

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SIÇANLARDA RFAMİD İLİŞKİLİ PEPTİT-3'ÜN DAVRANIŞ
ÜZERİNDE NÖROGENEZ ARACILI OLASI ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

YASEMİN BÖYÜKÇAM

YÜKSEK LİSANS TEZİ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Selim KUTLU

KONYA 2017

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SIÇANLARDA RFAMİD İLİŞKİLİ PEPTİT-3'ÜN DAVRANIŞ
ÜZERİNDE NÖROGENEZ ARACILI OLASI ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

YASEMİN BÖYÜKÇAM

YÜKSEK LİSANS TEZİ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Selim KUTLU

Bu araştırma Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 161318001 proje numarası ile ve ÖYP (Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı) tarafından ÖYP 030 proje numarası ile desteklenmiştir.


KONYA 2017


TEZ ONAY SAYFASI

Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Öğrencisi YASEMİN BÖYÜKÇAM'ın "**Sıçanlarda RF Amid İlişkili Peptit-3'ün Davranış Üzerinde Nörojeniz Aracılı Olası Etkisinin Araştırılması**" başlıklı tezi tarafımızdan incelenmiş; amaç, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Konya / 03.01.2017


Tez Danışmanı
Prof. Dr. Selim KUTLU
Necmettin Erbakan Üniversitesi


Jüri Üyesi
Prof. Dr. Neyhan ERGENE
KTO Karatay Üniversitesi


Jüri Üyesi
Yrd. Doç. Dr. Zafer ŞAHİN
Necmettin Erbakan Üniversitesi

Yukarıdaki tez, Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun 03.01.2017 tarih ve 03/03 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Kismet Esra NURULLAHOĞLU ATALIK
Enstitü Müdürü
İmzası



APPROVAL


We certify that we have read this dissertation entitled “**Investigation of the Possible Neurogenesis-mediated Effect of RFamide Related Peptide-3 on Behaviour in Rats**” by “*Yasemin Büyükçam*” that in our opinion it is fully adequate, in scope and quality, as dissertation for the degree of *Master of Science* in the Department of “**Physiology**”, Institute of Health Sciences, University of Necmettin Erbakan.

Konya-Turkey / 03.01.2017


Principal Advisor
Prof. Dr. Selim Kutlu

Necmettin Erbakan University


Examination Committee Member
Prof. Dr. Neyhan Ergene
KTO Karatay University


Examination Committee Member
Yrd. Doç. Dr. Zafer Şahin
Necmettin Erbakan University

This thesis has approved for the University of Necmettin Erbakan Institute of Health Sciences.


Prof. Dr. Kismet Esra NURULLAHOĞLU ATALIK
Director of Institute of Health Sciences

Bu tezin tamamının kendi çalışmam olduğunu, planlanmasından yazımına kadar hiçbir aşamasında etik dışı davranışımın olmadığını, tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları kaynaklar listesine aldığımı, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

03.01.2017

Yasemin BÖYÜKÇAM

İmza



Turnitin Originality Report

SIÇANLARDA RFAMİD İLİŞKİLİ PEPTİT-3'ÜN DAVRANIŞ ÜZERİNDE NÖROGENEZ
ARACILI OLASI ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI by Yasemin Büyükçam



From Fizyoloji Yasemin Büyükçam (Meram Faculty of Medicine Physiology Department)

- Processed on 31-Jan-2017 14:48 EET
- ID: 764754009
- Word Count: 19805

Similarity Index

4%

Similarity by Source

Internet Sources:

4%

Publications:

2%

Student Papers:

1%

sources:

- 1 1% match (Internet from 15-Aug-2015)
<http://openaccess.inonu.edu.tr/8080/xmlui/bitstream/handle/11616/1047/282100.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- 2 < 1% match (publications)
[KOCYİĞİT, Özgül, ARTIŞ, Seda, SAHİN, Leyla and ASCIOĞLU, Meral "Yavru erkek sıçanlarda vitamin E uygulamasının öğrenme üzerine etkisi" Fırat Üniversitesi, 2008.](#)
- 3 < 1% match (student papers from 25-Jan-2016)
[Submitted to Marmara University on 2016-01-26](#)
- 4 < 1% match (Internet from 30-Mar-2010)
http://sagens.erciyes.edu.tr/dergi/SBD_14_3_2005/ayseguelderleme.pdf
- 5 < 1% match (Internet from 07-Jan-2016)
http://konudam.com/documents/Etik_Kurall_Yonergesi.doc
- 6 < 1% match (student papers from 25-Jul-2016)
[Submitted to Selcuk Universitesi on 2016-07-25](#)

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca, bilimsel bakış açısı ve akademik duruşu yönünden daima örnek olarak aldığım, tez çalışmamın gerçekleşmesinde değerli bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren, akademik açıdan yetişmemde büyük katkısı olan Anabilim Dalı başkanımız ve danışman hocam Sayın Prof. Dr. Selim Kutlu'ya,

Deneyleerin gerçekleştirilmesinde, çalışmaların planlanmasında, istatistiksel analizlerin yapılması ve değerlendirilmesinde yaptığı katkılardan, aktardığı değerli tecrübelerinden ve gösterdiği sabırdan dolayı Sayın Yard. Doç. Dr. Zafer Şahin'e,

Samimi tavırları ile her zaman sıcaklığımı hissettiren, yüksek lisans eğitimim boyunca bilimsel yönden yetişmemde emekleri geçen değerli hocam Sayın Yard. Doç. Dr. Işık Solak Görmüş'e,

Tezimin moleküler analizleri sırasında bana laboratuvarlarında çalışma imkanı sağlayan, çalışmaların yürütülmesi sırasında ilgisini eksik etmeyen, bilgi ve deneyimleriyle desteğini hiçbir zaman esirgemeyen Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı başkanı Sayın Doç. Dr. Ercan Kurar'a,

Her zaman olduğu gibi tezim konusunda da samimi desteğini gördüğüm, deneysel aşamalarda hiçbir konuda yardımlarını esirgemeyen değerli arkadaşım Arş. Gör. Aynur Koç'a,

Moleküler çalışmaların planlanması ve gerçekleştirilmesinde, sonuçların değerlendirilmesinde büyük katkıda bulunan, bilgi ve deneyimlerini paylaşarak destek olan sevgili dostum Arş. Gör. Canan Eroğlu'na,

Tezimin moleküler analizlerindeki katkılarının yanısıra gösterdiği ilgi ve manevi desteğinden dolayı kıymetli arkadaşım Arş. Gör. Ebru Avcı'ya,

Verdikleri pozitif enerjiden ve içten dostluklarından dolayı sevgili arkadaşlarım Arş. Gör. Raviye Özen Koca'ya, Esra Çetin Selçuk'a ve Arş. Gör. İlknur Çınar'a,

Benim bu günlere gelmem için hiçbir fedakârlıktan kaçınmayan, hayatımdaki tüm güzelliklerde emeği olan, değerli annem Fatma Düğüncü'ye ve değerli babam İhsan Düğüncü'ye sonsuz özveri ve emekleri için,

Neşe kaynağım, yaşama sevincim kardeşlerim Yadigar Düğüncü'ye, Kevser Düğüncü'ye ve Lütfullah Düğüncü'ye,

Her zaman arkamda olduğunu hissettiğim ve her konuda bana destek olan sevgili eşim, huzur kaynağım Numan Büyükçam'a gösterdiği sevgi ve sabır için, en içten teşekkürlerimi sunuyorum.

İÇİNDEKİLER

<i>İç Kapak</i>	<i>i</i>
<i>Tez Onay Sayfası</i>	<i>ii</i>
<i>Tez Beyan Sayfası</i>	<i>iv</i>
<i>Teşekkür</i>	<i>v</i>
<i>İçindekiler</i>	<i>vi</i>
<i>Kısaltmalar ve Simgeler Listesi</i>	<i>viii</i>
<i>Şekiller Listesi</i>	<i>xi</i>
<i>Tablolar Listesi</i>	<i>xiii</i>
<i>Özet</i>	<i>xiv</i>
<i>Abstract</i>	<i>xvi</i>

1. GENEL BİLGİLER.....1

<i>1.1. RFamid İlişkili Peptit-3 ve GPR147 Sistemi</i>	<i>1</i>
<i>1.1.1. Gonadotropin Baskılayıcı Hormon</i>	<i>1</i>
<i>1.1.2. RFamid Peptit Ailesi</i>	<i>1</i>
<i>1.1.3. RFamid İlişkili Peptit- 3</i>	<i>2</i>
<i>1.1.4. RFRP-3 Reseptörü</i>	<i>2</i>
<i>1.1.5. RFRP-3 ve GPR147 Sinyalleşme Mekanizması</i>	<i>3</i>
<i>1.1.6. RFRP-3 Nöronlarının Lokalizasyonu ve Projeksiyonları</i>	<i>4</i>
<i>1.1.7. RFRP-3 ve GPR147 Sinyalleşmesinin Tanımlanan Fizyolojik Etkileri</i>	<i>5</i>
<i>1.1.7.1. Gonadotropin Sentezinin ve Salgılanmasının İnhibisyonu</i>	<i>5</i>
<i>1.1.7.2. Dişi Memelilerde Östrus ve Menstrual Siklusun Regülasyonu</i>	<i>8</i>
<i>1.1.7.3. Steroidogenez ve Germ Hücreleri Olgunlaşması Üzerindeki Etkileri</i>	<i>9</i>
<i>1.1.7.4. Üreme Sisteminin Gelişimine ve Sürdürülmesine Katkıları</i>	<i>9</i>
<i>1.1.7.5. Sosyo-seksüel Davranışların İnhibisyonu</i>	<i>11</i>
<i>1.1.7.6. Beslenme Davranışının Stimülasyonu</i>	<i>11</i>
<i>1.1.7.7. Büyüme Hormonunun Sentezinin ve Salgılanmasının Regülasyonu</i>	<i>13</i>
<i>1.1.7.8. Stres Cevabının Düzenlenmesi</i>	<i>13</i>
<i>1.1.7.9. RFRP-3 ve Anksiyete</i>	<i>15</i>
<i>1.1.8. Hipokampal RFRP-3</i>	<i>15</i>
<i>1.2. Erişkin Nörogenez</i>	<i>16</i>
<i>1.2.1. Erişkin Hipokampal Nörogenez</i>	<i>17</i>
<i>1.2.2. Erişkin Hipokampusda Nörojenik Yatak: SGZ</i>	<i>19</i>
<i>1.2.3. Hipokampal Nörogenezle Üretilen Hücre Tipleri ve Biyobelirteçleri</i>	<i>20</i>
<i>1.2.3.1. Tip 1 Hücreleri ve Biyobelirteçleri</i>	<i>20</i>
<i>1.2.3.2. Tip 2 Hücreleri ve Biyobelirteçleri</i>	<i>21</i>
<i>1.2.3.3. Tip 3 Hücreleri ve Biyobelirteçleri</i>	<i>21</i>
<i>1.2.4. Yenidoğan Hipokampal Nöronların Fonksiyonel Önemi</i>	<i>23</i>
<i>1.2.5. Erişkin Nörogenezin Kontrolü</i>	<i>25</i>
<i>1.2.6. Hipokampal Nörogenez ve Anksiyete</i>	<i>28</i>
<i>1.3. Erişkin Dentat Girusta Nörogenezin Regülasyonuna Katılan Gizemli Bir Faktör: Hipokampal Astrositler</i>	<i>29</i>
<i>1.3.1. Nöronal Farklılaşma Sürecinde Astrosit Kontrolü</i>	<i>29</i>
<i>1.3.2. Hipokampal Astrositlerin Erişkin Nörogenezin Regülasyonunda Tanımlanan Roller</i>	<i>31</i>
<i>1.3.3. Hipokampal RFRP-3'ün Nörogenez Üzerinde Astrosit Aracılı Olası Etkisi</i>	<i>31</i>
<i>1.4. Amaç</i>	<i>32</i>

2. GEREÇ VE YÖNTEM.....	33
2.1. Deney Hayvanları.....	33
2.2. Deneysel Dizayn.....	33
2.3. İntraserebroventriküler Uygulamalar.....	34
2.3.1. Ozmotik Pompa Sistemleri.....	34
2.3.2. Ozmotik Pompaların Çalışma Prensibi.....	34
2.3.3. Ozmotik Pompaların Hazırlanması.....	35
2.3.4. Beyin İnfüzyon Kitinin Hazırlanması.....	35
2.3.5. Stereotaksik Koordinatların Belirlenmesi.....	36
2.3.6. Ozmotik Pompa ve Beyin İnfüzyon Kitinin İmplantasyonu.....	36
2.4. Davranış Testleri.....	38
2.4.1. Açık Alan Testi.....	39
2.4.2. Yükseltilmiş Artı Labiret Testi.....	41
2.4.3. Aydınlık-Karanlık Kutu Testi.....	42
2.5. Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	43
2.5.1. Beyin Dokularının Elde Edilmesi.....	43
2.5.2. Hipokampus Doku Örneklerinden Total RNA İzolasyonu.....	43
2.5.2.1. Total RNA Örneklerinin Kalite Kontrolü.....	44
2.5.3. cDNA Eldesi.....	44
2.5.4. Primer Dizaynı.....	45
2.5.5. Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qPZR).....	46
2.6. İstatistiksel Analizler.....	46
3. BULGULAR.....	47
3.1. Açık Alan Testi Bulguları.....	47
3.1.1. Kat Edilen Mesafe.....	47
3.1.2. Hız.....	47
3.1.3. Merkezde Geçirilen Süre.....	48
3.1.4. Kenarda Geçirilen Süre.....	48
3.1.5. Kenardan Merkeze Geçiş Sayısı.....	49
3.1.6. Rearing Davranışı Frekans ve Süre Değişimleri.....	49
3.1.7. Grooming Davranışı Frekans ve Süre Değişimleri.....	50
3.1.8. Defekasyon Sayısı.....	51
3.2. Yükseltilmiş Artı Labirent Testi Bulguları.....	52
3.2.1. Açık Kollardaki Zaman Yüzdesi.....	52
3.2.2. Açık Kollara Giriş Sayısı.....	52
3.2.3. Kapalı Kollara Giriş Sayısı.....	53
3.2.4. Head dipping Davranışı Frekans Değişimleri.....	53
3.3. Aydınlık-Karanlık Kutu Testi Bulguları.....	54
3.3.1. Karanlık Kutuda Kalma Süresi.....	54
3.3.2. Aydınlık↔Karanlık Kutu Geçiş Sayısı.....	55
3.3.3. Aydınlık Kutuya İlk Geçiş Zamanı.....	55
3.4. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu Bulguları.....	57
4. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	61
5. KAYNAKLAR.....	70
6. ÖZGEÇMİŞ.....	75

KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

AC	Adenil siklaz
ACTH	Adrenokortikotropik hormon
ADX	Adrenalektomi
BMP	Kemik morfojenik proteinleri
BrdU	5-bromo-2'-deoksiuridin
CeA	Amigdalanın merkez bölgesi
CORT	Kortikosteron
CRH	Kortikotropin-salgılatıcı hormon
Ct	Eşik döngüsü
DCX	Doublecortin
DG	Dentat girus
DMH	Dorsomedyal hipotalamik alan
DMN	Dorsomedyal nükleus
E15	Embriyonik 15. gün
EPM	Yükseltilmiş artı labirent testi
ERK	Ekstraselüler sinyalle düzenlenen kinaz
GABA	Gamma-aminobütirik asit
GC	Glikokortikoid
gDNA	Genomik DNA
GFAP	Glial fibriler asidik protein
GH	Büyüme hormonu
GnIH	Gonadotropin baskılayıcı hormon

GnRH	Gonadotropin salgılatıcı hormon
GPR147	G protein kenetli reseptör 147
HPA	Hipotalamo-hipofizeyal adrenal aks
HPG	Hipotalamo-hipofizeyal gonadal aks
İcv	İntraserebroventriküler
İr	İmmünoreaktif
KISS1R	Kisspeptin reseptörü
LDB	Aydınlık-karanlık kutu testi
LepR	Leptin reseptörü
LHA	Lateral hipotalamik alan
LTP	Uzun süreli potansiasyon
MCH	Melanin-konsantre edici hormon
ME	Median eminens
MSH	Melanosit uyarıcı hormon
MSS	Merkezi sinir sistemi
MWM	Morris su labirenti
NeuN	Nöron spesifik nükleer antijen
NMDA	N-metil-D-aspartat
NPFF	Nöropeptit FF
NPFFR1	NPFF reseptörü 1
NPY	Nöropeptit Y
NTS	Nükleus traktus solitari
PerVN	Periventriküler nükleus

PKA	Protein kinaz A
POA	Preoptik alan
POMC	Pro-opiomelanokortin
PVN	Paraventriküler nükleus
qPZR	Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu
QRFP/26RFa	Piroglutamat RFamid peptit/26RFamid peptit
Rb	Retinoblastoma proteini
RFRP	RFamid ilişkili peptit
RFRPs	RFamid-ilişkili peptitler
RMS	Rostral göç akımı
SCN	Suprakiazmatik nükleus
SGZ	Subgranüler zonu
Shh	Sonic hedgehog
Sox2	SRY-ilişkili HMG-box gen2
SVZ	Subventriküler zon
Tbr2	Eomes
VIP	Vazoaktif intestinal peptit
VMN	Ventromedyal nükleus

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1. RFRP-3 ve GPR147 sinyalleşmesinin tanımlanan moleküler mekanizması

Şekil 1.2. HPG aksında RFRP-3 sisteminin inhibitör etkileri

Şekil 1.3. HPA ve HPG aksı etkileşimi

Şekil 1.4. Memeli beyinde erişkin nörojeniz

Şekil 1.5. Erişkin hipokampal nörojeniz basamakları ve biyobelirteçleri

Şekil 2.1. Deney protokolünün şematik gösterimi

Şekil 2.2. Ozmotik pompanın fonksiyonel yapısı

Şekil 2.3. Ozmotik pompa seti ve beyin infüzyon kiti

Şekil 2.4. Sıçan beyin atlasına göre lateral ventrikül koordinatları

Şekil 2.5. Stereotaksik cihaza yerleştirilen sıçanlarda lateral ventrikülün belirlenmesi

Şekil 2.6. İşaretlenen noktanın tur cihazı ile delinmesi (A) ve beyin infüzyon kitinin dental sementle kafatasına sabitlenmesi (B)

Şekil 2.7. Açık alan testinde bölgelerin belirlenmesi

Şekil 2.8. Açık alan testi parametrelerinin Ethovision programı ile kaydedilmesi

Şekil 2.9. Yükseltilmiş artı labirent düzeneği

Şekil 2.10. Aydınlık-karanlık kutu test düzeneği

Şekil 3.1. Kat edilen mesafenin deney grupları arasındaki değişimi

Şekil 3.2. Hızın deney grupları arasındaki değişimi

Şekil 3.3. Merkezde geçirilen sürenin deney grupları arasındaki değişimi

Şekil 3.4. Kenarda geçirilen sürenin deney grupları arasındaki değişimi

Şekil 3.5. Kenardan merkeze geçiş sayısının deney grupları arasındaki değişimi

Şekil 3.6. Rearing davranışı frekansının deney grupları arasındaki değişimi

Şekil 3.7. Rearing davranışı süresinin deney grupları arasındaki değişimi

Şekil 3.8. Grooming davranışı frekansının deney grupları arasındaki değişimi

Şekil 3.9. Grooming davranışı süresinin deney grupları arasındaki değişimi

Şekil 3.10. Defekasyon sayısının deney grupları arasındaki değişimi

Şekil 3.11. Açık kollardaki zaman yüzdesinin deney grupları arasındaki değişimi

Şekil 3.12. Açık kollara giriş sayısının deney grupları arasındaki değişimi

Şekil 3.13. Kapalı kollara giriş sayısının deney grupları arasındaki değişimi

Şekil 3.14. Head dipping davranışı frekansının deney grupları arasındaki değişimi

Şekil 3.15. Karanlık kutuda kalma süresinin deney grupları arasındaki değişimi

Şekil 3.16. Kutular arası geçiş sayısının deney grupları arasındaki değişimi

Şekil 3.17. Aydınlık kutuya ilk geçiş zamanının deney grupları arasındaki değişimi

Şekil 3.18. GAPDH (a), ACTB (b), Nestin (c), DCX (d), CALB1 (e), NeuN (f) ve BDNF (g) genlerinin melt analiz eğrileri

Şekil 3.19. Gerçek zamanlı PZR ürünlerinin jel görüntüsü. K: Kontrol, RF: RFRP-3, RA: RF9, RR: RFRP-3+RF9 grubu

Şekil 3.20. Kontrol grubuna kıyasla RFRP-3 grubunda nörogenez biyobelirteçlerinin mRNA ekspresyon düzeyleri

Şekil 3.21. Kontrol grubuna kıyasla RF9 grubunda nörogenez biyobelirteçlerinin mRNA ekspresyon düzeyleri

Şekil 3.22. Kontrol grubuna kıyasla RFRP-3+RF9 grubunda nörogenez biyobelirteçlerinin mRNA ekspresyon düzeyleri

Şekil 3.23. RF9 grubuna kıyasla RFRP-3 grubunda nörogenez biyobelirteçlerinin mRNA ekspresyon düzeyleri

Şekil 3.24. RF9 grubuna kıyasla RFRP-3+RF9 grubunda nörogenez biyobelirteçlerinin mRNA ekspresyon düzeyleri

TABLULAR LİSTESİ

Tablo 1.1. Memeli RFamid peptitleri ve reseptörleri

Tablo 2.1. Deney grupları

Tablo 2.2. cDNA sentezi için kullanılan karışım içeriği

Tablo 2.3. Çalışmada kullanılan gen bölgelerinin primer dizileri



Sıçanlarda RFamid İlişkili Peptit-3'ün Davranış Üzerinde Nörogenez Aracılı Olası Etkisinin Araştırılması

RFamid ilişkili peptit-3 (RFRP-3), gonadotropin baskılayıcı hormonun memelilerdeki homologudur ve üreme fonksiyonlarının hipotalamik düzenlenmesinde rol oynamaktadır. RF9, RFRP-3 reseptör (GPR147 ve GPR74) antagonistidir. RFRP-3'ün, hipokampal davranış süreçleri ve nörogeneze etkisiyle ilgili bir araştırma bulgusu bulunmamaktadır. Mevcut çalışmanın amacı, RFRP-3 ve GPR147 sinyalleşmesinin sıçan hipokampusunda nörogenez üzerindeki olası etkisini ve anksiyete benzeri davranışlardaki rolünü araştırmaktır. Çalışmada 28 adet yetişkin erkek sıçan kontrol, RFRP-3 (1 nmol/gün), RF9 (10 nmol/gün) ve RFRP-3 + RF9 olarak 4 gruba ayrılmıştır. Sıçanların tümüne sterotaksik cihaz yardımıyla ozmotik minipompalar yerleştirilmiş ve 15 gün süreyle lateral ventriküle madde infüzyonları gerçekleştirilmiştir. Sıçanlara anksiyete ile ilişkili davranış testleri uygulanmıştır. Her bir hayvanın performansı Ethovision XT 11 yazılım programı aracılığıyla kaydedilerek anksiyete parametreleri yönünden değerlendirilmiştir. Hipokampus dokularındaki nörogenez biyobelirteçlerinin gen ekspresyon düzeyleri gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu analiziyle belirlenmiştir. RFRP-3 uygulaması yükseltilmiş artı labirent testinde açık kollardaki zaman yüzdesini azaltmıştır ($p<0,01$). RFRP-3, açık kollara giriş sayısını diğer grupların aksine azaltırken kapalı kollara giriş sayısını arttırmıştır ($p<0,05$). Açık alan testinde diğer gruplara kıyasla merkezde geçirilen sürede anlamlı azalma yalnızca RFRP-3 grubunda bulunmuştur ($p<0,05$). RFRP-3 kenarda geçirilen süreyi arttırırken ($p<0,05$), *rearing* davranışını azaltmıştır ($p<0,01$). RT-PZR analizlerine göre RFRP-3 grubunda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında nestin ekspresyonunun önemli ölçüde azaldığı tespit edilmiştir ($p<0,05$). RF9'a kıyasla RFRP-3 grubunda nestin, doublecortin, kalbindin, nöron spesifik nükleer antijen ekspresyonları azalma göstermiştir ($p<0,05$). RFRP-3 + RF9 grubunda ise kontrole göre nestinin ($p<0,05$), RF9 grubuna göre tüm genlerin ekspresyon düzeyleri anlamlı derecede azalmıştır ($p<0,01$). Mevcut çalışmada, ilk kez RFRP-3 ve GPR147 sinyalleşmesinin erişkin sıçan hipokampusunda nörogenezi baskılayarak anksiyete benzeri davranışları uyardığı gösterilmiştir. Hipokampal kisspeptin ve hipokampal GnRH sinyalleşmesinin RFRP-3'ün bu inhibitör etkilerinde aracı bir mekanizma olarak rol oynayabileceği düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: RFRP-3, Nörogenez, Anksiyete, Hipokampus, Sıçan

Investigation of the possible neurogenesis-mediated effect of RFamide related peptide-3 on behaviour in rats

RFamide related peptide-3 (RFRP-3) is homolog of gonadotropin inhibitory hormone and plays role in hypothalamic regulation of reproductive functions. RF9 is a RFRP-3 receptor (GPR147 and GPR74) antagonist. There is no evidence regarding effect of RFRP-3 on hippocampal behavioural processes and neurogenesis. The aim of present study is to investigate possible effects of RFRP-3 and GPR147 signalling on neurogenesis in rat hippocampus and anxiety like behaviours. Twenty eight adult male rats were divided four groups as control, RFRP-3 (1nmol/day), RF9 (10nmol/day) and RFRP-3 + RF9 in present study. Osmotic brain minipumps were implanted to rats and drug infusions into lateral ventricles were performed for 15 days. Behavioural tests associated with anxiety were applied to rats. Individual anxiety parameters were evaluated. mRNA levels of neurogenesis markers in hippocampus tissues were determined by RT-PCR analysis. RFRP-3 administration reduced percent time spent in open arms of elevated plus maze test ($p < 0,01$). RFRP-3 decreased numbers of entries into open arms and increased numbers of entries into closed arms ($p < 0,05$). Significant reduction in time spent in centre of open field test was solely found in RFRP-3 group compared to others ($p < 0,05$). RFRP-3 enhanced time spent in the corner ($p < 0,05$) and diminished rearing behaviour ($p < 0,01$). As for RT-PCR analysis we determined an important reduction on nestin expression in RFRP-3 group compared to control ($p < 0,05$). Expressions of nestin, doublecortin, calbindin and neuron specific nuclear antigen were decreased in RFRP-3 group compared to RF9 administered group ($p < 0,05$). Nestin expression in RFRP-3 + RF9 group was decreased compared to control ($p < 0,05$). All of genes in the same group were also decreased compared to RF9 group ($p < 0,01$). It is shown for the first time that RFRP-3 and GPR147 signalling stimulates anxiety like behaviours via suppressing neurogenesis in adult rat hippocampus in the present study. It is suggested that hippocampal kisspeptin and hippocampal GnRH signalling may play role as a mediator mechanism in this inhibitory effects of RFRP-3.

