı Tet2 enziminin fonksiyonellik kazanması için bu genin transkripte olduktan sonra translasyona uğraması yani en basit biyoloji kitaplarında da belirtildiği üzere protein sentezi olması gerekmektedir. Bunu tespit etmek için ise immünohistokimya ve western-blot yöntemleri kullanılabilir. Fakat Tet2 proteinini spesifik bir şekilde belirlemek için daha önce ekibimizce de iki alternatif kullanılarak sınanan ticari primer antikörlerin yeterince spesifik olmadığı gözlenmiştir. Öte yandan, olaya varsayımsal olarak yaklaşacak olursak; Tet2 protein ekspresyon seviyesini oldukça spesifik bir primer antikör yardımıyla test etseydik ve bu proteinin NY grubunda kontrollere kıyasla anlamlı düzeyde artmış olduğunu belirleseydik: nasıl bir tartışma ya da değerlendirme yapabilirdik? Tet2 proteinin ekspresyon seviyesindeki artışı gösteren bu varsayımsal veri, Tet2 geninin ekspresyon seviyesindeki anlamlı artışa dair elde edilen veriyeye kıyasla kesinlikle daha değerli olurdu. Ancak, bu bilgi HP dokusundaki tüm hücrelere ait oldukça bir genel bilgi olurdu. Yani, HP dokusu içerisinde çok çeşitli özellikteki on binlerce hücrenin birbirlerinden bağımsız seviyelerde sentez ettiği Tet2 proteininin tek bir kotada toplanması ya da ortalamasının alınması sonucu ortaya çıkardı. Halbuki bu çalışmada özellikle merak ettiğimiz husus HP içerisindeki aktif nöronların DNA metilasyon/demetilasyon profillerinin nikotin yoksunluğundan ne düzeyde etkilendiği idi. Eğer saflaştırdığımız aktif nöronlardan başarılı biçimde RT-PCR gerçekleştirebilseydik, elde ettiğimiz bilgilere kıyasla daha derin düzeyde epigenetik sorular cevaplanabilirdi.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, NY'da ortaya çıkan davranışsal bozukluklar ve kognitif kabiliyetlerdeki zayıflama ya da hasarların altında yatan moleküler patogeneze mekanizmaların epigenetiksel olarak daha derin düzeyde anlaşılması hedeflenmiştir.

Bulgularımız neticesinde;

1. Oluşturduğumuz NY modelinde, davranışsal olarak bir stres durumu olduğu gözlenmemiştir fakat aktif nöronların HP'ta akım sitometrik olarak arttığı gözlenmiştir.

2. Aynı zamanda HP'ta nöronal aktifleşmeyi veren önemli genlerden bir tanesinin seviyesinin arttığı gözlenmiştir.

3. Ayrıca DNA metilasyonunun değişmediği, DNA demetilasyonu ile ilgili parametrelerden bir tanesinin değiştiği görülmüştür.

4. NY'nda DNA metilasyonu değişmezken, NY durumunda DNA demetilasyonunun artması literatürde şuan için henüz olmayan bir bilgidir ve bu konunun daha detaylı bir şekilde araştırılması gerekmektedir.



## KAYNAKLAR

- [1]. General, S. (2014). The health consequences of smoking 50 years of progress: a report of the surgeon general. In *US Department of Health and Human Services*.
- [2]. Benowitz, N. L. (1986). Clinical pharmacology of nicotine. *Annual review of medicine*, 37(1), 21-32.
- [3]. Hughes, J. R., Keely, J., & Naud, S. (2004). Shape of the relapse curve and long-term abstinence among untreated smokers. *Addiction*, 99(1), 29-38.
- [4]. Benowitz, N. L. (2008). Clinical pharmacology of nicotine: implications for understanding, preventing and treating tobacco addiction. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 83(4), 531-541.
- [5]. Kutlu, M. G., Parikh, V., & Gould, T. J. (2015). Nicotine addiction and psychiatric disorders. In *International review of neurobiology* (Vol. 124, pp. 171-208). Academic Press.
- [6]. Pomerleau, O.F.; Turk, D.C.; Fertig, J.B., The effects of cigarette smoking on pain and anxiety. *Addict Behav.* 1984, 9, (3), 265-271.
- [7]. Jacobsen, L. K., Slotkin, T. A., Westerveld, M., Mencl, W. E., & Pugh, K. R. (2006). Visuospatial memory deficits emerging during nicotine withdrawal in adolescents with prenatal exposure to active maternal smoking. *Neuropsychopharmacology*, 31(7), 1550.
- [8]. McLaughlin, I., Dani, J. A., & De Biasi, M. (2015). Nicotine withdrawal. In *The Neuropharmacology of Nicotine Dependence* (pp. 99-123). Springer, Cham.
- [9]. Holliday, E. D., Nucero, P., Kutlu, M. G., Oliver, C., Connelly, K. L., Gould, T. J., & Unterwald, E. M. (2016). Long term effects of chronic nicotine on emotional and cognitive behaviors and hippocampus cell morphology in mice: comparisons of adult and adolescent nicotine exposure. *European Journal of Neuroscience*, 44(10), 2818-2828.
- [10]. Green MR, Mc Cormick CM. Effects of stressors in adolescence on learning and memory in rodent models. *Hormones and behavior*, 2013b;64(2), 364-79.
- [11]. Burgess N, Maguire EA, O'Keefe J. The human hippocampus and spatial and episodic memory. *Neuron*. 2002;35(4):625-641
- [12]. Faillace, M.P.; Zwiller, J.; Bernabeu, R.O., Effects of combined nicotine and fluoxetine treatment on adult hippocampal neurogenesis and conditioned place preference. *Neuroscience*. 2015, 300, 104-115.
- [13]. Cho, K.O.; Kim, S.Y., Effects of brain insults and pharmacological manipulations on the adult hippocampal neurogenesis. *Arch Pharm Res.* 2010, 33, (10), 1475-1488.