Keywords: RFRP-3, Neurogenesis, Anxiety behaviour, Hippocampus, Rat

1. GENEL BİLGİLER

1.1. RFamid İlişkili Peptit-3 ve GPR147 Sistemi

1.1.1. Gonadotropin Baskılayıcı Hormon

Gonadotropin baskılayıcı hormon (GnIH), 2000 yılında Japon bildircinlerinin (*Coturnix japonica*) beyinlerinden izole edilen hipotalamik bir nöropeptittir (Tsutsui ve ark. 2000). İzolen edilen peptitin hipotalamo-hipofizeyal sistemde yer aldığı ve kültüre edilmiş bildircin ön hipofiz bezinden gonadotropin salgılanmasını güçlü bir şekilde baskıladığı rapor edilmiştir. Bu sebeple gonadotropin inhibe edici hormon (GnIH) olarak isimlendirilmiştir (Tsutsui ve ark. 2000).

Tanımlanmasıyla birlikte potansiyel etki mekanizması dikkatleri üzerinde toplamayı başarmıştır (Pineda ve ark. 2010b). Yapılan ilk çalışmalarda GnIH'un fizyolojik tek hedefi olarak düşünülen kuş ön hipofizine odaklanılmıştır. Günümüzde ise GnIH'un kuşlarda ve memelilerde direk olarak hipofizden gonadotropin sentezini ve salgılanmasını inhibe ettiğini gösteren çok kanıt bulunmaktadır (Bently ve ark. 2009).

1.1.2. RFamid Peptit Ailesi

İnsanlar ve kemirgenler dahil olmak üzere tüm canlı türlerinin beyinlerinde yer alan RFamid peptitleri, ortak karboksil terminallerinde RF motifi olarak adlandırılan arjinin (R) ve fenilalanin (F) aminoasitlerini taşımaktadır. Kuşların beyininde yeni bir RFamid peptit araştırılırken keşfedilen GnIH peptitleri de RFamid peptit ailesinin bir üyesidir (Tsutsui ve ark. 2000). Diğer RFamid peptitleri gibi GnIH peptitlerinin de özgün moleküler yapısı C terminallerindeki LPXRFamid (X=L ya da Q) motifidir.

Bugüne kadar memelilerde 5 alt tip RFamid peptiti tanımlanmıştır. Nöropeptit FF (NPFF) grubu, prolaktin salgılatıcı peptitler, piroglutamat RFamid peptit/26RFamid peptit (QRFP/26RFa) grubu, kisspeptinler (kiss1 ve kiss2) ve son olarak da GnIH (LPXRFamidleri) peptit ailesidir (Kovacs ve ark. 2014; Osugi ve ark. 2015).

RFamid peptitleri ilk olarak 1970'li yılların sonunda omurgasız türlerden izole edilmiştir. Tanımlanan ilk RFamid peptit, kardiyoeksitatör fonksiyona sahip olan FMRFamid peptitidir (Price ve Greenberg 1977). Zamanla, omurgalı türlerde de

varlığı gösterilmiş ve yapılan immünohistokimya çalışmaları ile RFamid-immünoreaktivitesi merkezi sinir sistemi (MSS)'nde tespit edilmiştir. Hipofize yakın RFamid immünoreaktif (ir) nöronal projeksiyonları, hipofiz bezinin fonksiyonlarının düzenlenmesinde RFamid peptitlerinin rolü olduğu ihtimalini kuvvetlendirmiştir. Tanımlanan RFamid peptitlerinin doğrudan ya da dolaylı olarak üreme aksının regülasyonuna katıldığı bildirilmektedir (Raffa 1988; Rastogi ve ark. 2001).

Tablo 1.1. Memeli RFamid peptitleri ve reseptörleri (Ubuka ve ark. 2015).

Memeli Endojen RFamid Peptitleri	Reseptörleri
RFRP-1 ve -3	GPR147 (NPFFR1)
Nöropeptit AF ve FF	GPR74 (NPFFR2)
Prolaktin Salgılatıcı Peptitler	GPR10
Kisspeptin	GPR54
QRFP/26RFa Peptitleri	GPR103

1.1.3. RFamid İlişkili Peptit- 3

Araştırmaların kuş türlerinden memelilere genişletilmesiyle, insan da dahil olmak üzere memeli hipotalamuslarında GnIH peptitinin varlığı gösterilmiştir. C terminallerinde Arg-Phe-NH₂ motifi taşıyan RFamid peptitlerinden biri olan bu peptit, memelilerde RFamid ilişkili peptit (RFRP) olarak isimlendirilmiştir.

Memelilerde LPXRFamid peptitlerini kodlayan cDNA'lar, bir gen veritabanı taraması ile belirlenmiştir. Memelilerdeki bu LPXRFamid peptitleri yapılarından dolayı genel olarak RFamid ilişkili peptitler (RFRPs) olarak adlandırılmıştır. Yapılan analizler sonucunda LPXRFamid prekürsör cDNA'larının üç tip RFRPs (RFRP-1, -2 ve -3) kodladığı, fakat yalnızca RFRP-1 ve RFRP-3'ün bir C terminal LPXRFamid (X=L ya da Q) motifi taşıdığı bildirilmiştir. Kemirgenlerde ise bu durum geçerli değildir, sadece RFRP-1 ve RFRP-3 kodlanmaktadır (Hinuma ve ark. 2000). Tüm bu bulgular birlikte ele alındığında, RFRP geni, RFRP-1 ve RFRP-3 olmak üzere biyolojik olarak aktif iki peptiti meydana getirmektedir (Gibson ve ark. 2008). İnsanlarda RFRP-1 ve -3 (Ubuka ve ark. 2009), sıçanlarda ise esas olarak RFRP-3 (Ukena ve ark. 2002) izole edilmiş ve tanımlanmış endojen peptitlerdir.

1.1.4. RFRP-3 Reseptörü

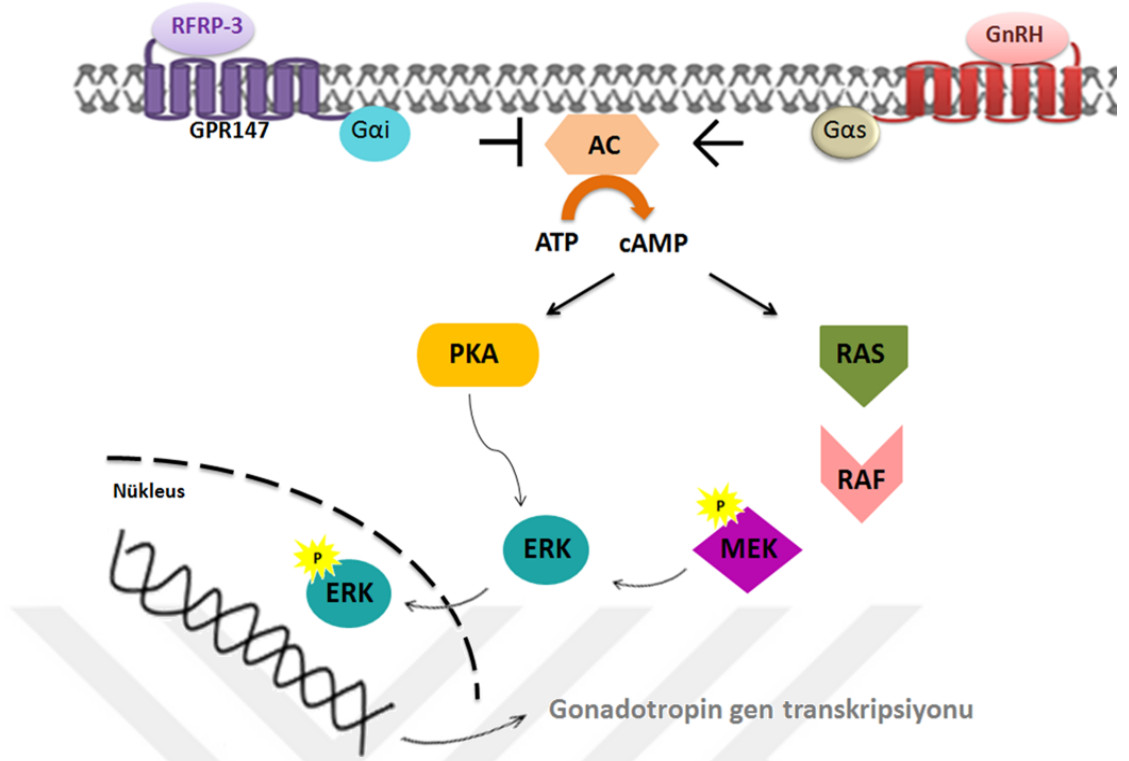
G protein (G_{ai}) kenetli reseptör 147 (GPR147), RFRP-3'ün temel reseptörüdür. GPR147'nin C terminalinde LPXRFamid (X=L ya da Q) motifi taşıyan peptitlere yüksek afiniteyle bağlandığı gösterilmiştir. Bu doğrultuda bu spesifik

motifin, reseptöre bağlanmada kritik bir öneme sahip olduğu düşünülmektedir (Yin ve ark. 2005). GPR147, NPPF'e de bağlandığından dolayı NPPF reseptörü 1 (NPPFR1) olarak da adlandırılmıştır (Ubuka ve Tsutsui 2014).

RFRP-3 peptitlerinin, GPR74 reseptörüne bağlanarak da etkilerini gösterebildikleri ancak GPR74'e karşı afinitelerinin oldukça düşük olduğu belirlenmiştir. GPR74 cDNA ifadesi çeşitli periferik doku ve organlarda, GPR147 ekspresyonu ise yalnızca beyinde ve hipofizde tespit edilmiştir. GPR147, GPR74'den 100 kat daha güçlü etkiye sahiptir (Ikemoto ve Park 2005). Bu etkiler, spesifik bir GPR147/GPR74 antagonisti olan RF9 uygulaması ile geri döndürülebilmektedir (Simonin ve ark. 2006).

1.1.5. RFRP-3 ve GPR147 Sinyalleşme Mekanizması

Son ve çalışma ekibi (2012), fare gonadotrop hücre hattında (L β T2) RFRP-3 hücre sinyalleşme mekanizmasını açıklığa kavuşturan bir yolak keşfetmiştir. RFRP-3'ün GPR147'ye bağlanması ile hücre içi sinyalleşme yolları aktifleşmektedir ve gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH)'un indüklediği cAMP sinyali baskılanmaktadır. GPR147, Gai proteini ile eşleşmektedir ve hedef hücrede adenil siklaz (AC) inhibitörleri olarak işlev görmektedir. Böylece, GnRH'un uyardığı ekstraselüler sinyalle düzenlenen kinaz (ERK) fosforilasyonu ve gonadotropin alt ünitelerinin gen transkripsiyonu inhibe olmaktadır. Dolayısıyla RFRP-3, AC/cAMP/protein kinaz A (PKA)-bağımlı ERK aktivasyonunu inhibe ederek GnRH'un indüklediği gonadotropin alt ünite gen transkripsiyonunu baskılamaktadır (Son ve ark. 2012) (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. RFRP-3 ve GPR147 sinyalleşmesinin tanımlanan moleküler mekanizması.

1.1.6. RFRP-3 Nöronlarının Lokalizasyonu ve Projeksiyonları

Kuş türlerinde yapılan immünohistokimya çalışmaları, GnIH-ir nöronal hücre gövdelerinin hipotalamusta paraventricüler nükleus (PVN)'da yerleştiğini göstermiştir (Ukena ve ark. 2003b). GnIH öncü mRNA'sı bıldırcın beyinde yalnızca diensefelonda eksprese edilmiştir (Satake ve ark. 2001). GnRH-ir nöronal lifleri ise diensefalik ve mezensefalik beyin bölgelerinde geniş bir alana dağılmıştır (Ukena ve ark. 2003b). Bu veriler ışığında GnIH nöronlarının yalnızca üreme fonksiyonlarının değil aynı zamanda otonom fonksiyonlar ve davranışla ilgili mekanizmaların düzenlenmesinde de rol alabileceği ileri sürülmüştür (Ubuka ve ark. 2015).

Memelilerde RFRP-3 öncü mRNA'sı yalnızca dorsomedyal hipotalamik alan (DMH)'da eksprese edilmektedir (Kriegsfeld ve ark. 2006). Sıçan RFRP-3 öncü mRNA ifadesi, periventricüler nükleus (PerVN)'da ve dorsomedyal nükleus (DMN) ile ventromedyal nükleus (VMN) arasında kalan bölümde gösterilmiştir (Hinuma ve ark. 2000). RFRP-3 üreten nöronlar özellikle DMH'da lokalizedir. Ancak sıçan beyinde RFRP-3 immünoaktivitesi incelendiğinde, hipotalamusun kaudal

kısımında, PerVN'da ve VMN'da RFRP + nöronal hücre gövdeleri saptanmıştır (Yano ve ark. 2003).

RFRP-3 reseptörleri ve projeksiyonları memeli beyinde geniş bir dağılım göstermektedir. RFRP-3-ir nöronal lifler diensefalik, mezensefalik beyin bölgelerinin yanı sıra limbik bölgelerde de yoğunlaşmıştır. Lateral septal nükleusda, medyal POA'da amigdalada, arkuat nükleusda, paraventriküler talamik ve hipotalamik nükleuslarda RFRP-3 immünoaktivitesi tespit edilmiştir (Ubuka ve ark. 2012a).

Sıçan beyinde RFRP-1 ve RFRP-3 lifleri MSS'de paraventriküler talamik nükleusda, telensefalonda lateral septal çekirdekte, birçok hipotalamik nükleusda, orta beyinde periaquaduktal gri maddede, ponsda parabrachial nükleusda, medulla oblongatada (nükleus traktus solitariusda) bol miktarda bulunduğu görülmüştür. Talamusun çeşitli nükleuslarında ve omurilikte ise yalnızca RFRP-3 immünoaktivitesi belirlenmiştir (Yano ve ark. 2003). Çok sayıda RFRP-ir lifi sıçan beyinde de limbik ve hipotalamik alanlarda yoğunlaşmıştır (Johnson ve ark. 2007).

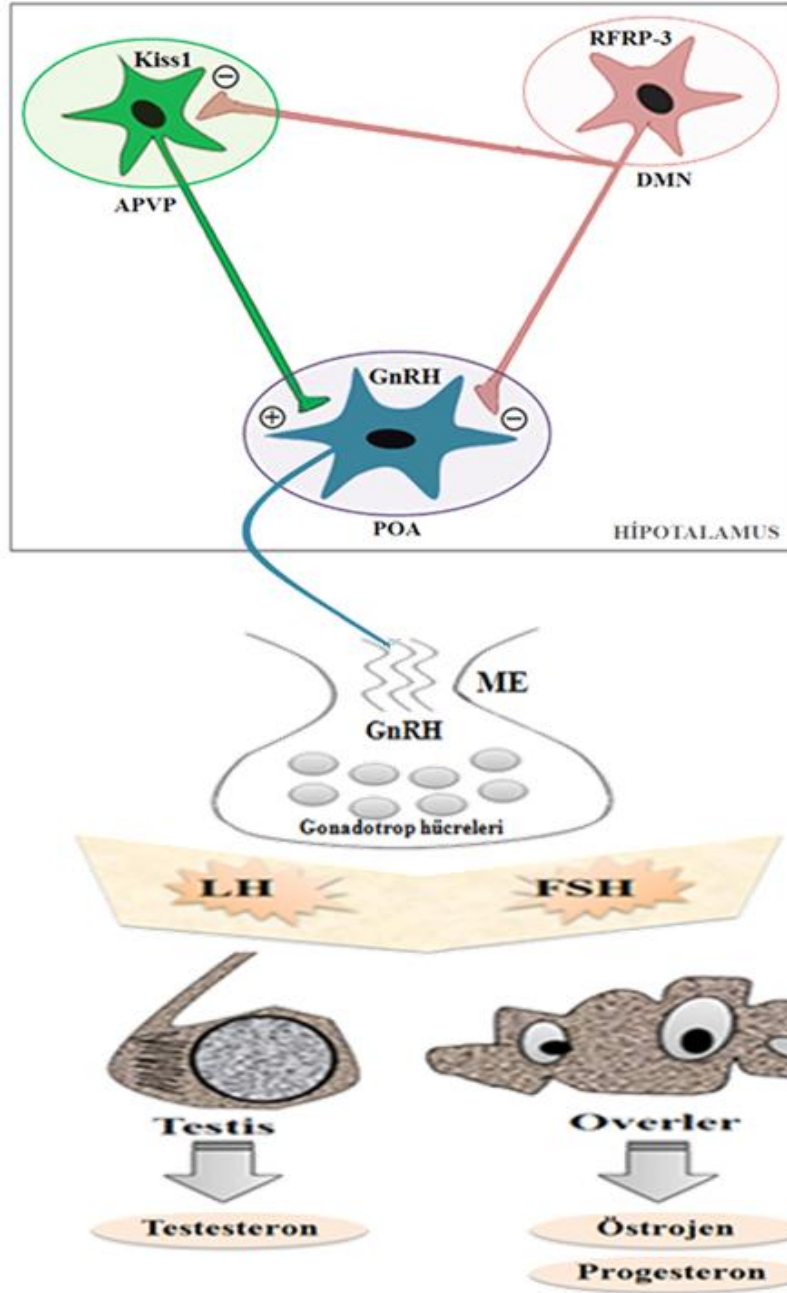
Hipotalamusta preoptik alan (POA)'da bulunan GnRH1 ve GnRH2 nöronlarında GPR147 mRNA ekspresyonu gösterilmiştir (Ubuka ve ark. 2008). RFRP-3 akson terminalleri bu nöronların somalarına uzanmaktadır (Bently ve ark. 2003). RFRP-3 nöronları, arkuat nükleustaki nöropeptit Y (NPY) ve pro-opiomelanokortin (POMC) nöronlarına, lateral hipotalamik alan (LHA)'da bulunan oreksin ve melanin-konsantr edici hormon (MCH) nöronlarına, DMN'daki oreksin hücrelerine, PVN'da yerleşen kortikotropin-salgılatıcı hormon (CRH) ve oksitosin nöronlarına projeksiyon göndermektedir (Qi ve ark. 2009).

1.1.7. RFRP-3 ve GPR147 Sinyalleşmesinin Tanımlanan Fizyolojik Etkileri

1.1.7.1. Gonadotropin Sentezinin ve Salgılanmasının İnhibisyonu

GnRH nöronal lifleri ve GnRH nöronlarının morfolojik etkileşimi ilk kez kuşlarda keşfedilmiştir. Beyinde GnRH'un iki formu tanımlanmıştır. GnRH1, ön hipofiz bezinden median eminens (ME)'e salıverilir ve gonadotropin sekresyonunu stimüle eder. İkinci formu GnRH2, kuşlarda ve memelilerde üreme davranışlarını uyarmaktadır (Ubuka ve ark. 2015). GnRH nöronları taşıdıkları GPR147 reseptörleriyle RFRP-3 nöronlarının hedef hücreleridir (Ubuka ve ark. 2012a).

GnIH'un santral (Johnson ve ark. 2007) ve periferik (Osugi ve ark. 2004, Kriegsfeld ve ark. 2006) uygulanması gonadotropin salgılanmasını baskılamaktadır. Dolayısıyla RFRP-3'ün, gonadotropin sekresyonunu doğrudan hipofizeyal düzeyde düzenlemesinin yanısıra GnRH nöronlarının aktivitesini azaltarak da inhibe ettiği kanısına varılmıştır. Sıçan ME'inde RFRP-3-ir liflerin çok daha az veya yok olması, RFRP-3'ün hipofiz üzerinde direk etkisinin olmadığı yönünde hipoteze yol açmıştır (Rizwan ve ark. 2009).



Şekil 1.2. HPG aksında RFRP-3 sisteminin inhibitör etkileri.

İnsanlarda ME'de bol miktarda RFRP-3-ir lif tespit edilmiştir. İnsan hipofizinde gonadotroplarda GPR147 mRNA'sının eksprese edildiği gösterilmiştir (Ubuka ve ark. 2009). Kemirgen beyinde üreme işlevinin modülasyonunda RFRP-3'ün, hem GnRH hem de kisspeptin nöronlarını direk etkilediği, gonadotroplar üzerinde ise direk bir etkiye sahip olmadığı ifade edilmiştir. GnRH nöronlarının yaklaşık % 26'sı ve kisspeptin nöronlarının yaklaşık % 19'u RFRP-3 liflerinin etkisi altındadır (Rizwan ve ark. 2012). Bununla birlikte, RFRP-3'ün ön hipofizi doğrudan etkileyebileceğini ve gonadotropin sekresyonunu inhibe ettiğini gösteren bir çalışmada da kayıtlara geçmiştir (Murakami ve ark. 2008).

Kültüre edilmiş fare beyni kesitlerinde RFRP-3 uygulaması, GnRH nöronlarının bir alt popülasyonunda ateşlenme oranını azaltmıştır (Ducret ve ark. 2009). RFRP-3'ün GnRH hücre hattı üzerine etkilerini incelemeyi amaçlayan bir diğer araştırma da Gojska ve arkadaşlarının (2014) yaptığı çalışmadır. Yeni bir GnRH nöronal hücre modeli (mHypoA-GnRH/GFP) kullanılarak RFRP-3'ün GnRH mRNA ifadesini baskıladığı gösterilmiştir (Gojska and Belsham 2014). Erkek farelere *in vivo* testesteron veya *in vitro* RFRP-3 uygulaması, GnRH salgılanma sıklığını azaltmıştır. Farelere RF9 verilmesi ile GnRH sekresyonu yeniden sağlanmıştır. Bu bulgular ile, GnRH'un testesteronla inhibisyonunun RFRP-3 bağımlı olabileceği sonucuna ulaşılmıştır (Glanowska ve ark. 2014).

RFRP-3, kültüre edilmiş sıçan hipofizinden de gonadotropin salgılanmasını ve sekresyonunu inhibe etmiştir (Pineda ve ark. 2010a). RFRP-3'ün periferik uygulanması da sıçanlarda gonadotropin salgılanmasını baskılamıştır (Murakami ve ark. 2008). Dişi sıçanlara intraserebroventriküler (icv) RFRP-3 enjeksiyonu, GnRH mRNA ekspresyonunun azalmasına, icv RF9 verilmesi ise artmasına neden olmuştur (Xiang ve ark. 2015). Sıçan ve farelere santral yolla RF9 uygulanmasının, gonadotropin konsantrasyonlarında belirgin bir artış ile sonuçlandığı kaydedilmiştir (Pineda ve ark. 2010b). RFRP-3'ün, hipotalamo-hipofizyal gonadal aks (HPG) üzerindeki merkezi inhibitör etkisini özellikle ovulasyonu uyaran östradiol-indüklemeli GnRH/LH dalgası sırasında gösterdiği rapor edilmiştir (Anderson ve ark. 2009).

1.1.7.2. Dişı Memelilerde Östrus ve Menstrual Siklusun Regölasyonu

Kemirgenlerde ovölasyonu tetikleyen temel sirkadiyen saat olan suprakiazmatik nükleus (SCN) ile RFRP sistemi arasında nöral bir rota ilk kez Gibson ve çalışma arkadaşları tarafından tanımlanmıştır. SCN'un hem dorsomedyal hem de ventrolateral alt bölgelerinden, RFRP-immünoreaktif hücelere yoğun bir projeksiyon gönderdiği gösterilmiştir. SCN'dan RFRP sistemine gönderilen bu liflere, RFRP hücelereinden SCN'a projeksiyonların olmadığı belirtilmiştir (Gibson ve ark. 2008).

SCN'un, DMH'daki RFRP-ir hücelere yoğun projeksiyonlarının gösterilmesi ile RFRP sistemi üzerinde yeni bir sirkadiyen kontrole işaret edilmiştir. RFRP-ir nöronların sayılarının ve aktivitelerinin LH piki sırasında baskılandığı da aynı araştırmacılar tarafından ifade edilmiştir. Elde edilen bu veriler, DMH ve RFRP sisteminin LH dalgasının ve ovölasyonun modölasyonunda önemli bir rolü olabileceği ihtimalini kuvvetlendirmektedir (Gibson ve ark. 2008).

Östrojen negatif geri bildiriminin GnRH nöronal sistemini sınırladığı bilinmektedir. RFRP-3, LH pikine izin veren östrojen negatif geri bildiriminin sirkadiyen-zamanlı uzaklaştırılmasına katılmaktadır. RFRP-3 hücelerelerinin SCN-kaynaklı vazopressin-erjik ve vazoaktif intestinal peptit (VIP)-erjik liflerle yakın ilişkili olduğu belirtilmiştir. VIP santral uygulaması, RFRP-3 hücelereyel aktivitesini yalnızca akşamları belirgin bir şekilde baskılarken, vazopressin sabah ya da akşam hiçbir etki göstermemiştir. RFRP-3 hücelereyelinin çoğunda VIP reseptörlerinin koekspresyonunun saptanmaması, SCN VIP-erjik sinyalleşmenin RFRP-3 hücelereyelini dolaylı yoldan inhibe ettiği hipotezine yol açmıştır. Tüm bu bilgiler birlikte ele alındığında, preovülator LH pikinin ve ovölasyonun kontrolünü sağlayan yeni bir sirkadiyen hiyerarşisi söz konusudur (Russo ve ark. 2015).

RFRP-3'ün farelerde östradiol ile negatif düzenlenen bir nöromodölator olduğu düşünölmektedir. RFRP-3 ekspresyonunun östrojenik *down-regölasyonunun*, östrojenin üreme aksına geri bildirimine katkıda bulunabileceği ifade edilmektedir (Molnár ve ark. 2011).

RFRP-1 nöronlarının postnatal gelişime etkisini araştırmak için dişı sıçanlarda östrus siklusu süresince RFRP-1-ir değişiklikleri kaydedilmiştir. RFRP-

1-ir nöronlarının yüzdesinin, proöstrus ve östrusla kıyaslandığında diöstrusda belirgin derecede yüksek olduğu bulunmuştur (Jørgensen ve ark. 2014). Sıçan hipotalamusunda östrus siklusu boyunca RFRP-3 gen ifadesi de araştırılmıştır. RFRP-3 mRNA ekspresyonunun proöstrus boyunca diöstrus fazından daha düşük düzeyde olduğu rapor edilmiştir. Bu bulgular, RFRP-3'ün sıçan östrus siklusunun kontrolüne katıldığını göstermektedir (Salehi ve ark. 2013).

Dişi primatların menstrual siklusu süresince RFRP-3 gen ifadesinin, siklusun geç foliküler fazında (GnRH/LH dalgasından hemen önce) luteal fazda olduğundan daha fazla olduğu da kaydedilen parametreler arasındadır (Smith ve ark. 2010).

1.1.7.3. Steroidogenez ve Germ Hücresi Olgunlaşması Üzerindeki Etkileri

Kemirgenlerde GPR147 gonadlarda da eksprese edilmektedir. RFRP-3 ve GPR147 sinyalleşmesinin steroidogenez ve germ hücresi olgunlaşmasında rollerinin olabileceği öngörülmüştür. Sıçan ovaryumunda GPR147 mRNA'sı gösterilmesine rağmen RFRP mRNA'sı tespit edilmemiştir (Oishi ve ark. 2012).

Fare ovaryumunda östrus siklusu süresince RFRP-3 proteininin ekspresyonundaki değişimler incelenmiştir. RFRP-3'ün proöstrus ve östrus fazlarında foliküllerin granülosa hücrelerinde ve diöstrus 1 ve 2 fazında luteal hücrelerde temel olarak lokalize olduğu bulunmuştur. Böylece, fare ovaryumunda GnRH-RFRP-3 sisteminin varlığı gösterilmiştir ve bu nöropeptitlerin foliküler gelişimin regülasyonuna katılabileceği sonucu çıkarılmıştır (Singh ve ark. 2011a).

İnsan ovaryumunda RFRP ve GPR147 sistemi ilk kez Oishi ve ekibi (2012) tarafından tanımlanmıştır. RFRP-3 ve GPR147 ekspresyonu, insan granuloza-lütein hücrelerinin primer kültüründe gösterilmiştir. RFRP-3'ün, ovaryumda temel olarak foliküllerin granuloza hücre tabakasında ve korpus lüteumda eksprese edildiği tespit edilmiştir. RFRP-3'ün, gonadotropinlerin indüklediği progesteron üretimini de inhibe ettiği kaydedilmiştir (Oishi ve ark. 2012).

1.1.7.4. Üreme Sisteminin Gelişimine ve Sürdürülmesine Katkıları

Sethi ve ekibi (2010), doğumdan sonra erkek farelerde RFRP-3'ün beyindeki ekspresyonunda ve testis fonksiyonlarında meydana gelen değişikliklerini analiz etmiştir. Testis aktivitesinin, 13 haftalık süre boyunca giderek arttığı gözlenmiştir.

Ancak, 13 haftadan daha yaşlı farelerde azalmaya başladığı rapor edilmiştir. 1 haftalık farelerde görülmeye başlanan RFRP-3-ir nöronların sayılarının ve boyutlarının 3. haftada iyice arttığı ve 7. haftaya kadar değişmeden kaldığı belirtilmiştir. Bu değer, 7. haftadan 13. haftaya kadar azalarak ilerlemiştir ve ilerleyen yaşlarda artış ile sonuçlanmıştır (Sethi ve ark. 2010). Farelerde postnatal gelişim sırasında RFRP-3'ün kayda değer azalmasının, puberteyi kolaylaştırabileceği düşünülmektedir (Semaan ve Kauffman 2015).

RFRP-1 ve -3 nöronlarının dağılımı, prenatal ve postnatal sıçan MSS'de de gösterilmiştir. RFRP mRNA'sı embriyonik 15. gün (E15)'den itibaren beyinde eksprese edilmeye başlanmıştır. RFRP eksprese eden nöronlar ilk olarak E16'de ve hipotalamusun kaudal kısmında görülmüştür. RFRP-3-ir ve RFRP-1-ir nöronal hücre gövdeleri ilk kez sırasıyla E16 ve E17'de tespit edilmiştir. Prenatal günler süresince RFRP-3-ir sinir liflerinin, RFRP-3-ir nöronal hücre gövdelerinin etrafında sınırlandığı ve dağılımının farklı şekilde düzenlendiği rapor edilmiştir (Yano ve ark. 2004).

Postnatal gelişim süresince RFRP-1-ir nöronların sayısı ve yoğunluğu, juvenil dönemden erişkinliğe geçiş sırasında erkek sıçanlarda değişime uğramamıştır. Dişi sıçanlarda ise iki parametrenin de peripubertal dönemden erişkinliğe geçerken belirgin bir şekilde arttığı belirtilmiştir (Jørgensen ve ark. 2014).

Hipotalamik RFRP-3 ve GPR147 mRNA düzeyleri, Quennell ve çalışma arkadaşları (2010) tarafından 2, 4, 6 ve 8 haftalık dişi ve erkek sıçanlarda ölçülmüştür. Dişilerde RFRP-3 gen ekspresyonu, yaşla birlikte artmıştır ve puberte döneminde en üst seviyeye ulaşmıştır. Erkek sıçanlarda ise gen ifadesinin artışı 2. ve 4. haftalar arasında gözlenmiştir (Quennell ve ark. 2010).

Sıçanlarda seksüel gelişim sırasında mRNA ve peptit düzeyinde RFRP-3 ile mRNA düzeyinde GPR147 değişimleri de araştırılmıştır. Erkek sıçanlarda prepubertal dönem boyunca RFRP-3 ve GPR147'nin hipotalamik mRNA düzeylerinin arttığı ancak postnatal 49. günden itibaren azalmaya başladığı bulunmuştur. Dişilerde ise RFRP-3'ün mRNA ekspresyonunun gelişim süresi boyunca artmaya devam ettiği, GPR147 ifadenin ise P16'dan itibaren yükseldiği ve P35'den itibaren azalmaya başladığı gözlenmiştir (Iwasa ve ark. 2012).

Artan yaş, RFRP-3 nöron sayısında ve GnRH nöronlarına gönderilen RFRP-3 inputlarında azalma meydana getirmektedir. RFRP-3 nöronlarının östrojene cevabının da yaşla birlikte azaldığını belirten bulgular mevcuttur (Soga ve ark. 2014).

1.1.7.5. Sosyo-seksüel Davranışların İnhibisyonu

GnRH'nın ikinci formu olan GnRH2'nin memelilerde üreme davranışlarını stimüle ettiği bilinmektedir (Temple ve ark. 2003; Barnett ve ark. 2006). GnRH2 nöronlarının GPR147 ekspresyonu gösterdiği (Ubuka ve ark. 2008) ve RFRP-3'ün GnRH2 nöronal aktivitesini inhibe ederek üreme davranışlarını baskıladığı ifade edilmiştir (Ubuka ve ark. 2015).

Santral RFRP-3 uygulaması, erkek sıçanlarda seksüel davranışları önemli ölçüde inhibe etmiştir (Johnson ve ark. 2007). Dişilerde seksüel davranışların RFRP-3 uygulanmasından sonra farklı bir şekilde etkilendiği görülmüştür. RFRP-3'ün icv verilmesi seksüel motivasyonu azaltmasına rağmen lordozis davranışında değişikliğe neden olmamıştır (Piekarski ve ark. 2013).

In vivo ve *in vitro* RFRP-3 uygulamasının spermatogenez ve steroidogenez gibi testiküler fonksiyonlar üzerine etkileri de araştırılmıştır. Yetişkin farelerde RFRP-3, spermatogenez ve steroidogenezini inhibe ederken, testiküler apoptozu indüklemiştir. Testesteron sekresyonunda ciddi bir azalış da kayıtlara geçmiştir (Anjum ve ark. 2014).

1.1.7.6. Beslenme Davranışının Stimülasyonu

RFRP peptitlerinin yalnızca üreme ile ilgili davranışları düzenlemekle kalmadığı aynı zamanda enerji dengesinin kontrolüne de katıldığı bulunmuştur. Enerji homeostazisi ve üremenin çok yakından ilişkili olduğu gösterilmiştir. RFRP-3'ün endojen opioid peptitlerin, POMC, NPY, melanosit uyarıcı hormon (MSH) ve MCH nöronlarından salıverilmesini modüle ederek beslenme davranışını uyardığı bildirilmektedir (Ubuka ve ark. 2015).

Johnson ve çalışma arkadaşları (2007), erkek sıçanlara santral RFRP-3 verilmesinin besin alımını önemli ölçüde arttırdığını gözlemlemiştir. RFRP-3 icv uygulaması, beslenme davranışını düzenleyen temel merkez olan arkuat nükleusda c-

Fos proteininin ekspresyonunu indüklemiştir yani arkuat nükleus nöronlarını aktifleştirmiştir (Yano ve ark. 2003). Dahası, gıda alınımının regülasyonunda rol aldığı bilinen DMH, PVN, nükleus traktus solitari (NTS) ve nükleus akumbens gibi beyin bölgelerinde RFRP-3 varlığı tespit edilmiştir (Yano ve ark. 2003; Kriegsfeld ve ark. 2006). RFRP-3 nöronları, ayrıca iştah düzenleyici POMC hücrelerine de projeksiyon göndermektedir. POMC nöronları, enerji alınımını düşürmede anahtar bir rol oynamaktadır. RFRP-3, POMC nöronlarını doğrudan postsinaptik etki yoluyla baskılamaktadır. RFRP3'ün anoreksijenik POMC nöronları üzerindeki inhibitör etkisini hücre membranında iyon (K^+) kanallarını açarak gösterdiği ortaya konulmuştur (Fu ve van den Pol 2010).

Nöropeptit Y, arkuat nükleus nöronlarında üretilen iştah düzenleyici oreksijenik peptitlerdendir ve NPY nöronlarının % 20'sinin RFRP-3 lifleriyle çok yakın yerleşimleri ortaya konulmuştur. RFRP-3, NPY nöronları üzerinde de inhibitör etkilere sahiptir. RFRP-3'ün hipotalamusdan NPY ve MSH sekresyonunu da baskıladığı belirlenmiştir (Jacobi ve ark. 2013).

Amigdalanın beslenme ve vücut ağırlığı kontrolüne katıldığı iyi bilinmektedir. RFRP-3-ir lifler amigdalanın merkez bölgesi (CeA)'ne kadar uzanmaktadır. CeA'ne RFRP-3 direk mikroenjeksiyonu, gıda alımında anlamlı bir azalma ile sonuçlanmıştır. Yapılan çalışmada RFRP-3'ün bu beslenmeyi baskılayıcı etkisinin RF9 ile ortadan kaldırılması da bu etkinin reseptör bağlantılı olduğuna işaret etmektedir (Kovács ve ark. 2014).

Birçok hayvan modelinde yapılan çalışmalar, HPG aksının düzenlenmesinde yağ dokusundan salgılanan leptin hormonunun önemine dikkat çekmiştir. Baskılanmış leptin sinyalleşmesinin GnRH'un nöronal aktivitesinde azalmaya yol açtığı bilinmektedir. Leptinin RFRP-3 nöronları üzerindeki etkisi araştırıldığında RFRP sisteminin leptin tarafından regülasyonunun söz konusu olmadığı rapor edilmiştir. Elde edilen bulgular sonucunda leptinin RFRP-3 nöronları üzerindeki etkisinin ya hiç olmadığı ya da çok az olduğu kaydedilmiştir (Rizwan ve ark. 2014). Buna karşın, RFRP-3 nöronlarının bir kısmının (% 15) leptin reseptörü (LepR)'nü eksprese ettiği ve bu az sayıdaki RFRP nöronlarının leptin sinyalleşmesinin direk hedefi olabileceği tespit edilmiştir. Ama yine de, üstün çoğunluk LepR eksprese etmediğinden dolayı leptin sinyalleşmesinin RFRP sistemi üzerinde olası etkilerini

dolaylı olarak gösterebileceği ifade edilmiştir. RFRP gen ifadesinin, leptin mutasyonlu (ob/ob) farelerde azaldığı belirtilmiştir (Poling ve ark. 2014). Leptinin RFRP-3 nöronlarında PKC-bağımlı yolakla hücre içi Ca^{+2} sinyalleşmesini aktifleştirdiği bulunmuştur. Bu çalışma da leptinin RFRP-3 nöronları aracılığıyla GnRH aktivitesini modüle edebileceği görüşünü destekleyici bulgular arasındadır (Poling ve ark. 2014; Ubuka ve ark. 2015).

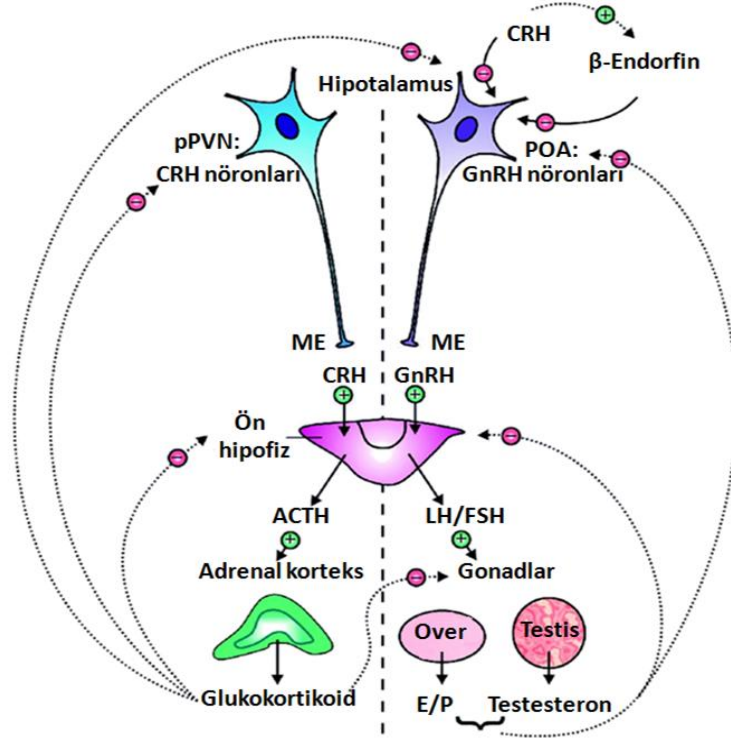
1.1.7.7. Büyüme Hormonunun Sentezinin ve Salgılanmasının Regülasyonu

RFRP-3'ün büyüme hormonu (GH) sentezi ve/veya salgılanmasının düzenlenmesinde rol alabileceği düşünülmektedir. Erkek sıçanlara RFRP-3'ün icv verilmesi, GH salgılatıcı hormonun mRNA düzeylerinde ve GH plazma konsantrasyonunda artış ile sonuçlanmıştır (Johnson ve ark. 2007).

1.1.7.8. Stres Cevabının Düzenlenmesi

Strese maruziyet, kemirgenler ve insanlar dahil birçok türde üreme ile ilgili bozukluklara yol açmaktadır. Akut veya kronik stresin, HPG'ın baskılanmasına yol açan hipotalamo-hipofizyal adrenal aks (HPA)'ı aktifleştirdiği bilinmektedir. Stresin üreme üzerindeki fonksiyonel etkileri, hipofizden LH salgılanmasının ve seksüel davranışların baskılanması olarak açığa çıkmaktadır. Stres, HPG fonksiyonu üzerindeki etkilerini adrenal stres hormonları olan glikokortikoid (GC)'ler üzerinden göstermektedir (Şekil 1.3). Hipotalamik RFRP-3 hücrelerinin, kortikosteron (CORT) ve CRH hormonlarının reseptörlerini eksprese ettikleri gösterilmiştir. Yaklaşık olarak RFRP-pozitif hücrelerin % 12,8'nin CRH reseptörü, % 53,1'nin ise GC reseptörü taşıdığı rapor edilmiştir (Ubuka ve ark. 2016). Stres altında CORT'un RFRP-3 transkripsiyonuna direk olarak etki edebileceği de söz konusu olabilmektedir (Son ve ark. 2014).

Sistemik RFRP-3 uygulaması, erkek sıçanlarda stresin etkilerine benzer sonuçlar doğurmuştur ve hem LH salgılanmasını hem de seksüel davranışları baskılamıştır. Üstelik RFRP ekspresyonu, stresle değişim göstermektedir. Tüm bu bilgiler ışığında RFRP-3'ün, stresin üreme üzerindeki etkilerinde güçlü bir aracı olarak davranabileceği düşünülmektedir (Kirby ve ark. 2009).



Şekil 1.3. HPA ve HPG aksı etkileşimi (Brunton 2013'den değiştirilerek alınmıştır).

Akut ve kronik stres, erkek sıçanlarda hipotalamik RFRP gen ifadesini arttırmıştır. Akut fiziksel kısıtlama stresinin, hipotalamik RFRP-3 mRNA ve peptit düzeyini arttırdığı belirtilmiştir. Kronik (14 gün süresince günde 3 saat) fiziksel kısıtlama stresi, kontrol grubuna kıyasla RFRP-3 ekspresyonunu 1,8 kat arttırmıştır. Kontrol grubuna göre stresli sıçanlarda DMH'da 1,9 kat daha fazla RFRP-ir hücre tespit edilmiştir. Ayrıca plazma LH konsantrasyonunda azalış da HPG fonksiyonlarının baskılandığını destekleyen bulgular arasında yer almaktadır. Adrenalektomi (ADX), stresin indüklediği RFRP ekspresyonundaki artışı önlemiştir. Bu verilerden stresin uyardığı RFRP ekspresyon artışının, adrenal hormonlara yani dolaşımdaki yüksek GC düzeylerine bağlı olduğu çıkarılmıştır (Kirby ve ark. 2009).

Gojska and Belsham, 2014 yılında RFRP-3 eksprese eden yeni bir hipotalamik hücre hattı (rHypoE-23) tanımlamıştır. Yapılan çalışmada GC agonisti deksametazonun rHypoE-23 nöronlarında RFRP ve GPR147 mRNA ekspresyonunu *up-regüle* ettiği gösterilmiştir (Gojska and Belsham 2014).