- [14]. Shingo, A.S.; Kito, S., Effects of nicotine on neurogenesis and plasticity of hippocampal neurons. *J Neural Transm (Vienna)*. 2005, 112, (11), 1475-1478.
- [15]. Doll, R. (1996). Cancers weakly related to smoking. *British medical bulletin*, 52(1), 35-49.
- [16]. Yamamoto, Y., Isoyama, E., Sofikitis, N., & Miyagawa, I. (1998). Effects of smoking on testicular function and fertilizing potential in rats. *Urological research*, 26(1), 45-48.
- [17]. US Department of Health and Human Services. (2004). The health consequences of smoking: a report of the Surgeon General.
- [18]. Centers for Disease Control and Prevention. (2010). How tobacco smoke causes disease: The biology and behavioral basis for smoking-attributable disease: A report of the surgeon general.
- [19]. Zaniwska, M., Przegaliński, E., & Filip, M. (2009). Nicotine dependence–human and animal studies, current pharmacotherapies and future perspectives. *Pharmacological Reports*, 61(6), 957-965.
- [20]. Pittilo, M., (2000). Cigarette smoking, endothelial injury and cardiovascular disease. *Int. J. Exp. Path.*, (81), 219-230.
- [21]. Dempsey, D., Tutka, P., Jacob, P., Allen, F., Schoedel, K., Tyndale, R. F., & Benowitz, N. L. (2004). Nicotine metabolite ratio as an index of cytochrome P450 2A6 metabolic activity. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 76(1), 64-72.
- [22]. Benowitz, N. L. (2009). Pharmacology of nicotine: addiction, smoking-induced disease, and therapeutics. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 49, 57-71.
- [23]. Hukkanen, J., Jacob, P., & Benowitz, N. L. (2005). Metabolism and disposition kinetics of nicotine. *Pharmacological reviews*, 57(1), 79-115.
- [24]. Wang, M. (2001). Nicotine: The masked killer. *Iowa-University Pres*, 1-9.
- [25]. Karaconji, I.B., (2005). Facts about nicotine toxicity. *Arh High Rada Toxicol*, 56, (4), 363.
- [26]. Zevin, S., Jacob, P., & Benowitz, N. (1997). Cotinine effects on nicotine metabolism. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 61(6), 649-654.
- [27]. Murray, J. B. (1991). Nicotine as a psychoactive drug. *The Journal of psychology*, 125(1), 5-25.
- [28]. Kandel, D. B., & Logan, J. A. (1984). Patterns of drug use from adolescence to young adulthood: I. Periods of risk for initiation, continued use, and discontinuation. *American journal of public health*, 74(7), 660-666.

- [29]. Koob, G. F., & Le Moal, M. (2005). Plasticity of reward neurocircuitry and the 'dark side' of drug addiction. *Nature neuroscience*, 8(11), 1442.
- [30]. Gould, T. J. (2006). Nicotine and hippocampus dependent learning. *Molecular neurobiology*, 34(2), 93-107.
- [31]. Snyder, F. R., & Henningfield, J. E. (1989). Effects of nicotine administration following 12 h of tobacco deprivation: assessment on computerized performance tasks. *Psychopharmacology*, 97(1), 17-22.
- [32]. Kleinman, K. M., Vaughn, R. L., & Christ, T. S. (1973). Effects of cigarette smoking and smoking deprivation on paired associate learning of high and low meaningful nonsense syllables. *Psychological reports*.
- [33]. Bell, S. L., Taylor, R. C., Singleton, E. G., Henningfield, J. E., & Heishman, S. J. (1999). Smoking after nicotine deprivation enhances cognitive performance and decreases tobacco craving in drug abusers. *Nicotine & Tobacco Research*, 1(1), 45-52.
- [34]. Kelley, A. E. (2004). Memory and addiction: shared neural circuitry and molecular mechanisms. *Neuron*, 44(1), 161-179.
- [35]. Setlow, B. (1997). The nucleus accumbens and learning and memory. *Journal of neuroscience research*, 49(5), 515-521.
- [36]. Blum, S., Hebert, A. E., & Dash, P. K. (2006). A role for the prefrontal cortex in recall of recent and remote memories. *Neuroreport*, 17(3), 341-344.
- [37]. Morley BJ. (1986). The interpeduncular nucleus. *Int Rev Neurobiol*. 28: 157-182.
- [38]. Stein, E. A., Pankiewicz, J., Harsch, H. H., Cho, J. K., Fuller, S. A., Hoffmann, R. G., & Bloom, A. S. (1998). Nicotine-induced limbic cortical activation in the human brain: a functional MRI study. *American Journal of Psychiatry*, 155(8), 1009-1015.
- [39]. Jonkman, S., Henry, B., Semenova, S., & Markou, A. (2005). Mild anxiogenic effects of nicotine withdrawal in mice. *European journal of pharmacology*, 516(1), 40-45.
- [40]. Kayaalp, O. (2005). Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji: Hacettepe Taş Yayınları, 851-852.
- [41]. Shiffman, S., West, R. J., & Gilbert, D. G. (2004). Recommendation for the assessment of tobacco craving and withdrawal in smoking cessation trials. *Nicotine & Tobacco Research*, 6(4), 599-614.
- [42]. Hughes, J. R., & Hatsukami, D. (1986). Signs and symptoms of tobacco withdrawal. *Archives of general psychiatry*, 43(3), 289-294

- [43]. Hughes, J. R., Gust, S. W., Skoog, K., Keenan, R. M., & Fenwick, J. W. (1991). Symptoms of tobacco withdrawal: a replication and extension. *Archives of general psychiatry*, 48(1), 52-59.
- [44]. Hughes, J. R. (2007). Effects of abstinence from tobacco: valid symptoms and time course. *Nicotine & Tobacco Research*, 9(3), 315-327.
- [45]. American Psychiatric Association. (2013). *Diagnostic and statistical manual of mental disorders (DSM-5)*. American Psychiatric Pub.
- [46]. Gritz, E. R., Carr, C. R., & Marcus, A. C. (1991). The tobacco withdrawal syndrome in unaided quitters. *Addiction*, 86(1), 57-69.
- [47]. André, J. M., Gulick, D., Portugal, G. S., & Gould, T. J. (2008). Nicotine withdrawal disrupts both foreground and background contextual fear conditioning but not pre-pulse inhibition of the acoustic startle response in C57BL/6 mice. *Behavioural brain research*, 190(2), 174-181.
- [48]. Raybuck, J. D., & Gould, T. J. (2009). Nicotine withdrawal-induced deficits in trace fear conditioning in C57BL/6 mice a role for high-affinity  $\beta 2$  subunit-containing nicotinic acetylcholine receptors. *European journal of neuroscience*, 29(2), 377-387.
- [49]. Portugal, G. S., & Gould, T. J. (2009). Nicotine withdrawal disrupts new contextual learning. *Pharmacology biochemistry and behavior*, 92(1), 117-123.
- [50]. Varani, A. P., Pedrón, V. T., Machado, L. M., Antonelli, M. C., Bettler, B., & Balerio, G. N. (2015). Lack of GABA B receptors modifies behavioural and biochemical alterations induced by precipitated nicotine withdrawal. *Neuropharmacology*, 90, 90-101.
- [51]. Wilkinson, D. S., Turner, J. R., Blendy, J. A., & Gould, T. J. (2013). Genetic back ground influences the effects of withdrawal from chronic nicotine on learning and high-affinity nicotinic acetylcholine receptor binding in the dorsal and ventral hippocampus. *Psychopharmacology*, 225(1), 201-208.
- [52]. Gould, T. J., Wilkinson, D. S., Yildirim, E., Blendy, J. A., & Adoff, M. D. (2014). Dissociation of tolerance and nicotine withdrawal-associated deficits in contextual fear. *Brain research*, 1559, 1-10.
- [53]. Patten, C. A., & Martin, J. E. (1996). Does nicotine withdrawal affect smoking cessation? Clinical and theoretical issues. *Annals of Behavioral Medicine*, 18(3), 190-200.
- [54]. Markou, A., Kosten, T. R., & Koob, G. F. (1998). Neurobiological similarities in depression and drug dependence: a self-medication hypothesis. *Neuropsychopharmacology*, 18(3), 135.
- [55]. Kenny, P. J., & Markou, A. (2001). Neurobiology of the nicotine withdrawal syndrome. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 70(4), 531-549.
- [56]. Isola, R., Vogelsberg, V., Wemlinger, T. A., Neff, N. H., & Hadjiconstantinou, M. (1999). Nicotine abstinence in the mouse. *Brain research*, 850(1-2), 189-196.