Yaşamı tehdit eden immün strese maruziyet durumunda, hipotalamik RFRP-3 ve GPR147 gen ifadesi düzeylerinin arttığı ifade edilmiştir. Üreme işlevi çok miktarda enerji gerektirdiğinden, immün stres altında gonadotropin sekresyonunun

baskılanmasının, enerjiyi immün cevap için saklama adına bir mekanizma olabileceği öngörülmüştür (Iwasa ve ark. 2014).

Neonatal stresin de, DMH’da RFRP-GPR147 sistemini aktifleştirerek puberte başlangıcını erteleyebileceği gösterilmiştir. Yenidoğan dişi farelerde tetiklenen inhibitör RFRP-3 sinyalleri, POA’da GnRH ekspresyonunun azalmasına, vajinal açılmanın gecikmesine ve düzensiz östrus siklusuna neden olmuştur (Soga ve ark. 2012).

1.1.7.9. RFRP-3 ve Anksiyete

RFRP eksprese eden nöronlar, strese karşı verilen davranışsal cevaplarda da rol almaktadır. Stres oluşturan uyarılar, dorsomedyal nükleusda RFRP eksprese eden nöronları aktifleştirmiştir. İcv RFRP enjeksiyonu, adrenokortikotropik hormon (ACTH) ve oksitosin salgılanmasını arttırmıştır. RFRP-3, oksitosin nöronlarını doğrudan aktifleştirebilmektedir (Kaewwongse ve ark. 2011). Kaewwongse ve çalışma arkadaşları (2011), RFRP-3 uygulamasının sıçanlarda yaptıkları açık alan testinde anksiyete benzeri davranışları uyardığını göstermiştir. Sonuç olarak RFRP, hem stresle ilişkili hormonları (ACTH ve oksitosin) hem de açık alan testinde anksiyete ile ilişkili davranışları indüklemiştir (Kaewwongse ve ark. 2011).

RFRP-GPR147 sisteminin olası anksiyojenik etkileri üzerine yapılan diğer araştırma, Kim ve ekibinin (2015) yaptığı çalışmadır. RFRP-3 ilk kez anksiyojenik bir nöropeptit olarak tanımlanmıştır. RFRP-3, kortikosteron salgılanmasını uyaran ve anksiyojenik cevaplara yol açan güçlü bir HPA aktivatörü olarak rapor edilmiştir. Ama yine de, endojen RFRP peptitlerinin stres cevabında aldıkları net rol açıklığa kavuşmamıştır (Kim ve ark. 2015).

1.1.8. Hipokampal RFRP-3

Hipokampusda RFRP-3-ir lifler CA2/CA3 bölgelerinde geniş bir dağılım göstermektedir. Hipokampal RFRP-3 lif projeksiyonlarının en yoğun CA2/CA3’ün piramidal tabakalarında bulunması, RFRP peptitlerinin hipokampal aktivitenin modülasyonuna katılabileceğini düşündürmüştür. RFRP-3 reseptörlerinin kemirgen hipokampusunda tespit edilen varlığı da bu görüşü desteklemektedir (Rizwan ve ark. 2009).

Ferris ve çalışma arkadaşları (2015), RFRP-3-ir liflerin yanısıra erişkin sıçan hipokampusunda ilk kez RFRP-3-ir hücre gövdeleri tespit etmiştir. RFRP-3 immünoaktivitesi gösteren hücre gövdelerinin % 100'ünün astrosit biyobelirteci olan glial fibriler asidik protein (GFAP) ile kolokalize olduğu gösterilmiştir. Böylece, hipokampal astrositlerde lokal olarak RFRP-3 sentezlendiği kayıtlara geçmiştir. Bu bulgular, RFRP-3 nöropeptininin HPG aksı dışındaki olası rollerine ışık tutmaktadır (Ferris ve ark. 2015).

1.2. Erişkin Nörogenез

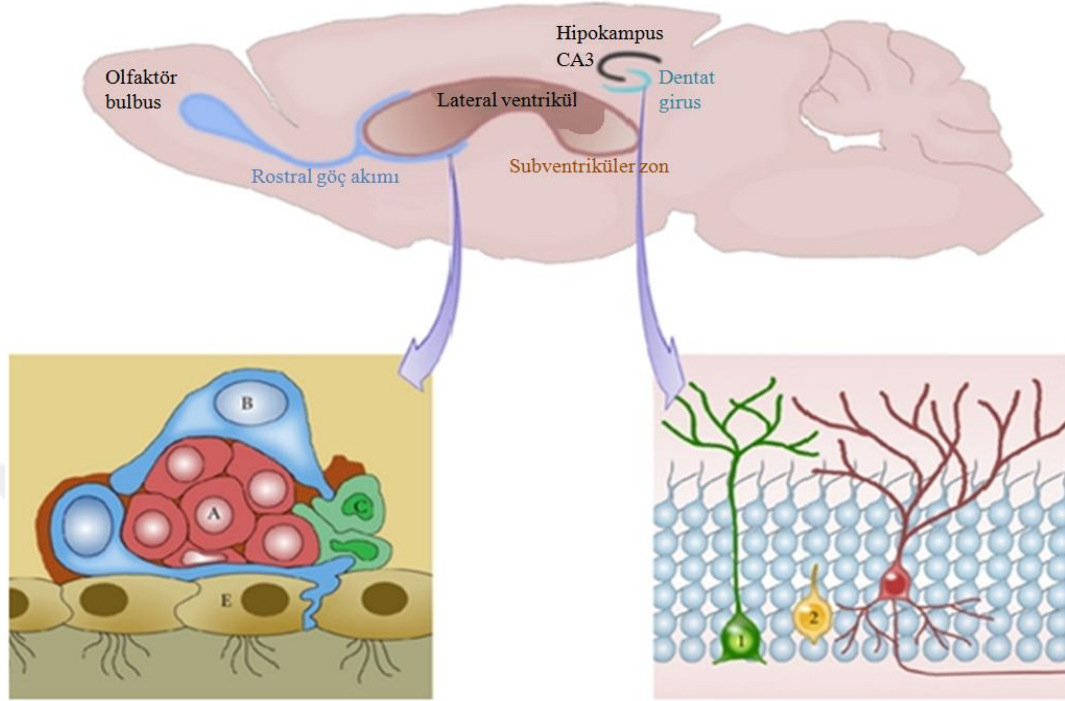
Nörogenезin (yeni nöron üretiminin), 1965'te Joseph Altman tarafından keşfine kadar yalnızca gelişim aşamasında mümkün olduğuna ve ergenlik süreci ile durduğuna inanılmıştır (Winner ve Winkler 2015). Erişkin memeli beyni plastisiteden uzak, sabit bir yapı olarak düşünülmüştür. Erişkin nörogenез bugüne kadar insanlar da dahil tüm memelilerde tanımlanmıştır (Eriksson ve ark. 1998).

Erişkin nörogenез, yetişkin hipokampusunda bulunan nöral prekürsör hücrelerden kaynaklanmaktadır (Jin ve Galvan 2007). Erişkin MSS'de yeni üretilen nöronlar, kök hücreler ve progenitör hücrelerden meydana gelmektedir. Her iki tip hücre de nöronal prekürsör hücreler olarak kabul edilmektedir. Erişkin hipokampal prekürsörler, nöronları, astrositleri ve oligodendrositleri meydana getiren multipotent hücrelerdir (Bonaguidi ve ark. 2001; DeCarolis ve Eisch 2010). Yenidoğanlar, temel olarak nöronlara farklılaşmaktadır. Çok düşük oranda astrositlere ve nadiren de mikroglia veya oligodendrositlere farklılaştığı gösterilmiştir (Abrous ve ark. 2005).

Yeni nöronlar yetişkin beyninde ayrıcalıklı iki bölgede üretilmeye devam etmektedir: hipokampusda dentat girus (DG)'un subgranüler zonu (SGZ) ve lateral ventrikülün lateral duvarı boyunca yerleşen subventriküler zon (SVZ). Bu bölgelerde nöron üretimi yaşam boyu gözlenmektedir (Jin ve Galvan 2007).

SVZ, erişkin kemirgen ve yetişkin insan beyninde çoğalan hücre popülasyonunun en çok bulunduğu bölge olarak kayıtlara geçmiştir. Farelerde günlük SVZ'da bilateral olarak üretilen yeni hücre sayısının 30,000 olduğu tahmin edilmektedir (Abrous ve ark. 2005). SVZ'da yenidoğan hücreler olfaktor bulbusa doğru rostral göç akımı (RMS) boyunca uzun bir mesafeyi aşarak göç etmektedir.

Hedef bölgeleri olan koku merkezine ulaşır, internöronlara farklılaşmaktadır ve koku uyarısına cevap vermeye başlamaktadır (Ming ve Song 2011).



Şekil 1.4. Memeli beyinde erişkin nörojeniz. SVZ'da ependimal hücre tabakası (E)'na komşu uzanan progenitör hücre tipleri A,B ve C. SGZ'da tip 1 hücreleri (1) ve tip 2 hücreleri (2) (Dias ve ark. 2012).

1.2.1. Erişkin Hipokampal Nörojeniz

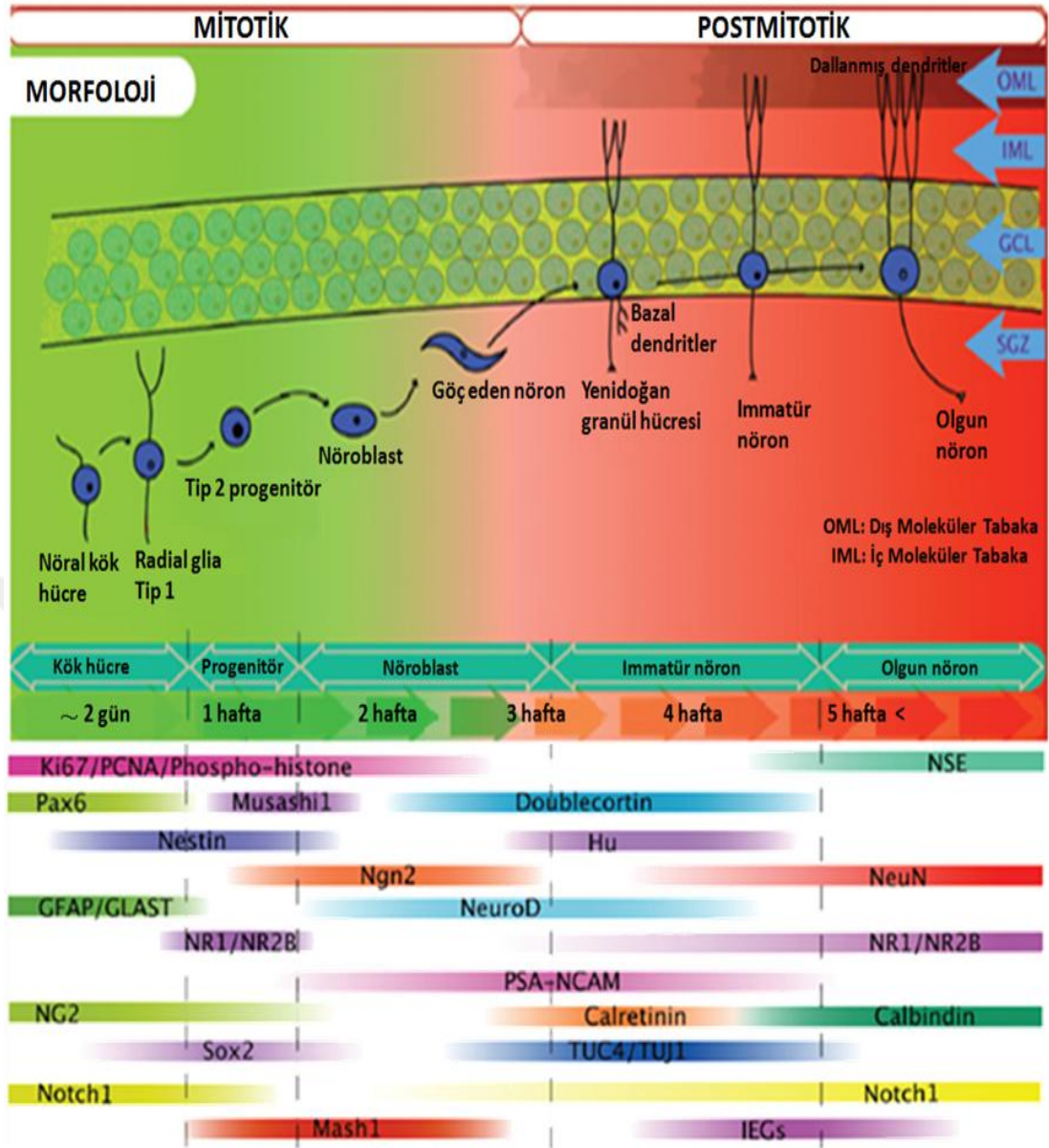
Erişkin hipokampal nörojeniz, nöral kök hücrelerin çoğalmasını, yenidoğan hücrelerin hayatta kalımı ve farklılaşmasını, hipokampal ağa fonksiyonel entegrasyonunu içeren, çok basamaklı ve kompleks bir süreçtir (Ming ve Song 2011; Christian ve ark. 2014).

Hipokampal nörojeniz temel olarak dört aşamadan oluşmaktadır. Nöral kök hücrelerin ve progenitörlerin bölünerek çoğalması, mitoz sonucu yenidoğan hücrelerin hayatta kalması ve farklılaşması ve oluşan olgun nöronun var olan hipokampal ağa katılmasıdır. Erişkin nörojeniz, SGZ'da öncü kök ve progenitörlerin yavaşça çoğalması ile başlamaktadır. Daha kısıtlı progenitörlerin hızlıca bölündükleri ikinci çoğalma fazı ile devam etmektedir ve genç hücrelerin eliminasyonu ya da sağkalımı için seçim aşaması ile süregelmektedir. Postmitotik gelişimin son safhasını oluşturan, hayatta kalan hücrelerin önceden var olan nöronal ağa katılımı ve gittikçe artacak olan nöronal bağlantı ve nöronal yapılarındaki fizyolojik değişiklikleri ile son bulmaktadır (Ehninger ve Kempermann 2008). Nörojeniz

dinamik bir süreçtir. Prekürsör hücreler bölünmeye devam ederken aynı anda nöroblastlar göç ederek farklılaşmaktadır ve immatür nöronlara dönüşmektedirler. Postmitotik ve fonksiyonel olarak entegre yeni bir hipokampal nöronun oluşabilmesi için tüm bu aşamalar sırasıyla gereklidir (Kempermann ve ark. 2015) (Şekil 1.5).

Hipokampusdaki nörogenez, dentat girusta SGZ ile sınırlıdır ve erişkin hipokampal nörogenez, yalnızca tek tip nöronu (DG'un temel ekstatör nöronları olan granül hücrelerini) üretmektedir (Ming ve Song 2011; Christian ve ark. 2014; Kempermann ve ark. 2015). Glutamaterjik granül nöronlarının yanısıra yenidoğanların küçük bir yüzdesinin (% 14) GABAerjik basket hücrelerine de farklılaşabileceğini gösteren bulgular literatürde yer almaktadır (Liu ve ark. 2003).

Genç erişkin sıçanların, DG'da her gün 9,000 yeni hücre ürettiği tahmin edilmektedir ki bu rakam aylık toplam granül hücre popülasyonunun % 6'sına yaklaşıktır. Yetişkin insanların ise, her bir hipokampusuna günlük 700 nöron eklediği öngörülmüştür (Christian ve ark. 2014). Yeni oluşan hücreler, DG'un granüler tabakasına entegre olmaktadır ve aksonlarını ve dendritlerini hedef bölgelerine uzatmaya başlamaktadır (Duan ve ark. 2008). Farklılaşan, olgunlaşan yeni bir nöronun beklenen, elektriksel olarak aktif, fonksiyonel bir nörona dönüşmesidir. Yeni granül hücreleri, aksonlarını CA3 bölgesine doğru, dendritlerini de moleküler tabakaya doğru uzatmaktadır. Böylece, entorhinal korteksten input almaktadır ve aldıkları bu bilgiyi CA3 piramidallerine ileterek hipokampal ağa fonksiyonel olarak entegre olmaktadır. Doğumlarından bir ay sonra yeni nöronların elektrofizyolojik yapıları ve işlevleri açısından olgun granül nöronlarından farklarının olmadığı gösterilmiştir (Abrous ve ark. 2005).



Şekil 1.5. Erişkin hipokampal nörogenez basamakları ve biyobelirteçleri (Perera ve ark. 2008'den değiştirilerek alınmıştır).

1.2.2 Erişkin Hipokampusda Nörojenik Yatak: SGZ

Dentat girusta erişkin nörogenez, granül hücre tabakası ve hilus arasında uzanan ince bir bant şeklinde bir doku olan SGZ'da yerleşen prekürsör popülasyonundan köken almaktadır. Hücre çoğalmasının çok büyük bir kısmı burada gerçekleşmektedir. SGZ, yetişkin beyninde progenitör hücreler açısından önemli bir depo görevi görmektedir. Nöral kök hücreler veya progenitörler diğer beyin bölgelerinde de yer almaktadır. Nörojenik olmayan bu bölgelerde yerleşen nöral kök hücreler sessiz halde beklemektedir ve potansiyellerini kullanmamaktadır. Bu yüzden nörogeneze izin veren nörojenik bölgelerde düzenleyici çevresel faktörlerin kök

hücrelerden bağımsız şekilde önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. Alternatif bir görüş olarak da nörojenik olmayan bölgelerde yerleşen kök hücrelerden meydana gelecek nörogenezin aktif bir şekilde baskılandığı ortaya atılmıştır. Tüm bileşenleriyle nörogeneze izin veren bu özel mikro çevre “nörojenik yatak” veya “nöral kök hücre yatağı” olarak adlandırılmaktadır (Ehninger ve Kempermann 2008; Zhao ve ark. 2008).

Erişkin beyindeki nöral kök hücre yatakları çeşitli hücre tiplerini ve doku komponentlerini içermektedir. Kök veya progenitör hücreler ve bunlardan oluşan yavru lar, astrositler, oligodendroglialar, mikroglialar ve immün hücreler bunlar arasında yer almaktadır (Kempermann ve ark. 2015; Ming ve Song 2011). Nörojenik yataklarda endotel hücrelerinin trofik faktörler salgılayarak kök benzeri hücrelerin yenilenmesinde kritik bir regülatör olabileceği de dikkat çekici bir husustur (Abrous ve ark. 2005).

1.2.3. Hipokampal Nörogenezle Üretilen Hücre Tipleri ve Biyobelirteçleri

1.2.3.1. Tip 1 Hücreleri ve Biyobelirteçleri

Erişkin nörogenez, radial glial ve astrositik yapılara sahip olan bir kök hücreden (Tip 1 hücre) orjinlenmektedir. Beynin sınırlı bölgelerinde radial glia hücreleri sadece astrositleri oluşturmakla kalmamaktadır, astroglial kök hücrelere veya progenitör hücrelere de dönüşebilmektedir. Kök hücreler, hücre bölünmesi yoluyla kendilerini yenileyebilme ve çok sayıda değişik hücre tipine farklılaşma kabiliyetleri bulunan hücrelerdir (Ming ve Song 2011; Braun ve Jessberger 2014).

Tip 1 hücrelerinin somaları, üçgenimsidir ve SGZ’da yerleşiktir. Apikal uzantılarını DG’un moleküler tabakasına doğru uzattıkları ve kan damarlarıyla temasa geçtikleri gösterilmiştir. Üçgenimsi somadan çıkan daha kısa uzantıları ise, SGZ’un tabanında uzanmaktadır. Bu tip hücreler, SGZ’da göreceli olarak bol miktarda bulunmaktadır fakat nadiren bölünmektedir (von Bohlen ve Halbach 2011; Ehninger ve Kempermann 2008).

Erişkin nörogenezin her bir aşaması sırasında çeşitli spesifik belirteçler eksprese edilmektedir. Bu belirteçlerin tespiti ile nörojenik süreç ve yenidoğan hücrelerin kaderi detaylı ve net bir şekilde izlenebilmektedir (Duan ve ark. 2008; von

Bohlen ve Halbach 2011). Tip 1 hücreleri, glial fibriler asidik protein (GFAP) ve ara filament nestini eksprese etmektedir fakat belirgin bir postmitotik astrosit popülasyonunda eksprese edilen kalsiyum bağlayan protein S-100 beta için negatiftir. İlâveten, radial gliamarker beyin lipid-bağlayan proteini ve SRY-ilişkili HMG-box gen2 (Sox2) ekspresyonu göstermektedirler (Duan ve ark. 2008; Braun ve Jessberger 2014; von Bohlen ve Halbach 2011).

1.2.3.2 Tip 2 Hücreleri ve Biyobelirteçleri

Tip 1 hücreleri, hızlıca çoğalan ara progenitör hücrelerini -tip 2 hücrelerini oluşturmaktadır (Braun ve Jessberger 2014). Tip 2 hücreleri (progenitörler), yüksek proliferatif aktivite göstermektedir (Abrous ve ark. 2005; von Bohlen ve Halbach 2011). Yeni üretilmiş hücre havuzunun genişlemesi, temel olarak tip 2 hücre fazı sırasında gerçekleşmektedir (Kempermann ve ark. 2015; Braun ve Jessberger 2014). Tip 2 hücreleri, apikal çıkıntılara sahip değildir ve küçük bir soma, düzensiz şekilli bir nükleus, kısa ve horizontal olarak yönelmiş çıkıntılar ile karakterizedir (Ehninger ve Kempermann 2008).

Tip 2 hücreleri, çeşitli glial ve nöronal belirteçlerin ifadenmesinde örtüşme göstermektedir. Öncü tip 2 hücreleri, kök hücre biyobelirteci Sox2'yi sentezlemektedir. Tip 2 hücreleri iki alt popülasyona ayrılabilir ve ikisi de nestin-positiftir. Tip 2a olarak adlandırılan alt grup, immatür nöronal belirteci *doublecortin* (DCX) için negatiftir; Tip 2b, DCX için pozitiftir (Ehninger ve Kempermann 2008; von Bohlen ve Halbach 2011). Tip 2a progenitörleri, glial biyobelirteçleri eksprese etmeye devam etmektedir fakat karakteristik radial hücre morfolojisinden yoksundur. Tip 2 hücreleri Eomes (Tbr2) ekspresyonlarıyla da karakterizedir. Tbr2'nin Sox2'yi baskıladığı ve kök hücrelerden progenitör hücrelere dönüşüm için kritik olduğu öngörülmektedir (Kempermann ve ark. 2015).

1.2.3.3. Tip 3 Hücreleri ve Biyobelirteçleri

Tip 3 aşaması, yavaşça çoğalan nöroblastlardan postmitotik immatür nöronlara geçiş fazıdır. Normal koşullar altında, tip 3 hücrelerinin proliferatif aktiviteleri çok değildir fakat nöbet durumu gibi patofizyolojik bir koşulda, belirgin bir şekilde proliferatif aktivitelerini arttırmaktadırlar (Kempermann ve ark. 2015). Tip 3 hücrelerinin morfolojileri de oldukça çeşitlilik göstermektedir: çıkıntılıların

yönü horizontalden vertikale kadar değişebilmektedir ve çıkıntılarının boyu ve kompleksliği de çeşitlilik gösterebilmektedir (von Bohlen ve Halbach 2011).