- [57]. Malin, D. H., Lake, J. R., Newlin-Maultsby, P., Roberts, L. K., Lanier, J. G., Carter, V. A., & Wilson, O. (1992). Rodent model of nicotine abstinence syndrome. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 43(3), 779-784.
- [58]. Epping Jordan, M. P., Watkins, S. S., Koob, G. F., & Markou, A. (1998). Dramatic decreases in brain reward function during nicotine withdrawal. *Nature*, 393(6680), 76.
- [59]. Hildebrand, B. E., Panagis, G., Svensson, T. H., & Nomikos, G. G. (1999). Behavioral and biochemical manifestations of mecamylamine-precipitated nicotine withdrawal in the rat: role of nicotinic receptors in the ventral tegmental area. *Neuropsychopharmacology*, 21(4), 560.
- [60]. Damaj, M. I., Kao, W., & Martin, B. R. (2003). Characterization of spontaneous and precipitated nicotine withdrawal in the mouse. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 307(2), 526-534.
- [61]. Paolini, M., & De Biasi, M. (2011). Mechanistic insights into nicotine withdrawal. *Biochemical pharmacology*, 82(8), 996-1007.
- [62]. Leach, P. T., Holliday, E., Kutlu, M. G., & Gould, T. J. (2014). Withdrawal from chronic nicotine reduces thyroid hormone levels and levothyroxine treatment ameliorates nicotine withdrawal-induced deficits in hippocampus-dependent learning in C57BL/6J mice. *Nicotine & Tobacco Research*, 17(6), 690-696.
- [63]. Qi, X., Guzhva, L., Yang, Z., Febo, M., Shan, Z., Wang, K. K., & Bruijnzeel, A. W. (2016). Overexpression of CRF in the BNST diminishes dysphoria but not anxiety-like behavior in nicotine withdrawing rats. *European Neuropsychopharmacology*, 26(9), 1378-1389.
- [64]. Slawecki, C. J., Gilder, A., Roth, J., & Ehlers, C. L. (2003). Increased anxiety-like behavior in adult rats exposed to nicotine as adolescents. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 75(2), 355-361.
- [65]. Iniguez, S. D., Warren, B. L., Parise, E. M., Alcantara, L. F., Schuh, B., Maffeo, M. L., & Bolanos-Guzmán, C. A. (2009). Nicotine exposure during adolescence induces a depression-like state in adulthood. *Neuropsychopharmacology*, 34(6), 1609.
- [66]. Abreu-Villaça, Y., Nunes, F., do E Queiroz-Gomes, F., Manhaes, A. C., & Filgueiras, C. C. (2008). Combined exposure to nicotine and ethanol in adolescent mice differentially affects anxiety levels during exposure short term and long term withdrawal. *Neuropsychopharmacology* 33(3), 599.
- [67]. Cumhuri, M., Sargon, M. F., Sürücü, H. S., İlgi, S., Sancak, B., Taner, D., & Çelik, H. H. (2007). *Fonksiyonel nöroanatomi*. ODTÜ Geliştirme Vakfı.
- [68]. Moore, K. L., Persaud, T. V. N. (1998) *The Developing Human*. 6th ed. *WB Saunders Company*, Philadelphia, 477.
- [69]. Andersen, P. (Ed.). (2007). *The hippocampus book*. Oxford university press.
- [70]. Squire, L. R. (2009). The legacy of patient HM for neuroscience. *Neuron*, 61(1), 6-9.
- [71]. Arıncı, K., & Elhan, A. (2006). *Anatomi, Güneş Kitabevi*, 3. Baskı Ankara, 1. 318-321.

- [72]. Standring, S. (2005). *Gray's Anatomy: The Anatomical Basis of Clinical Practice*, edition Elsevier Churchill Livingston.
- [73]. Altman, J., & Das, G. D. (1965). Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *Journal of Comparative Neurology*, 124(3), 319-335.
- [74]. Noonan, M. A., Bulin, S. E., Fuller, D. C., & Eisch, J. (2010). Reduction of adult hippocampal Neurogenesis confers vulnerability in an animal model of cocaine addiction. *Journal of Neuroscience*, 30(1), 304-315.
- [75]. Sahay, A., Wilson, D. A., & Hen, R. (2011). Pattern separation: a common function for new neurons in hippocampus and olfactory bulb. *Neuron*, 70(4), 582-588.
- [76]. Waxman, S. G. (2010). *Clinical neuroanatomy*. McGraw Hill, 240-245.
- [77]. Gloor, P., Salanova, V., Olivier, A., & Quesney, L. F. (1993). The human dorsal hippocampal commissure: an anatomically identifiable and functional pathway. *Brain*, 116(5), 1249-1273.
- [78]. Duvernoy, H. M. (2005). *The human hippocampus: functional anatomy, vascularization and serial sections with MRI*. Springer Science & Business Media.
- [79]. Snell, R. S. (2010). *Clinical neuroanatomy*. Lippincott Williams & Wilkins, 266,308.
- [80]. Netter, F. H. (2008). *Netter Atlas de anatomia humana*. Elsevier Brasil.
- [81]. Purves, D., Augustine, G. J., Fitzpatrick, D., Hall, W. C., LaMantia, A., McNamara, J. O., & Williams, S. M. (2004). *Neuroscience*. Massachusetts. *Publishers Sunderland*.
- [82]. Hall, J. E. (2015). *Guyton and Hall textbook of medical physiology e-Book*. Elsevier Health Sciences, 718-720.
- [83]. Abrous, D. N., Adriani, W., Montaron, M. F., Aurousseau, C., Rougon, G., Le Moal, M., & Piazza P. V. (2002). Nicotine self administration impairs hippocampal plasticity. *Journal of Neuroscience*, 22(9), 3656-3662.
- [84]. Kenney, J. W., & Gould, T. J. (2008). Modulation of hippocampus-dependent learning and synaptic plasticity by nicotine. *Molecular neurobiology*, 38(1), 101-121.
- [85]. Jarvis, M. J. (2004). ABC of smoking cessation: Why people smoke. *BMJ: British Medical Journal*, 328(7434), 277.
- [86]. Metcalfe, C., Smith, G. D., Wadsworth, E., Sterne, J. A., Heslop, P., Macleod, J., & Smith, A. (2003). A contemporary validation of the Reeder Stress Inventory. *British journal of health psychology*, 8(1), 83-94.
- [87]. Gilpin, E. A., Pierce, J. P., Farkas, A. J., & Farkas, A. J. (1997). Duration of smoking abstinence and success in quitting. *Journal of the National Cancer Institute*, 89(8), 572.
- [88]. BAKANLIĞI, S. MADDE BAĞIMLILIĞI TANI ve TEDAVİ KILAVUZU EL KİTABI.

- [89]. Mitsushima, D., Sano, A., & Takahashi, T. (2013). A cholinergic trigger drives learning induced plasticity at hippocampal synapses. *Nature communications*, 4, 2760.
- [90]. Gould, T. J. (2006). Nicotine and hippocampus dependent learning. *Molecular neurobiology*, 34(2), 93-107.
- [91]. Kandel, E. R. (2012). The molecular biology of memory: cAMP, PKA, CRE, CREB-1, CREB-2, and CPEB. *Molecular brain*, 5(1), 14.
- [92]. Lynch, M. A. (2004). Long term potentiation and memory. *Physiological reviews*, 84(1), 87-136.
- [93]. Kutlu, M. G., Tumolo, J. M., Holliday, E., Garrett, B., & Gould, T. J. (2016). Acute nicotine enhances spontaneous recovery of contextual fear and changes c-fos early gene expression in infralimbic cortex, hippocampus, and amygdala. *Learning & Memory*, 23(8), 405-414.
- [94]. Kutlu, M. G., & Gould, T. J. (2016). Nicotinic modulation of hippocampal cell signaling and associated effects on learning and memory. *Physiology & behavior*, 155, 162-171.
- [95]. Kutlu, M. G., & Gould, T. J. (2016). Effects of drugs of abuse on hippocampal plasticity and hippocampus-dependent learning and memory: contributions to development and maintenance of addiction. *Learning & Memory*, 23(10), 515-533.
- [96]. Cells and DNA, Lister Hill National Center for Biomedical Communications U.S. National Library of Medicine National Institutes of Health Department of Health & Human Services Published (12.03.2018). <https://ghr.nlm.nih.gov/>
- [97]. Aimone, J. B., Deng, W., & Gage, F. H. (2011). Resolving new memories: a critical look at the dentate gyrus, adult neurogenesis, and pattern separation. *Neuron*, 70(4), 589-596.
- [98]. Silvestre, D. C. Gil, G. A., Tomasini, N., Bussolino, D. F., & Caputto, B. L. (2010). Growth of peripheral and central nervous system tumors is supported by cytoplasmic c-Fos in humans and mice. *PLoS One*, 5(3), e9544.
- [99]. Andreasen, N. C., & Doğan, Y. B. (2003). *Cesur yeni beyin: Genom çağındaki fetih: ruh hastalıkları*. Okuyan Us, 136-139.
- [100]. Brown, T. A. (2016). *Gene cloning and DNA analysis: an introduction*. John Wiley & Sons.
- [101]. Topaktaş, M., & Rencüzoğulları, E. (2010). *Sitogenetik*. Nobel Yayın Dağıtım.
- [102]. Dawson, M. A., & Kouzarides, T. (2012). Cancer epigenetics: from mechanism to therapy. *Cell*, 150(1), 12-27.
- [103]. Egger, G., Liang, G., Aparicio, A., & Jones, P. A. (2004). Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature*, 429(6990), 457.
- [104]. Sabari, B. R., Zhang, D., Allis, C. D., & Zhao, Y. (2017). Metabolic regulation of gene expression through histone acylations. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 18(2), 90.