Hücre döngüsünden çıkış, bu aşamada gerçekleşmektedir (Kempermann ve ark. 2015) ve kalsiyum bağlayan protein kalretininin geçici ekspresyonu da bu zamana rastlamaktadır. Hücre bölünmesinden 2-3 hafta sonra kalretinin, postmitotik immatür nöron popülasyonunu işaretlemeyi sağlayan kalbindin ile yer değiştirmektedir. Kalretinin ekspresyonu süresince gelişimin büyük kısmı tamamlanmaktadır ve dendritik dallar ve akson CA3 bölgesine doğru uzatılmaktadır. Akson dallanması, sinaptik bağlantılardan önceki aşamadır. Dendritik filizlenmeler hücre bölünmesinden yaklaşık bir hafta sonra gözlenmeye başlanırken, CA3 ile aksonal bağlantı en erken 10 gün sonra başlamıştır (Ehninger ve Kempermann 2008). Yeni granül hücrelerinin eksitator inputları tam olarak almasının, hücre bölünmesinden yaklaşık olarak iki ay sonra tamamlandığı gösterilmiştir (Toni ve ark. 2007). Tip 3 hücreleri, nöronal kökenli biyobelirteçler (DCX) eksprese ederken; glial kökenli hiçbir belirteç ekspresyonu göstermezler (Kempermann ve ark. 2015; von Bohlen ve Halbach 2011).

Yeni nöronlar, nöron spesifik nükleer antijen (NeuN/RbFox3) ve kalretinin gibi postmitotik belirteçler eksprese etmektedir. Yenidoğan hücrelerin çoğunun, birkaç gün içerisinde apoptozla elendiği gözlemlenmiştir (Christian ve ark. 2014); fonksiyonel bağlantılarını (akson, dendrit gelişimi ve sinaptogenez gibi) kurabilenler postmitotik olgunlaşma fazını oluşturmaktadır. Farklılaşma sırasında terminallerini oluşturamayan ya da terminal farklılaşmasını tamamlayamayan hücrelerin, immatür nöronlara dönüşmeden doğumlarından sonraki bir hafta içinde öldükleri rapor edilmiştir ki bu yenidoğan hücrelerin % 60'ını etkileyen bir süreçtir. NeuN-pozitif yeni nöron sayısı, en erken dönemlerde en yüksektir ve birkaç gün içinde dramatik bir şekilde azalmaktadır. Yenidoğanların çoğu, hedef bölgeleri CA3 ile fonksiyonel temas kurmadan veya entorhinal korteksten dendritik inputları almadan önce elenmektedir (Kempermann ve ark. 2015). İlk iki hafta hayatta kalan hücrelerin, DG ağına sabit ve kalıcı olarak entegre olduğu belirtilmiştir. Bu aşamadan sonra artık hücre sayısında çok küçük değişiklikler meydana gelmektedir. Var olan ağa yapısal entegrasyonun tamamlanmasından sonra, yeni hücreler, kalsiyum bağlayan

proteinlerini kalretininden kalbindine değiştirmektedir (Ehninger ve Kempermann 2008).

Dentat girusta olgunlaşan yeni eksitatör granül hücrelerinin aksonları, dentat girusu CA3'e bağlayan mossy liflerini oluşturmaktadır (Christian ve ark. 2014). Entorhinal korteksten aldıkları bilgiyi, mossy lifleri aracılığıyla CA3 piramidal nöronlarına iletmektedirler. Aktiviteleri, dentat girus ve hilusta bulunan çok sayıda ara nöron tarafından modüle edilmektedir (Ming ve Song 2011; Kempermann ve ark. 2015).

1.2.4. Yenidoğan Hipokampal Nöronların Fonksiyonel Önemi

Erişkin nörogenez, yalnızca kaybedilen nöronlar için temel bir replasman mekanizması sunmakla kalmamaktadır, aynı zamanda plastisite kapasitesini genişleten gelişimsel bir süreç olarak da yaşam boyu devam etmektedir. Erişkin DG'da üretilen yeni nöronlar olgunlaşma ve entegrasyon aşamaları süresince geçici olarak eşiş özellikler sergilemektedir. Erişkin beyninde doğan granül hücrelerini, hipokampusda var olan olgun nöronlardan farklı kılan en önemli etkenler, gamma-aminobütirik asit (GABA) ile depolarize olmaları (3 haftalıktan küçük nöronlar), artmış eksitabiliteleri, uzun süreli potansiyasyon (LTP) için oldukça düşük eşiş değerine sahip olmaları ve LTP genliklerinin fazla olması şeklinde ifade edilmektedir (Ge ve ark. 2008). Genç granül hücreleri, eşiş bir elektrofizyolojik yapıya sahiptir. Aktivasyon eşişikleri daha düşüktür ve dinlenme zar potansiyelleri daha yüksektir. Uzun süreli potansiyasyona çok daha kolay uğrarlar. N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptör yapılarındaki değişiklikler de genç ve yaşlı granül nöronları arasındaki farklı plastisite profiline katkı sağlamaktadır (Ge ve ark. 2007). Daha düşük uyarılma ve plastisite eşişinin, genç granül nöronlarının lokal fonksiyonel ağa daha rahat katılımını sağlayabileceği öne sürülmüştür (Ehninger ve Kempermann 2008).

Yenidoğan hücrelerin var olan hipokampal devrelere stratejik entegrasyonlarının devam etmesi, hipokampal nöroplastisite ile sonuçlanmaktadır ve beyin fonksiyonlarına spesifik katkılar sağlayabilmektedir. Yeni nöronların, hipokampusdaki plastisiteyi sağlayan birçok mekanizmaya katıldığı gösterilmiştir. Öğrenme ve bellekte, duygu durum kontrolünde, strese cevapta ve sosyal

davranışlarda kritik rolleri bulunmaktadır (Christian ve ark. 2014; Cameron ve Glover 2015).

Erişkin nörogenezin öğrenmenin çeşitli safhalarına etki ettiği ve öğrenmeyi hızlandırdığı belirtilmiştir. Girdileri kodlama, konsolidasyon, depolama ve geri çağırma, DG'da yeni, hipereksitabl granül nöronlarının zaman sınırlı rolleri arasında yer almaktadır (Stuchlik 2014; Eisch ve ark. 2008). Öğrenme ve erişkin nörogenez birbirine bağlı bir şekilde düzenlenmektedir. LTP'nin sürekliliği bellek kaybını engelleyen en temel mekanizma olarak bilinmektedir ve LTP inhibisyonu belleğin silinmesiyle sonuçlanmaktadır. Bir anının kodlanması için hipokampal sinapslarda LTP indüklenmektedir. İmmatür hipokampal nöronlar, sahip oldukları düşük LTP eşiği ile yeni anıların kodlanmasına katılmaktadır (Stuchlik 2014).

Uzamsal haritalamanın hipokampusun önemli bir fonksiyonu olduğu bilinmektedir. Hipokampal bağımlı uzamsal test olarak en çok kullanılan labirentin Morris su labirenti (MWM) olduğu kuvvetle muhtemeldir. MWM'de yapılan deneylerde bozulmuş nörogenezin öğrenme ve uzamsal bellek üzerine olumsuz etkileri gösterilmiştir. Erişkin nörogenezden yoksun farelerin uzamsal stratejiyi kullanmada normal farelere göre daha yavaş olduğu kayıtlara geçmiştir. Azalmış keşfetme motivasyonu veya artmış anksiyete gibi çeşitli davranış değişikliklerinin de bu etkiyi oluşturmada rollerinin olabileceği düşünülmektedir (Stuchlik 2014; Cameron ve Glover 2015).

Öğrenme sürecinde tek bir öğrenim deneyiminden sonra, aktifleşen erişkin nörogenezle üretilen granül hücrelerinin oranı, ventral DG'da dorsal DG'dan daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Ventral hipokampusun emosyonel bellek ile ve dorsal hipokampusun uzamsal bellek ile yakın ilişkili olduğu öne sürülmüştür. Bu datalar yeni nöronların uzamsal belleğe ek olarak, duygusal açıdan hipokampal davranışlara daha çok katılabileceğini düşündürmüştür (Eisch ve ark. 2008). SGZ'da meydana gelen nörogenezin mod regülasyonundaki potansiyel rolü, ilk kez Gould ve ekibi tarafından araştırılmıştır. SGZ'da hücre bölünmesinin, insanlarda ve hayvanlarda strese maruziyetin uyardığı kortikosteroidler tarafından baskılandığı rapor edilmiştir (Gould ve ark. 1992; Zhao ve ark. 2008). Günümüzde erişkin hipokampal nörogenezin modun yükseltilmesinde önemli bir faktör olduğu düşünülmektedir.

Azalmış ya da bozulmuş nörogenezin depresyon ve anksiyeteye yol açabileceği ifade edilmektedir (Petrik ve ark. 2012; Cameron ve Glover 2015).

1.2.5. Erişkin Nörogenezin Kontrolü

İntrensek programlar ve ekstraselüler çevresel faktörler erişkin nörogenezi farklı açılardan birlikte düzenlemektedir. Büyüme faktörleri, nörotrofinler, sitokinler ve hormonlar erişkin nörogenezin temel düzenleyicileridir. Nörojenik yatak ile ilgili faktörler ve reseptörler, stoplazmik faktörler, transkripsiyonel faktörler ve epigenetik regülatörler tanımlanan etkenler arasında yer almaktadır (Grote ve Hannan 2007; Zhao ve ark. 2008; Winner ve Winkler 2015).

Notch, Sonic hedgehog (Shh), Wnt ve kemik morfojenik proteinleri (BMP) dahil çok sayıda morfojen, erişkin nöral prekürsörlerinin devamını, aktivasyonunu ve kaderini değiştirebilecek nörojenik yatak sinyalleri olarak hizmet etmektedir. Wnt3'ün, nöral kök hücre yatağında astrositlerden kaynaklanabileceği ve erişkin SGZ'da nöronal prekürsör hücrelerin çoğalmasını uyardığı rapor edilmiştir. Buna karşın BMP'nin yetişkin beyninde glia farklılaşmasını uyardığı ve nöral farklılaşmayı inhibe ettiği tespit edilmiştir. Nöral prekürsörlerde Notch sinyalleşmesinin delesyonu, prekürsör kayıplarıyla ve nörogenezin devamlılığının korunamaması ile sonuçlanmıştır. Notch sinyalleşmesinin erişkin SVZ'da nörojenik yatak komponentlerini düzenlediği de ileri sürülmüştür. Ephrinler ve Eph reseptörleri, SVZ'da hücre proliferasyonunun regülasyonunda rol oynamaktadır. Shh sinyalleşmesi de radial glia benzeri hücreleri aktifleştirmektedir. Bu hücrelerin hem SVZ'da hem de SGZ'da varlıklarını ve yerleşimlerini sürdürmeleri için Shh sinyalinin gerekli olduğu belirtilmiştir (Ming ve Song 2011).

Dentat girus ve olfaktör bulbus farklı nörotransmitterler ve nöropeptitlerin salıverildiği birçok beyin bölgesinden gelen inputlarla donatılmıştır. Glutamat, GABA, asetilkolin gibi temel nörotransmitterler, göç, olgunlaşma, entegrasyon ve yavru nöronların sağkalımını doğrudan modüle etmektedir. Klinikte kullanılan antidepresanlar, erişkin hipokampusda serotonin ve norepinefrin düzeylerini değiştirerek nöral progenitör proliferasyonunu ve hayatta kalan yenidoğan nöron sayısını arttırmaktadır ve dendritik gelişimlerini hızlandırmaktadır. Erişkin SVZ'da nöroblastlardan salıverilen GABA'nın prekürsör çoğalmasını durdurarak nöroblast

göçünü uyardığı gösterilmiştir. Erişkin SGZ’da GABA, dendritik gelişimi, sinaps oluşumunu ve yenidoğanların sağkalımını uyarmaktadır. NMDA reseptör sinyalleşmesi, erişkin SVZ’da nöroblastların ve SGZ’da immatür nöronların sağkalımını düzenlemektedir (Grote ve Hannan 2007; Ming ve Song 2011).

Erişkin nörogenezin hücre içi yönetiminde hücre döngüsü regülatörleri, transkripsiyon faktörleri ve epigenetik mekanizmalar anahtar rol oynamaktadır. Hücre çoğalmasının kontrolünde retinoblastoma proteini (Rb) ve p107, p130, nektin, E2F protein ailesi rol almaktadır. Rb proteininin seviyesindeki artışın nöronal progenitör hücrelerin mitozaya girişi için önemli bir adım olduğu ve çoğalma üzerine etkisini hücre siklusunun G1 fazından S fazına girmesini sağlayarak gösterdiği ortaya konulmuştur. p16, p21 ve p53 gibi hücre döngüsü inhibitörleri, sessiz kök hücre havuzunun varlığının sürdürülmesinde görev almaktadır (Abrous ve ark. 2005).

Yaşlanma, öğrenme deneyimleri ve fiziksel aktivite erişkin nörogenezin her bir fazını düzenleyebilen fizyolojik faktörlerdir. Hipokampal nörogenez, fizyolojik etmenlerin yanı sıra stres ve obezite gibi patolojik koşullara da oldukça hassastır (Zhao ve ark. 2008).

Hipokampal nörogenezin yaşla birlikte önemli ölçüde azaldığı bilinmektedir. Yaşlı hayvanlarda progenitör hücre çoğalması, nöronal farklılaşma ve sağkalım oldukça düşük düzeyde seyretmektedir (Taylor ve ark. 2013). 9-10 haftalık sıçanlarda yapılan çalışmada DG’da yenidoğan hücre sayısı günlük yaklaşık olarak 9,000 olarak belirlenmiştir ancak 4 aylık sıçanlarda bu rakam 4,000’e düşmektedir (Abrous ve ark. 2005). Bu nörojenik azalmanın sebebi, nörogenezin sürdürülmesini ve kontrolünü sağlayan çeşitli faktörlerin yaşlanan beyinde zamanla değişmesidir (Taylor ve ark. 2013).

Hipokampus bağımlı öğrenme, hipokampal nörogenezin ana düzenleyicilerinden birisidir. Hipokampus bağımlı işlerin öğrenilmesinde erişkin yenidoğan granül hücrelerinin sayısında artış gözlenmiştir fakat hipokampusdan bağımsız görevlerde bu etki görülememiştir. Buna rağmen SGZ’da prekürsör proliferasyonunda öğrenmeden hemen sonra etkiler meydana gelmemiştir. MWM’de uzamsal navigasyon öğreniminin granül hücrelerinin sağkalımını uyardığı tespit edilmiştir. Buna karşın MWM egzersizinin geç fazı ise DG’da artmış apoptoz ve

MWM eğitiminin erken fazında doğan yavru nöronların sayısında azalma ile sonuçlanmıştır. Sonuçta öğrenme, nörogenez üzerindeki etkisini hücre proliferasyonunu değil sağkalımını artırarak göstermektedir. Hipokampus bağımlı öğrenmenin, hipokampal nöronal ağı uyararak nörogenezin hızını etkileyebileceği de belirlenmiştir (Eisch ve ark. 2008; Deng ve ark. 2010).

Mental egzersizin yanında fiziksel egzersiz de hipokampal nörogeneze olumlu yönde etki etmektedir. Zenginleştirilmiş çevrenin farklı elementlerinin ayrılması ile farelerde gönüllü koşmanın hücre proliferasyonunu, nörogenezi ve sinaptik plastisiteyi hatta uzamsal bellek fonksiyonlarını arttırdığı gösterilmiştir. Koşma tekerleri ile yapılan fiziksel egzersizin *5-bromo-2'-deoksiuridin* (BrdU) pozitif hücre sayısını arttırdığı, progenitör proliferasyonu, nöronal sağkalım ve nörotrofin düzeylerini yükselttiği belirtilmiştir. Egzersiz, BDNF *up-regülasyonuna* ve erişkin hipokampal nörogeneze aracılık eden kritik bir faktördür. Fiziksel aktivite, DG'un sinaptik plastisitesini nörogenezi artırarak değiştirmektedir. Kontrollerle kıyaslandığında koşan kemirgenler, DG'da önemli derecede LTP artışı göstermiştir. Nörogenezle üretilen yeni nöronların hipokampal plastisiteye katkıları, egzersiz ile daha da yükseltilmiştir. Fiziksel egzersizin yenidoğanların hipokampal devrelere entegrasyonunu hızlandırdığı da kuvvetle muhtemeldir. Fiziksel aktivitenin DG'da morfolojik değişikliklere yol açtığı rapor edilmiştir. Granül hücre dendritlerinin toplam uzunluğunu, kompleksliğini ve dallanma yoğunluğunu belirgin bir şekilde arttırdığı tespit edilmiştir. Dahası, uzun süreli egzersiz yalnızca DG'da değil aynı zamanda entorhinal korteks ve CA1 piramidal hücrelerinde de morfolojik değişimleri uyarmıştır (Vivar ve ark. 2013).

Yaşlanma ile gözlenen nörogenez azalmasını, egzersizin geri döndürebileceğine ilişkin bulgular elde edilmiştir. Progenitör çoğalmasında yaş bağımlı düşüşün egzersiz ile önemli ölçüde azaltıldığı ve orta yaşlı veya yaşlı farelerin koşma egzersizine başlaması ile yeni nöron sayılarının yükseldiği kaydedilmiştir (Zhao ve ark. 2008; Vivar ve ark. 2013).

Erişkin nörogenezin modülasyonuna çevresel koşullar da katılmaktadır. Genç nöronlar için faydalı olan bir diğer faktör zenginleştirilmiş çevredir. Zenginleştirilmiş çevre faktörü, özellikle nörogenezin regülasyonuna katılan nörotransmitterleri ve trofik faktörleri etkileyerek beynin kimyasını değiştirmektedir. Zenginleştirilmiş bir

çevre ile etkileşimin DG'da yenidoğan hücrelerin sağkalımını uyardığı ancak hücre proliferasyonunu değiştirmede bulunmuştur. Zengin çevrenin, nörogenezi artırarak MWM'de uzaysal bellekte de gelişmeye yol açtığı gözlemlenmiştir. Yapılan çalışmalardan, zenginleştirilmiş çevrenin hipokampal nörogenezi genetik altyapıya bağlı olarak farklı şekilde etkilediği sonucu çıkarılmıştır. Çevre koşullarının zenginleştirilmesi 129/SvJ farelerinde progenitör proliferasyonunu artırırken; C57BL/6 farelerinde nöronal sağkalımı arttırdığı ancak progenitör çoğalmasında değiştirmede rapor edilmiştir. Çevrenin kalıtsal özelliklere göre değişebilir etkilerle sahip olmasının altında yatan mekanizma ise henüz açıklanamamıştır (Abrous ve ark. 2005; Bekinschtein ve ark. 2011).

1.2.6. Hipokampal Nörogenez ve Anksiyete

Anksiyete ve korku, tehlike olarak algılanan doğal veya koşullu uyarılara karşı adaptif duygusal reaksiyonlar olarak tanımlanmaktadır. Nörobiyolojik düzeyde anksiyetenin, HPA aksı tarafından düzenlenen savaş ya da kaç cevabının temel mekanizmasında bir bozulmadan kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Erişkin hipokampal nörogeneze ev sahipliği yapan DG'un strese karşı son derece hassas olduğu bilinmektedir. Kronik stresin HPA aksının aktivitesini değiştirmenin yanı sıra hipokampal nörogenezi baskıladığı da gösterilmiştir (Marques ve ark. 2016). Dahası, nöral progenitörlerin kaderi, içinde bulunulan emosyonel durumdan önemli ölçüde etkilenmektedir (Kheirbek ve ark. 2012). Nörogenezin patolojik anksiyete gelişimi ile ilişkili olabileceği ifade edilmektedir. Erişkin SGZ'da üretilen yeni nöronların korku ve anksiyetenin regülasyonuna katıldığı ileri sürülmüştür (Marques ve ark. 2016).

Yeni anılar ve bu anıların rehberliğinde davranışlar oluşturmak hipokampusun temel fonksiyonel etkilerindedir. Hipokampus, anksiyetenin modülasyonunda oynadığı kilit rolden dolayı 'emosyonel beyin' olarak da adlandırılmaktadır (Kheirbek ve ark. 2012). DG'da üretilen nöronlar, mossy lifleri aracılığıyla hipokampal ağa katılmaktadır ve hipokampusun duygu-durumu ile ilişkin fonksiyonlarına önemli katkılar sağlamaktadır (Petrik ve ark. 2012). Yenidoğan hipokampal nöronların uyardığı artmış nöroplastisiteye, azalmış anksiyetenin eşlik ettiği bulunmuştur. Kemirgenlerde azalmış anksiyete, yükseltilmiş artı labirent esas

olmak üzere aydınlık-karanlık kutu gibi bazı anksiyete testlerinin bulguları olarak kayıtlara geçmiştir (Marques ve ark. 2016; Petrik ve ark. 2012).

Çeşitli anksiyete bozukluklarında hipokampal hacimde değişikliklerin meydana geldiği tespit edilmiştir (Kheirbek ve ark. 2012). Azalmış nörogenezin azalmış hipokampal volüm ile sonuçlanabileceği bilinmektedir (Petrik ve ark. 2012). Genetik manipülasyonlarla veya ışınlama teknikleriyle nörogenezin yok edilmesinin, davranışsal değişikliklerle sonuçlandığı belirtilmiştir. Bozulmuş hipokampal nörogenezin anksiyete benzeri davranışlarda artışa neden olduğu rapor edilmiştir. Anksiyete oluşturulmuş hayvan modellerinin DG’unda daha az sayıda immatür nöron bulunmuştur (Marques ve ark. 2016).

Nörogenezin hem bazal koşullarda hem de antidepresanlarla etkileşimde stres cevabını modüle ettiği gösterilmiştir. Anksiyete ve depresyon gibi rahatsızlıkların tedavisinde hipokampal nörogenezi hedeflemenin fayda sağlayabileceği öngörülmüştür. Hipokampal nörogenez çeşitli kategoride antidepresanlar ve bazı anksiyolitikler tarafından arttırılmaktadır (Kheirbek ve ark. 2012). Kronik antidepresan tedavisi sonucunda, SGZ’da proliferasyonda ve nörogenezde belirgin şekilde artış olduğuna ilişkin bulgular elde edilmiştir (Petrik ve ark. 2012). Antidepresan ilaçların antidepresan etkilerini gösterebilmeleri için *intakt* yani bozulmamış bir hipokampal nörogeneze ihtiyaç duyduğu belirlenmiştir (Kheirbek ve ark. 2012). Anksiyete bozukluklarında çevresel veya farmakolojik efektif bir tedavi için erişkin hipokampal nörogenezin gerekli olduğu görülmüştür. Buna karşın, antidepresanların erişkin nörogenezden bağımsız bir şekilde modun yükseltilmesini sağlayabileceğini rapor eden çalışmalar da mevcuttur (Petrik ve ark. 2012).

1.3. Erişkin Dentat Girusta Nörogenezin Regülasyonuna Katılan Gizemli Bir Faktör: Hipokampal Astrositler

1.3.1. Nöronal Farklaşma Sürecinde Astrosit Kontrolü

Nöral devrelerde astrositlerin fonksiyonu uzun süredir gizemini korumaktadır. Pasif destek hücreleri olarak anılan astrositlerin, sinaps oluşumunun ve fonksiyonlarının kontrolünde kritik bir rol oynadığı son dönemlerde gösterilmiştir. Sıçanlarda tek bir astrositin 100,000 sinapsla bağlantılı olduğu ve nöronlarla çok yönlü bir etkileşim içinde bulunduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte, astrositler de

nöronlar gibi iyon kanalları, reseptörler ve hücre yüzey molekülleri eksprese etmektedir. Böylece astrositler de nörotransmitterlere ve çevresel değişimlere cevap verebilmektedir. Bu özellikler, astrositlere nöronlarla dinamik bir iletişime geçerek nöral devrelerin gelişiminin koordinasyonunu sağlamada kilit bir misyon yüklemektedir (Seri ve ark. 2001; Abrous ve ark. 2005; Clarke ve Barres 2013).

Beyinde doğru sayıda ve tipte sinaps kurulması nöral devrelerin oluşumu ve bilgilerin işlenmesi için vazgeçilemez bir faktördür. Astrositlerin sinaps oluşumunu, olgunlaşmasını ve eliminasyonunu güçlü bir şekilde düzenlediği belirlenmiştir. Son dönemlerde sıçanlarda yapılan araştırmalarla astrositlerin sinaps oluşumunu hem temas aracılı ve hem de salgıladıkları sinyallerle kontrol edebileceğine işaret edilmiştir. Astrositlerin, sinaps gelişimini thrombospondin, SPARCL1 ve apolipoprotein E gibi sinaptogenetik sinyalleri salgılayarak kontrol ettiği öne sürülmüştür. *In vitro* çalışmalar, sıçan ve insan hipokampal nöronlarında da astrositlerin sinaps oluşumunu uyarabileceğini göstermiştir. Kemirgen astrositlerinin sinaps gelişiminin her aşamasının kontrolüne katıldığı ileri sürülmüştür. İnsan astrositleri ile ilgili de benzer bulgular elde edilmiştir. Bununla birlikte, insanlarda astrositlerin kemirgen astrositlerinden daha çok sayıda sinaps oluşturabilme yeteneğine sahip olduğu da kaydedilmiştir (Clarke ve Barres 2013; Kempermann 2015).

Astrositlerin eksitatör sinapsların yanısıra inhibitör sinaps yapımını da uyardığı bulunmuştur. Gelişmekte olan hipokampal nöron kültüründe içinde astrosit yer alan medyum, tip A GABA (GABA A) reseptörlerinin yoğunluğunu önemli derecede arttırmıştır. Bu bulgularla uyumlu olarak, astrositlerin hipokampal kültürlerde GABAerjik aksonların dallanmasını ve uzunluğunu ve inhibitör sinapsların sayısını arttırdığı rapor edilmiştir. Presinaptik ve postsinaptik farklılaşmayı düzenleyen moleküller salgılayabilen astrositler, GABA A reseptörlerinin de ekspresyonunu modüle etmektedir. Astrositlerin eksitatör veya inhibitör sinapsların her biri için ayrı moleküller salgılayarak, sinaps oluşumlarını birbirinden bağımsız bir şekilde uyardığı düşünülmektedir. Astrositler tarafından salgılanan proteinlerin moleküler kimlikleriyle ilgili bilgiler ise oldukça yetersizdir (Clarke ve Barres 2013).

1.3.2. Hipokampal Astrositlerin Erişkin Nörogenezin Regülasyonunda Tanımlanan Roller

Lokal astrositik popülasyonun SGZ yatağının nörojenik bir bölge olmasında önemli bir rol alabileceği ileri sürülmüştür (Kempermann 2015). Hipokampus kaynaklı astrositlerin kök veya progenitör hücrelerden nöronal farklılaşmayı uyardığı fakat omurilik kaynaklı astrositlerin bunu başaramadığı *in vitro* uygulamada gösterilmiştir (Song ve ark. 2002). *In vivo* koşullarda da çoğalan hücrelerin astrositlere çok yakın bir konumda yerleştikleri tespit edilmiştir (Ehninger ve Kempermann 2008).

Ekstrasellüler mikroortamın homeostazında önemli rolü olduğu bilinen astrositlerin nörosteroidler, sitokinler, çeşitli iyonlar, büyüme faktörleri ve glutamat metabolitleri gibi lokal sinyaller salgılayarak hipokampal nörogenezi düzenlediği belirtilmiştir (Abrous ve ark. 2005). Hipokampal astrositlerin, yenidoğan nöron entegrasyonunu da uyardığı gösterilmiştir. Wnt sinyalleşme yolağının blokajı, astrositlerin nörojenik aktivitesini ve SGZ'da nörogenezi baskılamıştır. Elde edilen bu bulgular, astrositlerin Wnt sinyalleşmesi yoluyla etki edebileceği hipotezine yol açmıştır (Zhao ve ark. 2008).

1.3.3. RFRP-3'ün Nörogenez Üzerinde Astrosit Aracılı Olası Etkisi

RFRP3'ün sıçan hipokampusunda astrositler tarafından lokal olarak sentezlenebileceği gösterilmiştir. RFRP-3-ir hücre gövdelerinin hipokampusda dağılımı incelendiğinde özellikle dentat girusun hilusu boyunca yoğun olduğu tespit edilmiştir. Hipokampal nörogenezin gerçekleştiği beyin bölgesi olan DG'da gösterilen yoğun RFRP-3 hücre popülasyonu oldukça ilgi çekici bir bulgu olarak kayıtlara geçmiştir (Ferris ve ark. 2015).

Erişkin hipokampusda astrositlerin nörojenik potansiyeli (Ehninger ve Kempermann 2008; Zhao ve ark. 2008) ve hipokampal nörogenezin astrositik kontrolü (Abrous ve ark. 2005) göz önünde bulundurulduğunda, astrositlerde ekspresyonu keşfedilen RFRP-3'ün erişkin hipokampal nörogenezde olası rolü merak uyandırmaktadır.

1.4. Amaç

RFRP-3'ün üreme davranışının düzenlenmesinde rol oynadığını gösteren birçok çalışma olmasına karşın, hipokampal davranış süreçleri üzerindeki etkisini inceleyen çalışmalar oldukça yetersizdir. Farelere merkezi RFRP-3 infüzyonunun anksiyojenik etkilerinin olabileceğini bildiren çok az çalışma (Kim ve ark. 2015) olmasına rağmen; sıçanlarda icv RFRP-3 uygulamasının anksiyojenik etkilerini yükseltmiş artı labirent ve aydınlık-karanlık kutu davranış testleri performansına bağlı olarak araştıran bir çalışmaya literatürde rastlanılmamıştır. Sıçanlarda RFRP-3'ün merkezi infüzyonunun, hipokampal nörojeneze etkisini araştıran bir araştırma bulgusu da bulunmamaktadır.

Bu çalışmanın amacı, RFRP-3 ve GPR147 sinyalleşmesinin erişkin sıçan hipokampusunda nörojenez üzerindeki etkisini ve hipokampal bağımlı davranışlardaki olası rolünü araştırmaktır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmanın *in vivo* deneysel aşamaları Necmettin Erbakan Üniversitesi KONÜDAM Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde, moleküler analizleri Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir. Çalışma Necmettin Erbakan Üniversitesi KONÜDAM Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezi Hayvan Deneyleeri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır ve çalışmadaki bütün uygulamalar etik kurul protokolüne uygun şekilde gerçekleştirilmiştir.

2.1. Deney Hayvanları

Çalışmada ortalama ağırlıkları 300-350 gram olan Wistar Albino cinsi toplam 28 adet erkek sıçan kullanılmıştır. Uygulamalara başlamadan önce tüm sıçanların vücut ağırlıkları belirlenmiştir. Gruplar, vücut ağırlık ortalamaları birbirlerine en yakın olacak şekilde 4 gruba ayrılmıştır. Kontrol grubu, RFRP-3 uygulanan grup, RF9 uygulanan grup ve RFRP-3 ile RF9'un birlikte verildiği gruptur (Tablo 2).

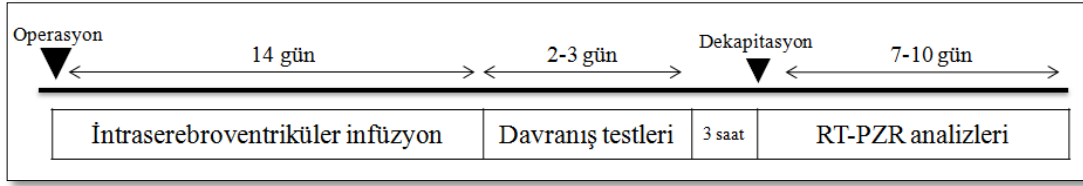
Tablo 2.1. Deney grupları.

Gruplar (n=7)	İcv Uygulanan Madde	Uygulama Dozu
Kontrol grubu	Yapay BOS	
RFRP-3 grubu	RFRP-3	1 nmol/gün/sıçan
RF9 grubu	RF9	10 nmol/gün/sıçan
RFRP-3 + RF9 grubu	RFRP-3 ve RF9	

Deney hayvanları 21±1°C sıcaklıkta ve 12 saat aydınlık-karanlık ortamda tutulmuştur. Sıçanlara *ad libitum* olarak standart pelet yem ve musluk suyu verilmiştir.

2.2. Deneysel Dizayn

Çalışma, başlıca 3 temel deneysel süreçten oluşmaktadır. Çalışmanın ilk basamağı, fare, sıçan ve diğer laboratuvar hayvanlarında yapılan araştırmalar için dizayn edilmiş implante edilebilir ozmotik pompalar yoluyla santral madde infüzyonudur. İkinci etapta deney hayvanlarına anksiyete ile ilişkili davranış testleri yapılmıştır. Son olarak da, erişkin beyinde nörogenez belirteçlerine yönelik gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu analizi gerçekleştirilmiştir.



Şekil 2.1. Deney protokolünün şematik gösterimi.

2.3. İntraserebroventriküler Uygulamalar

2.3.1. Ozmotik Pompa Sistemleri

Ozmotik pompa sistemleri, kontrollü ilaç salınımı sistemlerindedir. Doz kontrollü kronik *in vivo* uygulamalar için uygun ve güvenilir bir metottur. Ozmotik pompalar, deri altı ya da periton içi implante edilerek sistemik uygulamalar için kullanılacakları gibi bir kateter aracılığıyla herhangi bir hedef organa infüzyon amacıyla da kullanılabilir.

Ozmotik pompalar, pompanın tipine göre saatte 0.25-10 mikrolitre (μ l) arasında değişebilen kontrollü hızlarda 1 günden 4 haftaya kadar sürekli infüzyon sağlayabilmektedir (<http://alzet.com>).

2.3.2. Ozmotik Pompaların Çalışma Prensibi

Ozmotik minipompa yapısal olarak iç içe geçmiş üç adet silindirden oluşmaktadır. En dış tabaka, yarı geçirgen bir membrandır. Membranın altında aşırı doygun bir tuz çözeltisi içeren ozmotik tabaka yer almaktadır. Ozmotik tabaka, en içte yer alan geçirgen olmayan rezervuarı çevrelemektedir (Şekil 2.2).

Minipompalar, ozmotik yer değiştirme esasına göre çalışmaktadır. Bu sistem esas olarak çözücünün yani dokular arası sıvının harekete geçirdiği bir sistemdir. Deney hayvanına verilecek test maddesi, rezervuara doldurulur. Pompa implante edildiğinde, ozmotik tabakadaki tuz çözeltisi ile dokulararası sıvı arasındaki ozmotik fark nedeniyle pompaya sıvı girişi başlar. Yarı geçirgen membrandan geçip pompaya dolan dokular arası sıvı, tuz tabakasının genişlemesine neden olur. Ozmotik tabakanın, çevrelediği esnek rezervuara baskı yapmaya başlaması sonucunda farmakolojik ajan akış moderatörü yoluyla pompa dışına itilir. En dış membran sert bir yapıda olduğu ve genişlemediği için dokulararası sıvının pompaya giriş hızı ile

pompaya doldurulmuş olan test maddesinin dışarıya pompalanma hızları aynıdır (Theeuwes 1980; Akyazı 2005).



Şekil 2.2. Ozmotik pompanın fonksiyonel yapısı.

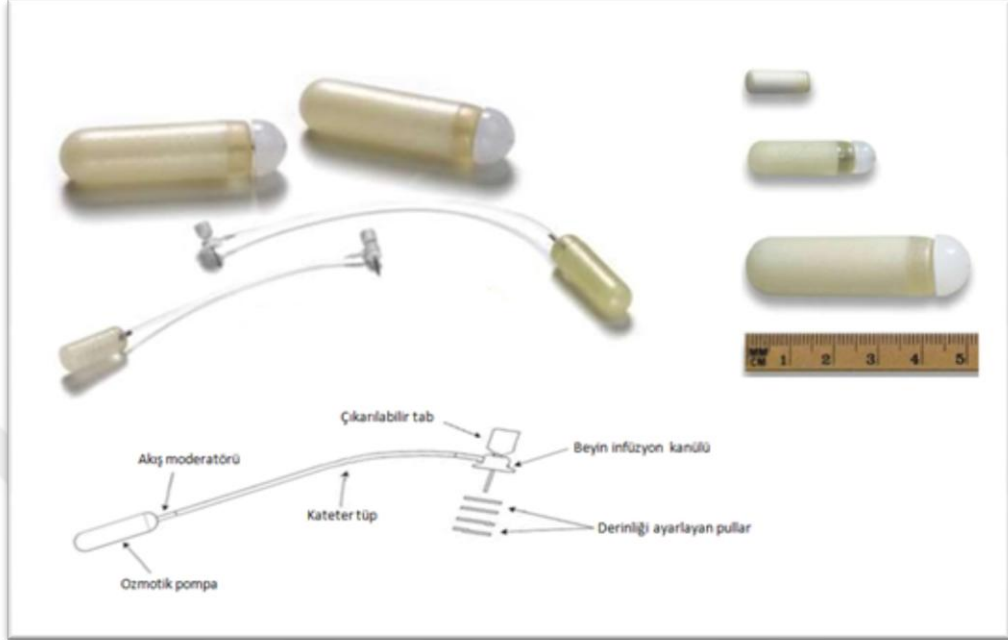
2.3.3. Ozmotik Pompaların Hazırlanması

Deneylerde 14 gün süreyle 0,5 µl/saat icv infüzyon yapma özelliğine sahip mini osmotik pompalar (Alzet 2002) kullanılmıştır. RFRP-3 grubu sıçanların osmotik minipompa deposu, 14 gün süreyle 1 nmol/sıçan/gün RFRP-3 infüzyonu sağlayacak dozda RFRP-3 ile doldurulmuştur. RF9 grubundaki sıçanlara implante edilecek osmotik pompaların deposuna ise 14 gün boyunca 10 nmol/sıçan/gün dozunda infüzyon sağlayacak şekilde RF9 yerleştirilmiştir. İki ajanın birlikte uygulanacağı sıçanlara aynı yöntem ve sürede RFRP-3 + RF9, kontrol grubuna ise yapay BOS uygulanacak şekilde osmotik pompalar hazırlanmıştır.

2.3.4. Beyin İnfüzyon Kitinin Hazırlanması

Mevcut çalışmada sıçan beynine enjeksiyon yapacak şekilde dizayn edilen alzet beyin infüzyon kitleri kullanılmıştır. Alzet beyin infüzyon kiti, osmotik pompa ile beyin infüzyon kanülünü birleştiren kateter tüp, stereotaksik cihazda beyin hedef bölgesine indirilecek bir mini kanül, kanülün stereotaksik cihazın özel tutma aparatına yerleştirilmesini sağlayan çıkarılabilir bir tab ve kanülün gireceği derinliği ayarlamayı sağlayan pulları içermektedir (Şekil 2.3).

Beyin infüzyon kanülleri ve kateterleri infüze edilecek madellerle hava kabarcığı kalmayacak şekilde doldurulmuştur. İçerisi sıvı ile doldurulmuş olan kit ve kanül, kanülün serbest ucundan ozmotik pompaya bağlanmıştır.



Şekil 2.3. Ozmotik pompa seti ve beyin infüzyon kiti (alzet.com'dan değiştirilerek alınmıştır).

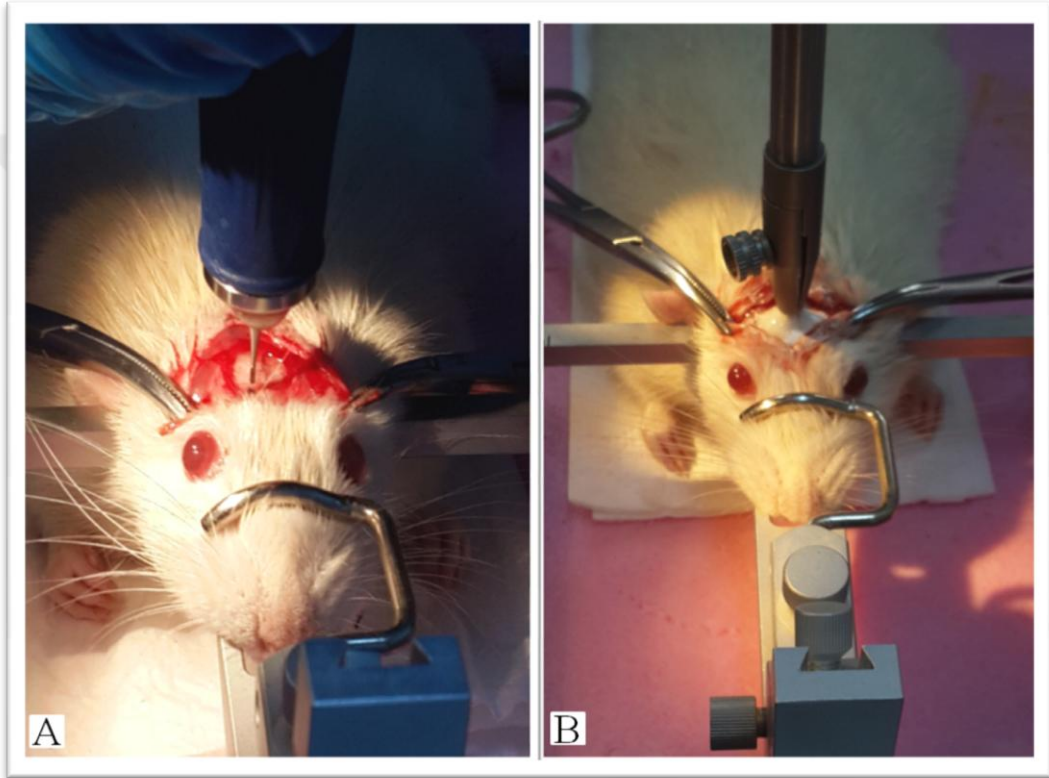
2.3.5. Stereotaksik Koordinatların Belirlenmesi

RFRP-3 infüzyonu için sıçanların sağ lateral ventrikülleri hedeflenmiştir. Lateral ventrikülün stereotaksik koordinatları Paxinos & Watson sıçan beyin atlasına göre belirlenmiştir (Paxinos ve Watson 1998). Bregmadan 1.7 mm sağ lateral, 0.72 mm anterior ve 3.6 mm vertikal koordinatlar kullanılarak sağ lateral ventriküle giriş noktası tespit edilmiştir (Şekil 2.4).

2.3.6. Ozmotik Pompa ve Beyin İnfüzyon Kitinin İmplantasyonu

Hayvanlara intramüsküler olarak 450 mg/kg kloral hidrat anestezisi uygulanmıştır. Sıçanların kafa derileri, tıraş ve dezenfekte edilerek operasyon için hazırlanmıştır. Anesteziye giren sıçanlar, stereotaksik cihaza kulaklarından ve ağız kısmından kafasının yüzeyi yere tam paralel olacak şekilde sabitlenmiştir. Kafatası derisi bistüri ile kesilerek kemik yapıya ulaşılmıştır. Bregma noktasının net bir şekilde görülebilmesi için periost bistüri ile sıyrılıp kafatası yüzeyi temizlenmiştir ve referans alınan bregma noktası tespit edilmiştir. Stereotaksik cihazdan okunan bregma koordinatları ile önceden belirlenen koordinatlar (1.7 mm sağ lateral ve 0.72

Beyin infüzyon kanülü, plastik tutma bölgesinden stereotaksik cihaza özel olarak monte edilen kanül tutacağına yerleştirilmiştir. Minipompa kanülü, tur cihazı ile açılan delikten 3.6 mm derinlik boyunca lateral ventriküle indirilmiştir. Beyin infüzyon kiti, harcının ve serumunun karıştırılmasıyla elde edilen dental sement yardımıyla kafatasına sabitlenmiştir. Beyin infüzyon kitine bağlanılan ozmotik pompalar ense derisinin altına yerleştirilmiştir. İnsizyon bölgesi 4.0 ipek iplik ile dikilmiştir ve cerrahi bölgeye % 10 povidon iyodin ile pansuman yapılmıştır. Operasyon sonrası sıçanlar aynı kafeslerine geri konulmuştur.



Şekil 2.6. İşaretlenen noktanın tur cihazı ile delinmesi (A) ve beyin infüzyon kitinin dental sementle kafatasına sabitlenmesi (B).

2.4. Davranış Testleri

Operasyonu takiben 14. günde açık alan testiyle davranış deneylerine başlanmıştır. Sıçanlara 14. günde açık alan testi ve hemen ardından yükseltilmiş artı labirent testi (EPM) uygulanmıştır. 15. günde aydınlık-karanlık kutu testi (LDB) gerçekleştirilmiştir (Kim ve ark. 2016). Tüm testler için uygulama saati 9.00-13.00 olarak belirlenmiştir (Kim ve ark. 2015). Her deneyden sonra test platformları % 20 alkol ve ardından su ile temizlenmiştir.

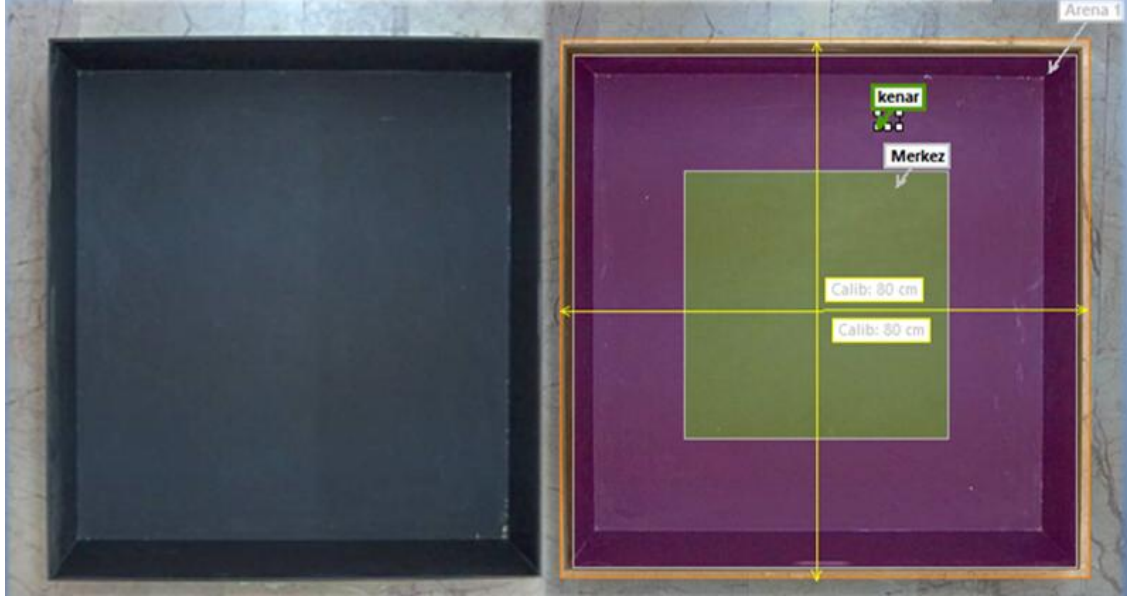
Sıçanlar test prosedürleri uygulanmaya başlayana kadar davranış testlerini uygulayacak araştırmacının çıplak el temasına (*handling*) alıştırmıştır. Böylece sıçanlarda test esnasında temastan doğacak huzursuzluğun en aza indirgenmesine olanak sağlanmıştır.