- [105]. Arney, K. L., & Fisher, A. G. (2004). Epigenetic aspects of differentiation. *Journal of Cell Science*, *117*(19), 4355-4363.
- [106]. Goldberg, A. D., Allis, C. D., & Bernstein, E. (2007). Epigenetics: a landscape takes shape. *Cell*, *128*(4), 635-638.
- [107]. Choudhuri, S. (2011). From Waddington's epigenetic landscape to small noncoding RNA: some important milestones in the history of epigenetics research. *Toxicology mechanisms and methods*, *21*(4), 252-274.
- [108]. Jones, P. A., & Takai, D. (2001). The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. *Science*, *293*(5532), 1068-1070.
- [109]. Tahiliani, M., Koh, K. P., Shen, Y., Pastor, W. A., Bandukwala, H., Brudno, Y., ... & Rao, A. (2009). Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science*, *324*(5929), 930-935.
- [110]. Jin, S. G., Kadam, S., & Pfeifer, G. P. (2010). Examination of the specificity of DNA methylation profiling techniques towards 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine. *Nucleic acids research*, *38*(11), e125-e125.
- [111]. Wossidlo, M., Nakamura, T., Lepikhov, K., Marques, C. J., Zakhartchenko, V., Boiani, M., ... & Walter, J. (2011). 5-Hydroxymethylcytosine in the mammalian zygote is linked with epigenetic reprogramming. *Nature communications*, *2*, 241.
- [112]. Kolodkin, M. H., & Auger, A. P. (2011). Sex difference in the expression of DNA methyltransferase 3a in the rat amygdala during development. *Journal of neuroendocrinology*, *23*(7), 577-583.
- [113]. Ficz, G., & Gribben, J. G. (2014). Loss of 5-hydroxymethylcytosine in cancer: cause or consequence?. *Genomics*, *104*(5), 352-357.
- [114]. Kogler, L., Müller, V. I., Chang, A., Eickhoff, S. B., Fox, P. T., Gur, R. C., & Derntl, B. (2015). Psychosocial versus physiological stress: Meta-analyses on deactivations and activations of the neural correlates of stress reactions. *Neuroimage*, *119*, 235-251.
- [115]. Cohen, S., & Greenberg, M. E. (2008). Communication between the synapse and the nucleus in neuronal development, plasticity, and disease. *Annual review of cell and developmental biology*, *24*, 183-209.
- [116]. Behr, J., & Nowak, D. (2002). Tobacco smoke and respiratory disease. *World*, *58*(44), 1-20.
- [117]. Bachtell, R. K., & Ryabinin, A. E. (2001). Interactive effects of nicotine and alcohol co-administration on expression of inducible transcription factors in mouse brain. *Neuroscience*, *103*(4), 941-954.
- [118]. Martínez-González, D., Prospéro-García, O., Mihailescu, S., & Drucker-Colín, R. (2002). Effects of nicotine on alcohol intake in a rat model of depression. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *72*(1-2), 355-364.
- [119]. Holliday, E., & Gould, T. J. (2016). Nicotine, adolescence, and stress: A review of how stress can modulate the negative consequences of adolescent nicotine abuse. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *65*, 173-184.