Anksiyete ile ilişkili davranış testlerinde her bir hayvanın performansı Ethovision XT 11 yazılım programı aracılığıyla kaydedilerek anksiyete parametreleri yönünden değerlendirilmiştir. Davranış testlerine ait bütün parametreler yazılım programından elde edilmiştir.

2.4.1. Açık Alan Testi

Deney hayvanlarının herhangi bir işlem öncesi duygusal durumunu, işlem sonrasında meydana gelebilecek değişiklikleri, anksiyeteye bağlı gelişen duygularını ve lokomotor aktivitelerini saptamak için çok yaygın kullanılan bir testtir. Test süresince hayvanın horizontal düzlemdeki hareketleri (bir bölgeden diğerine geçiş), vertikal düzlemdeki hareketleri (arka ekstremiteleri üzerinde yükselme), süslenme davranışı ve defekasyon sayısı değerlendirilmektedir (Küçük ve Gölgele 2005).

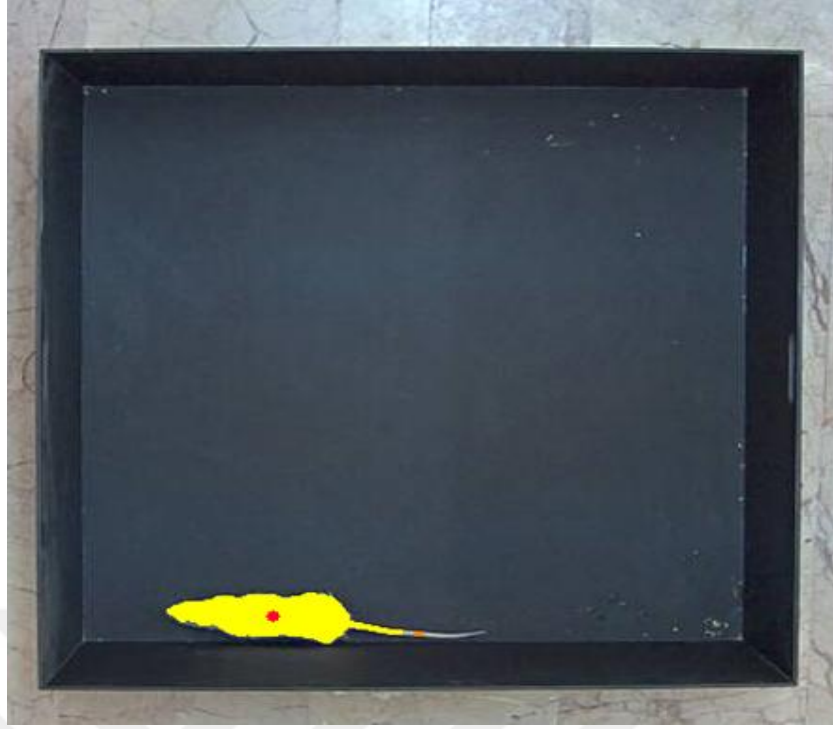
Çalışmada, siyah pleksiglastan yapılmış, etrafı duvarlarla çevrili, üstü açık, 80×80×30 cm ölçülerinde kare kutu şeklinde ve bilgisayara bağlı açık alan düzeneği kullanılmıştır (Şekil 2.7). Platform yüzeyi, yazılım üzerinde merkez ve kenar şeklinde iki bölgeye bölünmüştür. Merkez bölgesi, açık alan aparatının orta bölgesine çizilen kare şeklinde bir zondur. Merkez bölgesinin sınırları, arenanın ölçülerinin yarısı kadar (Kim ve ark. 2016) yani 40cm×40cm olacak şekilde ayarlanmıştır (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. Açık alan testinde bölgelerin belirlenmesi.

Sıçanlar, açık alan aparatına hep aynı köşeden kenar bölgesine bırakılmıştır ve test başlatılmıştır. 5 dk süresince sıçanların toplam kat ettikleri mesafe (cm), ortalama hızları (cm/sn), merkez ve kenar bölgelerinde geçirdikleri süre (sn), bölgeler arası geçiş sayıları ve hareketlilik durumları Ethovision XT 11 yazılım programı kullanılarak kaydedilmiştir. Ethovision yazılımı, sıçanların hareketlilik durumunu üç farklı değişken şeklinde değerlendirmektedir: Sıçanların % 60'dan daha fazla hareketli olduğu saniyeler “*highly mobile*” başlığı altında gösterilmiştir. Hareketsizlik eşiği ise % 10'un altı değerler şeklinde belirlenmiştir. Bu kriterlerin yanısıra her bir hayvanın merkez noktası (*center point*)'nin mobilitesi, immobilitesi ve hareketlilik yüzdesi de analiz proflifinde yer alan parametreler arasındadır. Sıçanların bölgelere geçiş sayıları ve süreleri, program tarafından merkez noktasının bölgenin sınırlarını geçmesi kriterine göre belirlenmiştir. Tüm deney gruplarında standart protokole uyulmuştur (Şekil 2.8).

Deney bitiminde her bir hayvanın defekasyon sayısı not edilmiştir. Sıçanların “*rearing*” ve “*grooming*” davranışı, Ethovision düzeneğinin kaydettiği videolar itina ile izlenerek, frekans ve süre (sn) şeklinde manuel olarak skorlanmıştır.



Şekil 2.8. Açık alan testi parametrelerinin Ethovision programı ile kaydedilmesi.

2.4.2. Yükseltilmiş Artı Labirent Testi

Yükseltilmiş artı labirent testi (EPM), deney hayvanlarında anksiyete oluşturmak ve anksiyete üzerinde çeşili ilaçların önleyici ya da tedavi edici etkisini araştırmak için geliştirilen testlerden biridir. Artı labirent, iki kolu açık, zıt iki kolu kapalı ve bunları birleştiren bir merkezi bölgenin olduğu, yerden 50 cm kadar yükseltilmiş bir düzeneden oluşmaktadır (Campos ve ark. 2013).

Deneyleerde, pleksiglastan yapılmış karşılıklı iki açık (50x10 cm) ve iki kapalı (50x10x40 cm) kolu bulunan, yerden 50 cm yükseklikte, ortasında 10x10 cm boyutlarında merkezi bir platformun bulunduğu artı şeklinde labirent kullanılmıştır (Şekil 2.9).

Testte hayvanlar yüzleri açık kola bakacak şekilde kolların birleştiği merkezi platforma bırakılmıştır. 5 dk süreyle sıçanların açık ve kapalı kollara giriş sayıları, açık ve kapalı kollarda ve merkez bölgesinde geçirdiği süre (sn) yazılım programı aracılığıyla kaydedilmiştir. EPM'nin değerlendirilmesinde temel parametrelerden birisi olan “açık kollardaki zaman yüzdesi” kullanılmıştır. Açık kollardaki zaman yüzdesi, açık kollarda geçirilen sürenin toplam süreden merkezde geçirilen sürenin

ıkarılmasıyla elde edilen değere oranının 100 ile çarpılmasıyla elde edilmiştir (Mineur ve ark. 2013). Bu verilerden, açık kollardaki zaman yüzdesi değerleri hesaplanmıştır. Açık kollardaki zaman yzdesi= $[100 \times (\text{Açık kolda geçirilen süre} / (\text{Toplam süre-merkezde geçirilen süre})]$

Hayvanın başını açık kollarin kenarlarından aşağı zemine doğru sarkıtarak yaptığı “*head dipping*” davranışının sayısı, Ethovision düzeneği aracılığıyla kaydedilen videolar seyredilerek skorlanmıştır.



Şekil 2.9. Yükseltilmiş artı labirent düzeneği.

2.4.3. Aydınlık-Karanlık Kutu Testi

Anksiyetenin değerlendirilmesinde kullanılan yöntemlerinden biri de aydınlık-karanlık kutu testidir. Karanlık ve aydınlık iki bölümden oluşan deney platformu, hayvanların aydınlatılmış bir alandan kaçma isteği temel alınarak düzenlenmiştir.

LDB testi, ölçüleri 60×30×30 cm pleksiglastan yapılmış, eşit iki kare blmeden oluşan platformda geçekleştirilmiştir (Şekil 2.10). LDB protokolü de diğer testler gibi Ethovision XT 11 yazılım programı kullanılarak ayarlanmıştır ve kaydedilmiştir. Sıçanlar karanlık kutuya yerleştirilmiştir ve test başlatılmıştır. Test

süresi 10 dk olarak belirlenmiştir (Sarro ve ark. 2014). LDB parametreleri olarak, aydınlık ve karanlık bölmelerde kalma süreleri (sn), aydınlık↔karanlık kutulara geçiş sayıları ve hayvanın karanlık alandan aydınlık kutuya ilk geçtiği zaman (sn) saptanmıştır.



Şekil 2.10. Aydınlik-karanlik kutu test düzeneği.

2.5. Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu

2.5.1. Beyin Dokularının Elde Edilmesi

Son davranış testini takiben sıçanlar en az 3 saat kafeslerinde bırakılmıştır (Kim ve ark. 2016). Sıçanlar son ağırlıkları kaydedildikten sonra dekapite edilmiştir. Beyinleri disekte edilerek hipokampus dokuları çıkarılmıştır. Doku örnekleri kriyo tüplere alınıp hızlıca sıvı azot tankına aktarılmıştır. Analiz edilinceye kadar beyin dokuları -80 °C derin dondurucuda saklanmıştır.

2.5.2. Hipokampus Doku Örneklerinden Total RNA İzolasyonu

Hipokampus dokularından total RNA izolasyonu TRIzol yöntemiyle gerçekleştirilmiştir.

1. Ağırlıkları yaklaşık 50 mg olan hipokampus doku örneklerinin homojenizasyon işlemi 1000 µl TRIzol içinde gerçekleştirilmiştir.
2. Homojenatlar oda sıcaklığında 5 dk inkübasyona bırakılmıştır.
3. Daha sonra üzerlerine 200 µl kloroform eklenmiştir ve 15 sn vorteksenerek oda sıcaklığında 15 dk inkübe edilmiştir.

4. İnkübasyon sonrası örnekler 12000 g'de 15 dk +4 °C'de santrifüj edilmiştir.
5. Santrifüj işleminin sonunda RNA'yı içeren üstteki aköz faz yeni ependorf tüplerine aktarılmıştır ve üzerlerine 500 µl izopropanol ilave edilmiştir.
6. Ependorflar birkaç kez alt üst edilip 10 dk oda ısısında bekletildikten sonra 12000 g'de 10 dk +4 °C'de santrifüj edilerek oluşan RNA peletinin dibeye çökmesi sağlanmıştır.
7. Süpernatant kısmı atılıp peletin üzerine 1 ml % 75 etanol eklendikten sonra ependorflar alt üst edilmiştir.
8. 7500 g'de 5 dk +4 °C'de santrifüj yapılmıştır ve süpernatant kısım uzaklaştırılmıştır.
9. Pelet 5-10 dk oda sıcaklığında kurutulmuştur. Ardından 50 µl nükleaz free su ile çözülmüştür.
10. Elde edilen RNA örnekleri kullanılıncaya kadar -80 °C'de saklanmıştır.

2.5.2.1. Total RNA Örneklerinin Kalite Kontrolü

Total RNA örneklerinin konsantrasyonu ve kalitesinin tayini spektrofotometrik ve agaroz jel elektroforez ile kontrol edilmiştir. Fenol, protein ve genomik DNA (gDNA) kontaminasyonlarını belirlemek amacıyla nanodrop cihazına 1 µl RNA örneğinden konulup, A260/A280 ve A260/230 oranları değerlendirilmiştir. Total RNA örnekleri aynı zamanda % 1 agaroz jel elektroforez işlemine tabi tutulup integritesi kontrol edilmiştir.

Spektrofotometrik sonuçlar doğrultusunda, olası gDNA kontaminasyonunun giderilmesi amacıyla DNase-I (BioLabs) enzim reaksiyonu üretici firmanın talimatlarına göre uygulanmıştır. Bu protokole göre 10 µg total RNA, DNase-I reaksiyon karışımı ile 100 µl total hacime tamamlanmıştır. RNA örnekleri, üzerine 2 U DNase-I enzimi konularak 37 °C'de 10 dk bekletilmiştir. Reaksiyon durdurulması amacıyla 1 µl 0,5 M EDTA ilave edilerek 75 °C 10 dakika inkübe edilmiştir.

2.5.3. cDNA Eldesi

İzole edilen total RNA örneklerinden cDNA sentezi, iScript cDNA Synthesis Kit (BIO-RAD) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Her örnek için aşağıdaki tabloda (Tablo 2.2) gösterilen şekilde reaksiyon karışımı hazırlanmıştır.

Elde edilen reaksiyon karışımından, 25 °C’de 5 dk, 42 °C’de 30 dk ve 85 °C’de 5 dk olacak şekilde cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. cDNA örnekleri daha sonra kullanılmak üzere - 20 °C’de saklanmıştır.

Tablo 2.2. cDNA sentezi için kullanılan karışım içeriği.

Karışım	Miktar (µl)
5X iScript reaksiyon miksi	4 µl
Revers transkriptaz	1 µl
Nükleaz free su	Değişken
RNA	1 µg
Toplam	20 µl

2.5.4. Primer Dizaynı

Çalışmada kullanılan hedef Nestin, DCX, CALB1, NeuN ve BDNF genlerinin yanısıra referans gen olarak belirlenen GAPDH ve ACTB genlerinin primer dizaynı IDT PrimerQuest (<http://eu.idtdna.com/home/home.aspx>) programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çalışmada kullanılan gen bölgelerine ait primer dizi bilgileri Tablo 2.3’de belirtilmiştir.

Tablo 2.3. Çalışmada kullanılan gen bölgelerinin primer dizileri.

Gen (Erişim No)	Forward Primer	Reverse Primer	Uzunluk
GAPDH (NC_005103.4)	5’-TGAACGGGAAGCTCACTGG-3’	5’-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3’	308
ACTB (NC_005111.4)	5’-TGGCTGGGGTGTGAAGGTCT-3’	5’-AGCACGGCATCGTCACCAACT-3’	182
Nestin (NC_005101.4)	5’-CACACCTCAAGATGTCCCTTAG-3’	5’-AGGTACTGGTCCTCTGGTATC-3’	166
DCX (NC_005120.4)	5’-AGGTACGTTTCTACCGCAATG-3’	5’-CTGAGGCAGGTTGATGTTGT-3’	137
CALB1 (NC_005104)	5’-GACGCTGATGGAAGTGGTGA-3’	5’-CCATCATCTCTCTGCCCATATT-3	143
NeuN (NC_005109)	5’-GGCAAATGTTCCGGCAATTC-3’	5’-GATCGTCCCATTGAGCTTCTC-3’	140
BDNF (NC_005102)	5’-CTGAGCGTGTGTGACAGTATTA-3’	5’-GGGATTACACTGGTCTCGTAG-3’	153

2.5.5. Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qPZR)

Hedef ve referans genlerin ekspresyon kantitasyon analizi, gerçek zamanlı PZR cihazı (Bio-Rad CFX Connect Gerçek Zamanlı PZR Sistemi) kullanılarak yapılmıştır. Reaksiyon için çift iplikli DNA'ya bağlanan bir boya olan SyberGreen kullanılmıştır. Kısaca, 2X SyberGreen (ABM) master mskten 10 µl, forward primerden 5 pmol, reverse primerden 5 pmol, 2 µl cDNA ve toplam hacim 20 µl olacak şekilde ddH₂O ile tamamlanarak polimeraz zincir reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Reaksiyonun ısı profili, +95 °C 10 dk, 40 döngü (95 °C 30 sn, 60 °C 30 sn, 72 °C 30 sn) olacak şekilde ayarlanmıştır. Ayrıca 95 °C 1 dakika ısıtılıp, 55 °C'ye düşürülen ısı 95 °C'ye kadar tekrar kademeli olarak arttırılarak *melting curve* (erime eğrisi) analizi gerçekleştirilmiştir. Gerçek zamanlı PZR cihazından elde edilen Ct (eşik döngüsü) değerleri kayıt edilmiştir. Gerçek zamanlı PZR'den elde edilen ürünlerin doğru ürün olduğunu teyit etmek amacıyla ürünler % 2'lik agaroz jelde 120 volta 30 dk yürütülmüştür.

2.6. İstatistiksel Analizler

Gen ekspresyon verilerinin analizi $2^{-\Delta\Delta CT}$ metodu kullanılarak "RT² Profiler™ Pcr Array Data Analysis" olarak isimlendirilen web tabanlı program ile (<http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php>) Volcano Plot analizi yapılmıştır. Gruplar arası karşılaştırma "RT² Profiler™ PCR Array Data Analysis" programında bulunan "Student t-testi" analizi ile istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

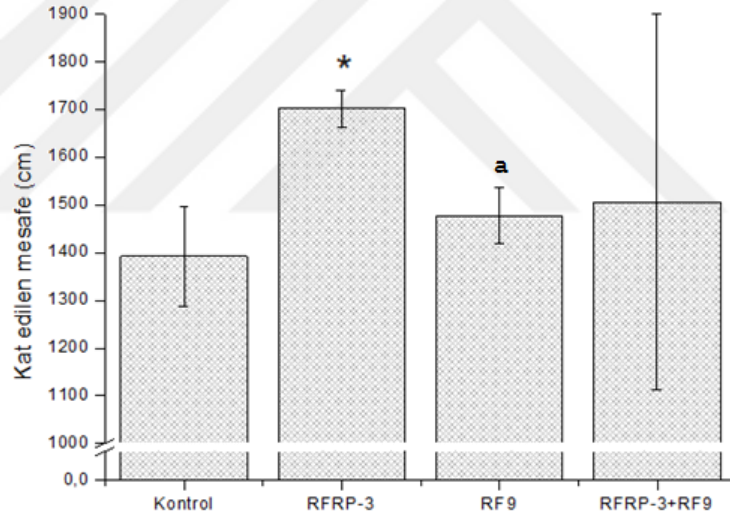
3. BULGULAR

3.1. Açık Alan Testi Bulguları

Bu testte, kat edilen mesafe, hız, merkezde ve kenarda geçirilen süre, kenardan merkeze ve merkezden kenara geçiş sayıları, “rearing” ve “grooming” davranışının frekans ve süre değişim parametreleri istatistiksel olarak incelenmiştir.

3.1.1. Kat Edilen Mesafe

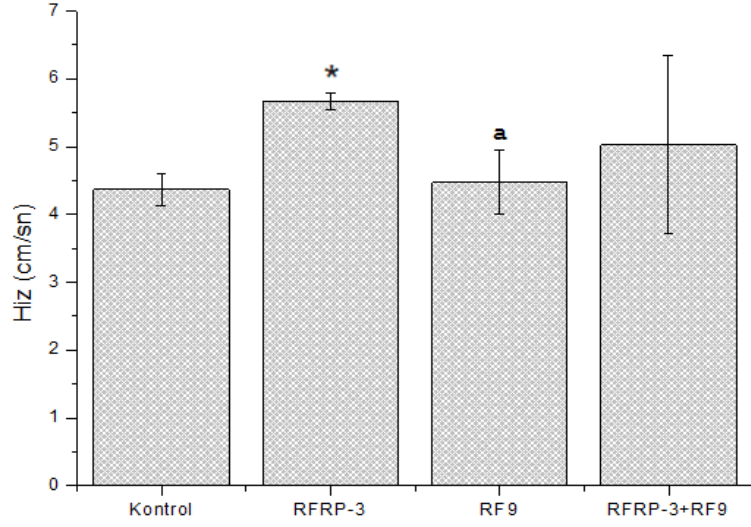
RFRP-3 uygulamasının açık alan testinde kat edilen mesafeyi anlamlı ölçüde arttırdığı tespit edilmiştir ($p<0.05$). RFRP-3 grubuyla karşılaştırıldığında RF9 grubunda kat edilen mesafe azalmıştır ($p<0.05$). RFRP-3 ve RF9’un birlikte uygulandığı grupta ise kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir artış görülmüştür (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Kat edilen mesafenin deney grupları arasındaki değişimi. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında * $p<0.05$; RFRP-3 grubuyla karşılaştırıldığında ^a $p<0.05$

3.1.2. Hız

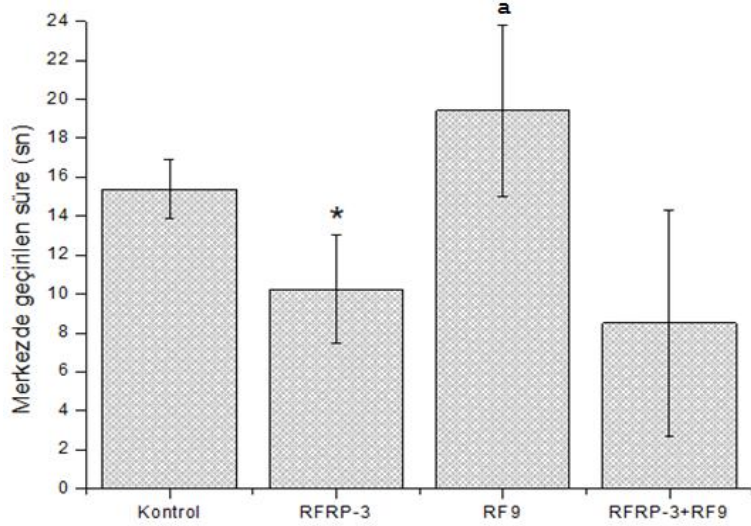
RFRP-3 grubunda diğer gruplara kıyasla hızın anlamlı şekilde arttığı gözlemlenmiştir ($p<0.05$). RFRP-3 grubu ile karşılaştırıldığında RF9 grubunun hızında anlamlı bir azalış kaydedilmiştir ($p<0.05$). RFRP-3 + RF9 grubunda hız parametresi kontrole göre yüksek olmakla birlikte, istatistiksel öneme sahip bir farklılığın olmadığı saptanmıştır ($p>0.05$) (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Hızın deney grupları arasındaki değişimi. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında * $p<0.05$; RFRP-3 grubuyla karşılaştırıldığında ^a $p<0.05$

3.1.3. Merkezde Geçirilen Süre

Açık alan testinde merkezde geçirilen sürede anlamlı azalma yalnızca RFRP-3 grubunda bulunmuştur ($p<0.05$). RFRP-3 grubuna göre RF9 grubunda merkezde geçirilen süre anlamlı derecede artmıştır ($p<0.05$). RFRP-3 + RF9'un birlikte uygulanması bu süreyi kısaltmıştır ancak istatistiksel olarak önemsizdir ($p>0.05$) (Şekil 3.3).