- [120]. Duman, R. S. (2002). Pathophysiology of depression: the concept of synaptic plasticity 1 To be presented at ECNP Barcelona, 5-9 October 2002, during the symposium "A new pharmacology of depression: the concept of synaptic plasticity." *European psychiatry*, *17*, 306-310.
- [121]. La Dage, L. D. (2015). Environmental change, the stress response, and neurogenesis. *Integrative and Comparative Biology*, *55*(3), 372-383.
- [122]. McEwen, B. S. (2007). Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain. *Physiological reviews*, *87*(3), 873-904.
- [123]. Oitzl, M. S., Champagne, D. L., van der Veen, R., & de Kloet, E. R. (2010). Brain development under stress: hypotheses of glucocorticoid actions revisited. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *34*(6), 853-866.
- [124]. Kogler, L., Müller, V. I., Chang, A., Eickhoff, S. B., Fox, P. T., Gur, R. C., & Derntl, B. (2015). Psychosocial versus physiological stress—Meta-analyses on deactivations and activations of the neural correlates of stress reactions. *Neuroimage*, *119*, 235-251.
- [125]. Manning, C. E., Williams, E. S., & Robison, A. J. (2017). Reward network immediate early gene expression in mood disorders. *Frontiers in behavioral neuroscience*, *11*, 77.
- [126]. Febbraro, F., Svenningsen, K., Tran, T. P., & Wiborg, O. (2017). Neuronal substrates underlying stress resilience and susceptibility in rats. *PloS one*, *12*(6), e0179434.
- [127]. Sng, J. C. G., Taniura, H., & Yoneda, Y. (2004). A tale of early response genes. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, *27*(5), 606-612.
- [128]. Bahrami, S., & Drabløs, F. (2016). Gene regulation in the immediate-early response process. *Advances in biological regulation*, *62*, 37-49.
- [129]. Carter, S. D., Mifsud, K. R., & Reul, J. M. (2015). Distinct epigenetic and gene expression changes in rat hippocampal neurons after Morris water maze training. *Frontiers in behavioral neuroscience*, *9*, 156.
- [130]. Stachowiak, M. K., Sar, M., Tuominen, R. K., Jiang, H. K., An, S., Iadarola, M. J., & Hong, J. S. (1990). Stimulation of adrenal medullary cells in vivo and in vitro induces expression of c-fos proto-oncogene. *Oncogene*, *5*(1), 69-73.
- [131]. Herdegen, T., & Leah, J. D. (1998). Inducible and constitutive transcription factors in the mammalian nervous system: control of gene expression by Jun, Fos and Krox, and CREB/ATF proteins. *Brain Research Reviews*, *28*(3), 370-490.
- [132]. Okuno, H. (2011). Regulation and function of immediate-early genes in the brain: beyond neuronal activity markers. *Neuroscience research*, *69*(3), 175-186.
- [133]. Schauwecker, P. E., Ramirez, J. J., & Steward, O. (2000). Genetic dissection of the signals that induce synaptic reorganization. *Experimental neurology*, *161*(1), 139-152.
- [134]. Yoo, A. S., Sun, A. X., Li, L., Shcheglovitov, A., Portmann, T., Li, Y., ... & Crabtree, G. R. (2011). MicroRNA-mediated conversion of human fibroblasts to neurons. *Nature*, *476*(7359), 228.
- [135]. Schmittgen, T. D., & Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative C T method. *Nature protocols*, *3*(6), 1101.

- [136]. Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>ΔΔCT method. *methods*, 25(4), 402-408.
- [137]. Albanes, D., Jones, D. Y., Micozzi, M. S., & Mattson, M. E. (1987). Associations between smoking and body weight in the US population: analysis of NHANES II. *American journal of public health*, 77(4), 439-444.
- [138]. Parrott, A. C., & Garnham, N. J. (1998). Comparative mood states and cognitive skills of cigarette smokers, deprived smokers and nonsmokers. *Human Psychopharmacology Clinical and Experimental*, 13(5), 367-376.
- [139]. Falkeborn, Y., Larsson, C., & Nordberg, A. (1981). Chronic nicotine exposure in rat: a behavioural and biochemical study of tolerance. *Drug and alcohol dependence*, 8(1), 51-60.
- [140]. Ijomone, O. M., Olaibi, O. K., & Nwoha, P. U. (2014). Effects of chronic nicotine administration on body weight, food intake and nitric oxide concentration in female and male rats. *Pathophysiology*, 21(3), 185-190.
- [141]. Grunberg, N. E., Winders, S. E., & Popp, K. A. (1987). Sex differences in nicotine's effects on consummatory behavior and body weight in rats. *Psychopharmacology*, 91(2), 221-225.
- [142]. Dickson, P. E., Miller, M. M., Rogers, T. D., Blaha, C. D., & Mittleman, G. (2014). Effects of adolescent nicotine exposure and withdrawal on intravenous cocaine self-administration during adulthood in male C57BL/6J mice. *Addiction biology*, 19(1), 37-48.
- [143]. Irvine, E. E., Cheeta, S., & File, S. E. (2001). Tolerance to nicotine's effects in the elevated plus-maze and increased anxiety during withdrawal. *Pharmacology biochemistry and behavior*, 68(2), 319-325.
- [144]. Brioni, J. D., O'Neill, A. B., Kim, D. J., & Decker, M. W. (1993). Nicotinic receptor agonists exhibit anxiolytic-like effects on the elevated plus-maze test. *European journal of pharmacology*, 238(1), 1-8.
- [145]. Pandey, S. C., Roy, A., Xu, T., & Mittal, N. (2001). Effects of protracted nicotine exposure and withdrawal on the expression and phosphorylation of the CREB gene transcription factor in rat brain. *Journal of neurochemistry*, 77(3), 943-952.
- [146]. Ouagazzal, A. M., Kenny, P. J., & File, S. E. (1999). Modulation of behaviour on trials 1 and 2 in the elevated plus-maze test of anxiety after systemic and hippocampal administration of nicotine. *Psychopharmacology*, 144(1), 54-60.
- [147]. Benwell, M. E. M., Balfour, D. J. K., & Khadra, L. F. (1994). Studies on the influence of nicotine infusions on mesolimbic dopamine and locomotor responses to nicotine. *The clinical investigator*, 72(3), 233-239.
- [148]. Gong, S., Miao, Y. L., Jiao, G. Z., Sun, M. J., Li, H., Lin, J., ... & Tan, J. H. (2015). Dynamics and correlation of serum cortisol and corticosterone under different physiological or stressful conditions in mice. *PloS one*, 10(2), e0117503.
- [149]. Jackson, K. J., Martin, B. R., Changeux, J. P., & Damaj, M. I. (2008). Differential role of nicotinic acetylcholine receptor subunits in physical and affective nicotine withdrawal signs. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 325(1), 302-312.
- [150]. Davis, J. A., & Gould, T. J. (2009). Hippocampal nAChRs mediate nicotine withdrawal-related learning deficits. *European neuropsychopharmacology*, 19(8), 551-561.

- [151]. Portugal, G. S., Wilkinson, D. S., Turner, J. R., Blendy, J. A., & Gould, T. J. (2012). Developmental effects of acute, chronic, and withdrawal from chronic nicotine on fear conditioning. *Neurobiology of learning and memory*, 97(4), 482-494.
- [152]. Soderstrom, K., Qin, W., Williams, H., Taylor, D. A., & McMillen, B. A. (2007). Nicotine increases FosB expression within a subset of reward-and memory-related brain regions during both peri-and post-adolescence. *Psychopharmacology*, 191(4), 891-897.
- [153]. Upton, M., & Lotfipour, S. (2015).  $\alpha$ 2-Null mutant mice have altered levels of neuronal activity in restricted midbrain and limbic brain regions during nicotine withdrawal as demonstrated by cfos expression. *Biochemical pharmacology*, 97(4), 558-565.
- [154]. Mahar, I., Bagot, R. C., Davoli, M. A., Miksys, S., Tyndale, R. F., Walker, C. D., ... & Mechawar, N. (2012). Developmental hippocampal neuroplasticity in a model of nicotine replacement therapy during pregnancy and breastfeeding. *PloS one*, 7(5), e37219.
- [155]. Cohen, A., Soleiman, M. T., Talia, R., Koob, G. F., George, O., & Mandyam, C. D. (2015). Extended access nicotine self-administration with periodic deprivation increases immature neurons in the hippocampus. *Psychopharmacology*, 232(2), 453-463.
- [156]. Csabai, D., Seress, L., Varga, Z., Tényi, T., Miseta, A., Wiborg, O., ... & Simon, M. (2016). Quantitative electron microscopic analysis of hippocampal inhibitory synapses in an animal model for depression. *European Neuropsychopharmacology*, 26, S375-S376.
- [157]. Jungenitz, T., Radic, T., Jedlicka, P., & Schwarzacher, S. W. (2013). High-frequency stimulation induces gradual immediate early gene expression in maturing adult-generated hippocampal granule cells. *Cerebral Cortex*, 24(7), 1845-1857.

## ÖZGEÇMİŞ

**Adı ve Soyadı** : Burçin ÜN

**Doğum Tarihi** : 1990

**E-mail** : burcinun@gmail.com

**Öğrenim Durumu** :

Derece	Bölüm/Program	Üniversite	Yıl
Lisans	Biyoloji	Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi	2009-2013
Yüksek Lisans	Anatomi	Mersin Üniversitesi	2015-2018