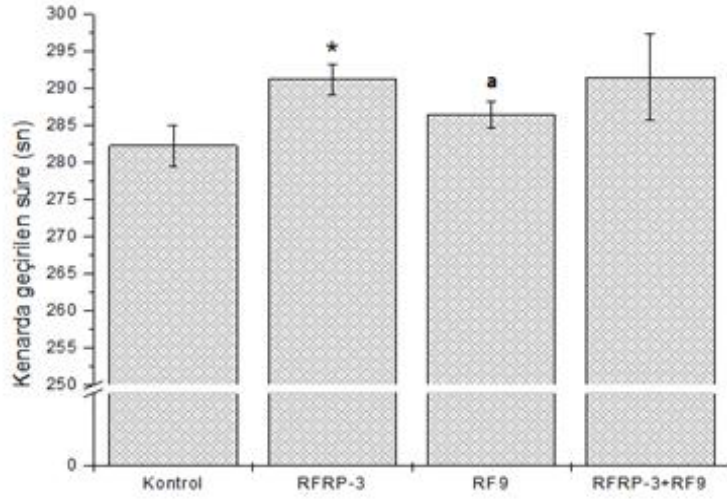


Şekil 3.3. Merkezde geçirilen sürenin deney grupları arasındaki değişimi. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında * $p<0.05$; RFRP-3 grubuyla karşılaştırıldığında ^a $p<0.05$

3.1.4. Kenarda Geçirilen Süre

Kenarda geçirilen sürenin gruplar arası değişimi incelendiğinde kontrol grubuna göre RFRP-3 grubunda anlamlı bir artış tespit edilmiştir ($p<0.05$). RFRP-3

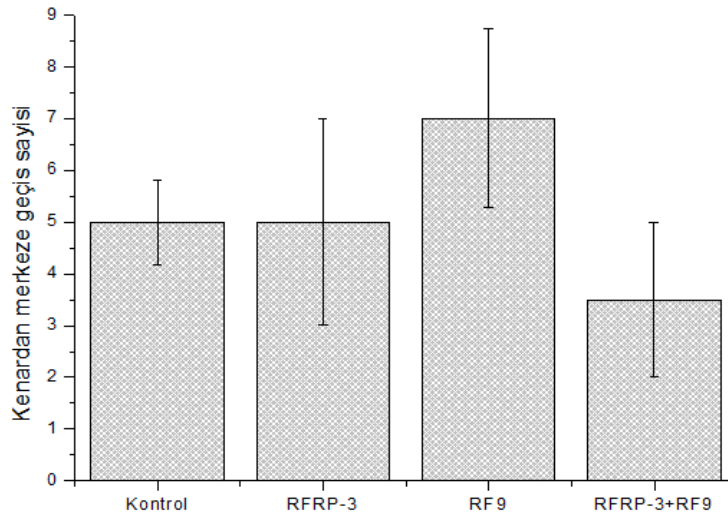
grubuna kıyasla RF9 grubunda kenarda geçirilen sürenin belirgin bir şekilde azaldığı görülmektedir ($p < 0.05$). RFRP-3 ve RF9'un birlikte uygulandığı grup kontrole göre kenar bölgesinde daha uzun süre geçirmiştir ancak bu değer istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p > 0.05$, Şekil 3.4).



Şekil 3.4. Kenarda geçirilen sürenin deney grupları arasındaki değişimi. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında * $p < 0.05$; RFRP-3 grubuyla karşılaştırıldığında ^a $p < 0.05$

3.1.5. Kenardan Merkeze Geçiş Sayısı

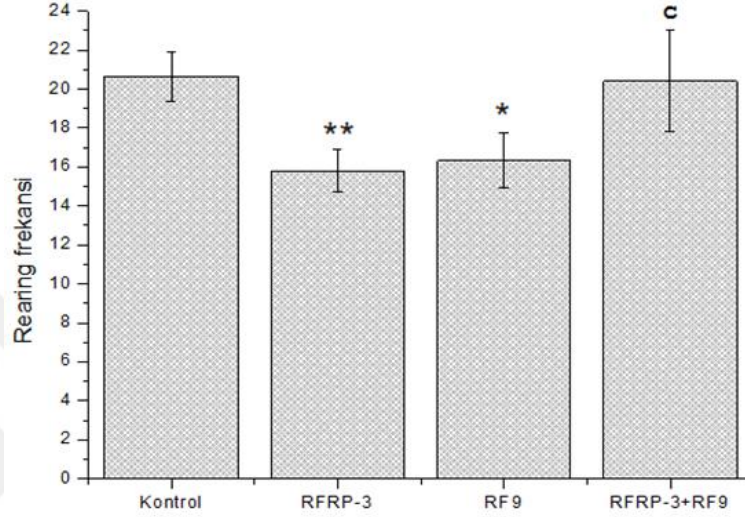
Gruplar arasında kenar bölgesinden merkez bölgesine geçiş sayısı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p > 0.05$, Şekil 3.5).



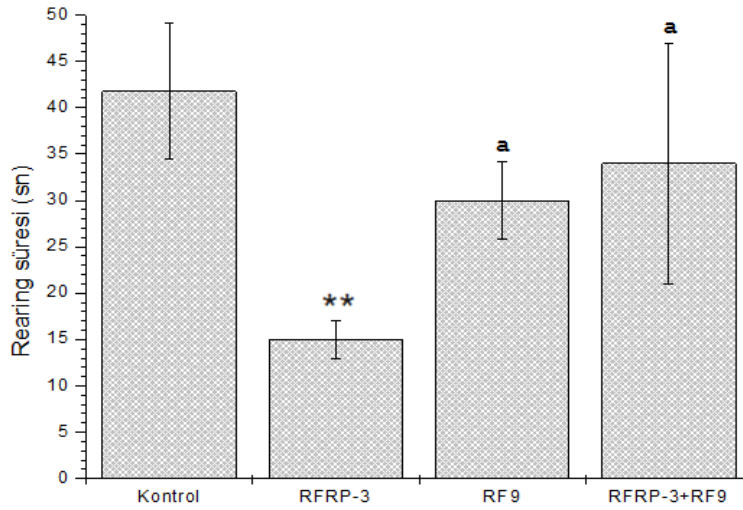
Şekil 3.5. Kenardan merkeze geçiş sayısının deney grupları arasındaki değişimi

3.1.6. Rearing Davranışı Frekans ve Süre Değişimleri

RFRP-3 grubunda “rearing” frekansının ve süresinin önemli derecede azaldığı belirlenmiştir ($p<0.01$). RF9 uygulaması, kontrole göre “rearing” frekansını istatistiksel bakımdan anlamlı bir şekilde azaltırken ($p<0.05$); RFRP-3 grubuyla karşılaştırıldığında “rearing” süresinde belirgin bir artışa yol açmıştır ($p<0.05$). RFRP-3 grubuyla kıyaslandığında, RFRP-3 + RF9 grubunda “rearing” frekansı ($p<0.01$) ve süresi ($p<0.05$) anlamlı bir azalış göstermiştir (Şekil 3.6, Şekil 3.7).



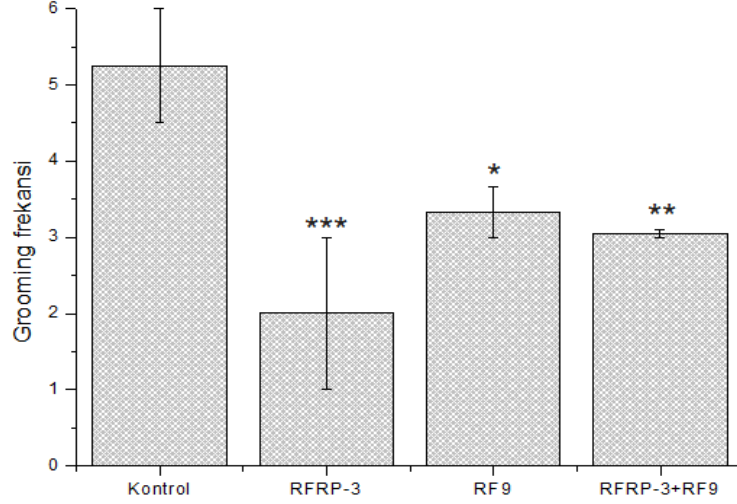
Şekil 3.6. Rearing davranışı frekansının deney grupları arasındaki değişimi. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında * $p<0.05$, ** $p<0.01$; RFRP-3 grubuyla karşılaştırıldığında ^c $p<0.001$



Şekil 3.7. Rearing davranışı süresinin deney grupları arasındaki değişimi. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında ** $p<0.01$; RFRP-3 grubuyla karşılaştırıldığında ^a $p<0.05$

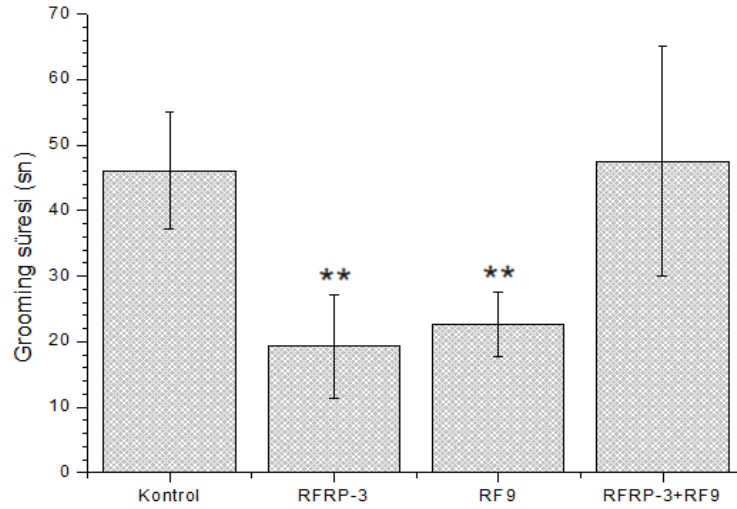
3.1.7. Grooming Davranışı Frekans ve Süre Değişimleri

Grooming frekansı kontrole göre, RFRP-3 ($p<0.001$), RF9 ($p<0.05$) ve RFRP-3 + RF9 ($p<0.01$) gruplarında anlamlı şekilde azalmıştır (Şekil 3.8).



Şekil 3.8. *Grooming* davranışı frekansının deney grupları arasındaki değişimi. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

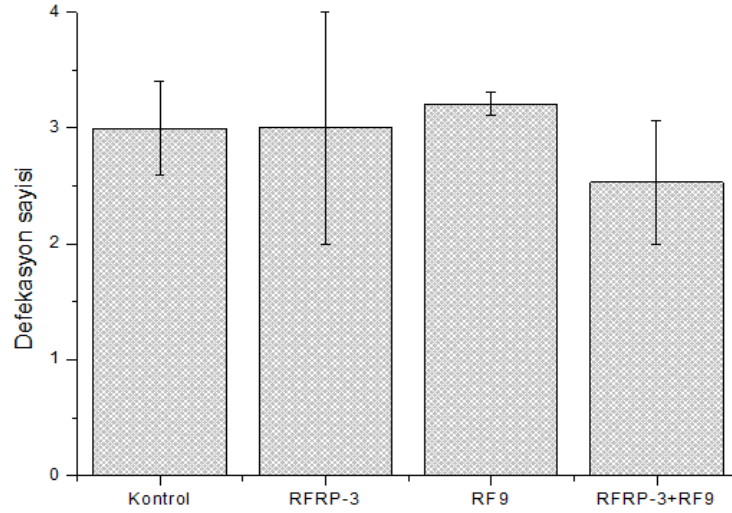
Grooming süresinin ise kontrole kıyasla RFRP-3 ve RF9 gruplarında önemli ölçüde azaldığı saptanmıştır ($p < 0.01$). RFRP-3 +RF9 grubunda bu sürenin kontrole yakın değerlerde olduğu gözlemlenmiştir ($p > 0.05$) (Şekil 3.9).



Şekil 3.9. *Grooming* davranışı süresinin deney grupları arasındaki değişimi. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında ** $p < 0.01$

3.1.8. Defekasyon Sayısı

Gruplar arasında defekasyon sayısı açısından anlamlı bir fark bulunmadığı belirlenmiştir ($p > 0.05$) (Şekil 3.10).



Şekil 3.10. Defekasyon sayısının deney grupları arasındaki değişimi

3.2. Yükseltilmiş Artı Labirent Testi Bulguları

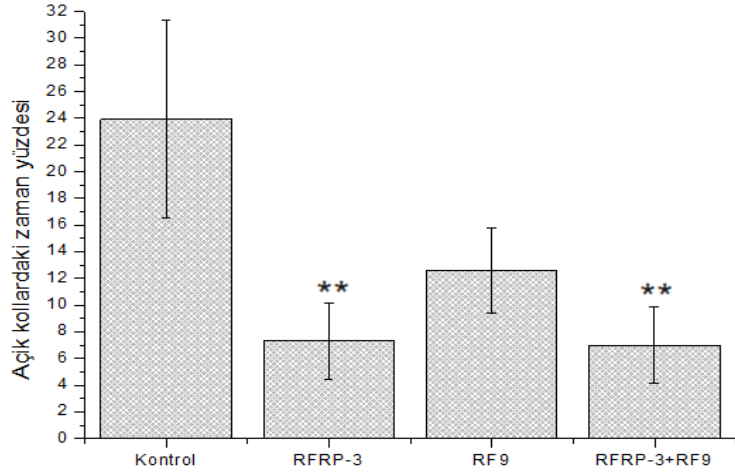
RFRP-3 ve RF9 uygulamasının anksiyete benzeri davranışlar üzerine etkisinin incelenmesinde, açık alan testinin parametrelerinin yanısıra yükseltilmiş artı labirent testinden elde edilen açık kollardaki zaman yüzdesi, açık ve kapalı kollara giriş sayısı ve “*head dipping*” davranışının frekans ve süre kayıtları da istatistiksel olarak analiz edilmiştir.

3.2.1. Açık Kollardaki Zaman Yüzdesi

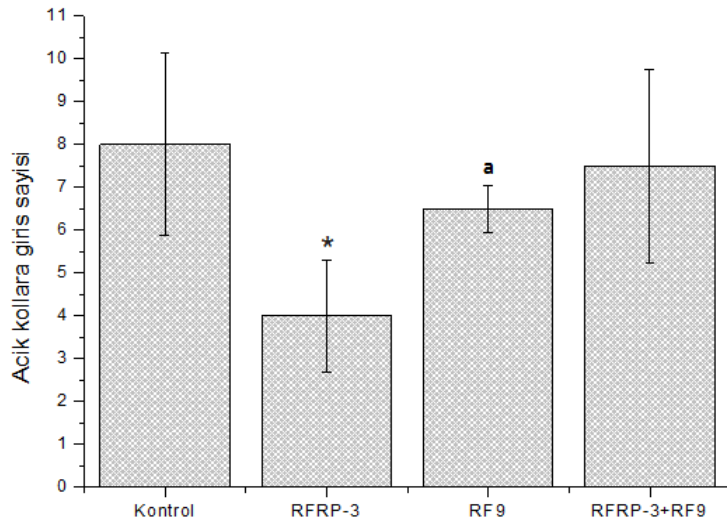
RFRP-3 uygulaması yükseltilmiş artı labirent testinde açık kollardaki zaman yüzdesini önemli derecede azaltmıştır ($p < 0.01$). RF9 grubunda RFRP-3 grubuna nispeten istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir artış kaydedilmiştir ($p > 0.05$). RFRP-3 + RF9 grubunda ise bu parametre kontrole göre anlamlı bir şekilde azalmıştır ($p < 0.01$) (Şekil 3.11).

3.2.2. Açık Kollara Giriş Sayısı

Açık kollara giriş sayısı kontrol grubuyla karşılaştırıldığında RFRP-3 grubunda anlamlı şekilde azalmıştır ($p < 0.05$). RFRP-3 grubuyla RF9 grubu karşılaştırıldığında ise RF9 grubunda kollar arası geçiş sayısının anlamlı artış gösterdiği tespit edilmiştir ($p < 0.05$). RFRP-3 ve RF9 grubunda ise istatistiksel açıdan anlamlı olmayan bir azalış bulunmuştur (Şekil 3.12).



Şekil 3.11. Açık kollardaki zaman yüzdesinin deney grupları arasındaki değişimi. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında ** p<0.01



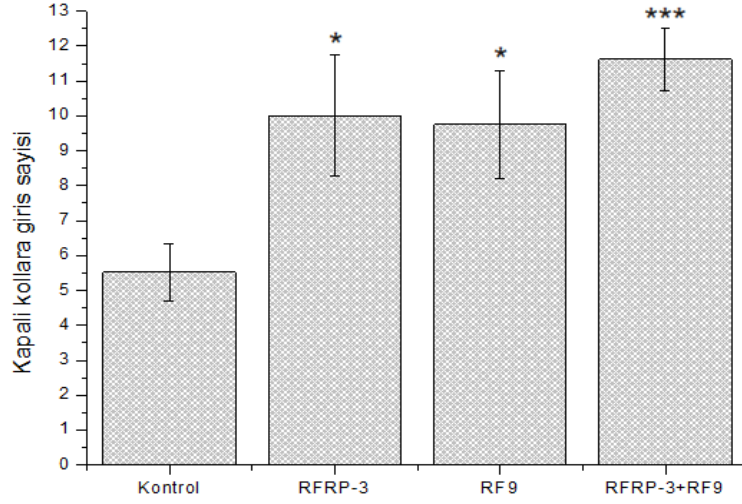
Şekil 3.12. Açık kollara giriş sayısının deney grupları arasındaki değişimi. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında * p<0.05; RFRP-3 grubuyla karşılaştırıldığında ^a p<0.05

3.2.3. Kapalı Kollara Giriş Sayısı

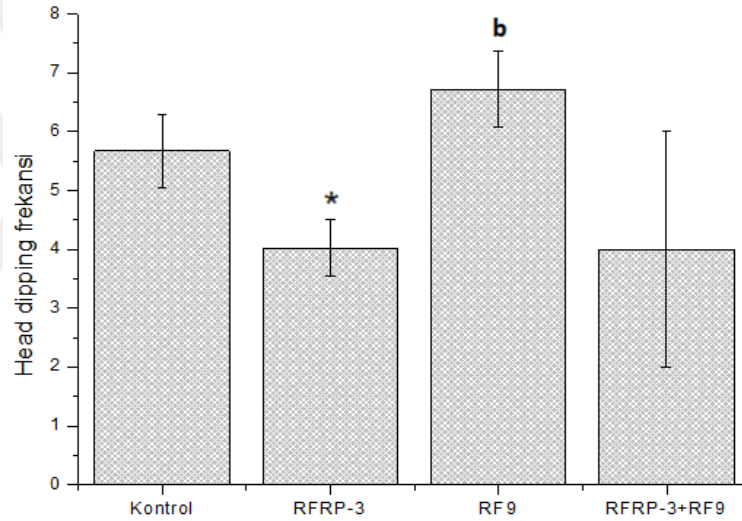
Kapalı kollara giriş sayısı kontrol grubuna göre RFRP-3 ve RF9 gruplarında (p<0.05) ve RFRP-3 + RF9 grubunda (p<0.001) belirgin şekilde artmıştır (Şekil 3.13).

3.2.4. Head dipping Davranışı Frekans Değişimleri

Diğer gruplara kıyasla “head dipping” frekansında anlamlı azalma sadece RFRP-3 grubunda bulunmuştur (p<0.05). RF9 grubunda RFRP-3 grubuna kıyasla anlamlı artış gözlenmiştir (p<0.01) (Şekil 3.14).



Şekil 3.13. Kapalı kollara giriş sayısının deney grupları arasındaki değişimi. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$

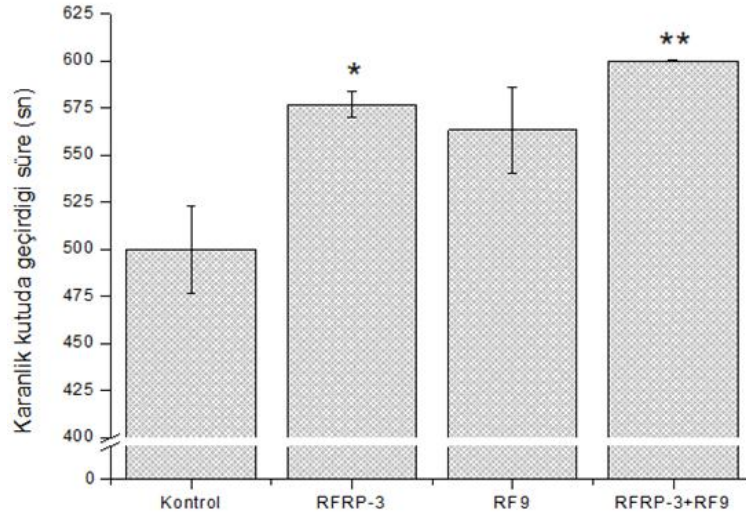


Şekil 3.14. Head dipping davranışı frekansının deney grupları arasındaki değişimi. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında * $p < 0.05$; RFRP-3 grubuyla karşılaştırıldığında ^b $p < 0.01$

3.3. Aydınlık-Karanlık Kutu Testi Bulguları

3.3.1. Karanlık Kutuda Kalma Süresi

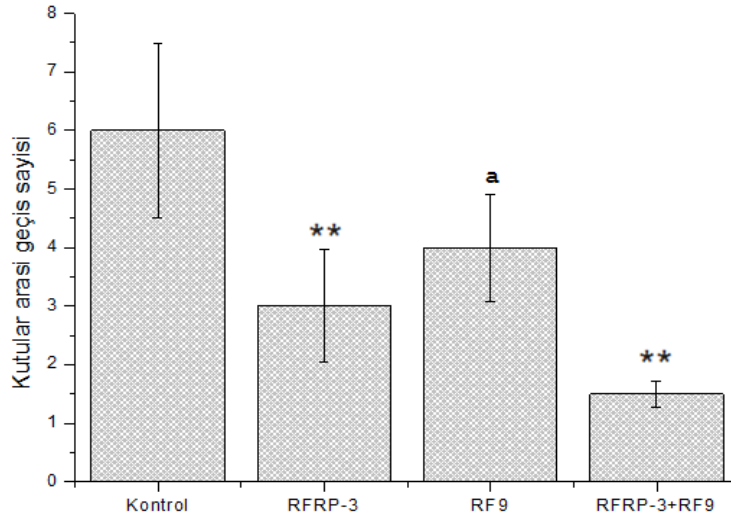
Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, RFRP-3 ($p < 0.05$) ve RFRP-3 + RF9 ($p < 0.01$) gruplarında karanlık kutuda kalma süresinin uzadığı belirlenmiştir. RF9 grubunda ise diğer deney gruplarına kıyasla daha az ve istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir artış saptanmıştır ($p > 0.05$) (Şekil 3.15).



Şekil 3.15. Karanlık kutuda kalma süresinin deney grupları arasındaki değişimi. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

3.3.2. Aydınlik↔Karanlık Kutu Geçiş Sayısı

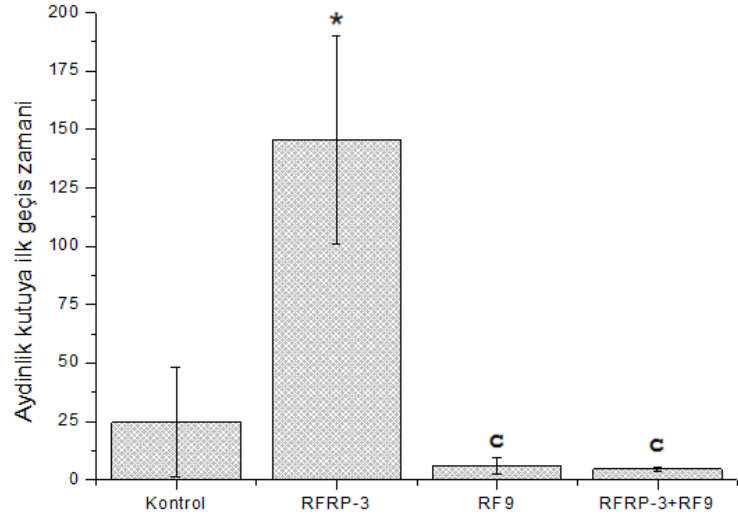
Aydınlık ve karanlık kutular arası geçiş sayısı, RFRP-3 ve RFRP-3 + RF9 gruplarında kontrole kıyasla önemli ölçüde azalmıştır ($p < 0.01$). RF9 grubunda bu rakam RFRP-3 grubuna göre anlamlı bir şekilde artmıştır ($p < 0.05$) (Şekil 3.16).



Şekil 3.16. Kutular arası geçiş sayısının deney grupları arasındaki değişimi. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında ** $p < 0.01$; RFRP-3 grubuyla karşılaştırıldığında ^a $p < 0.05$

3.3.3. Aydınlik Kutuya İlk Geçiş Zamanı

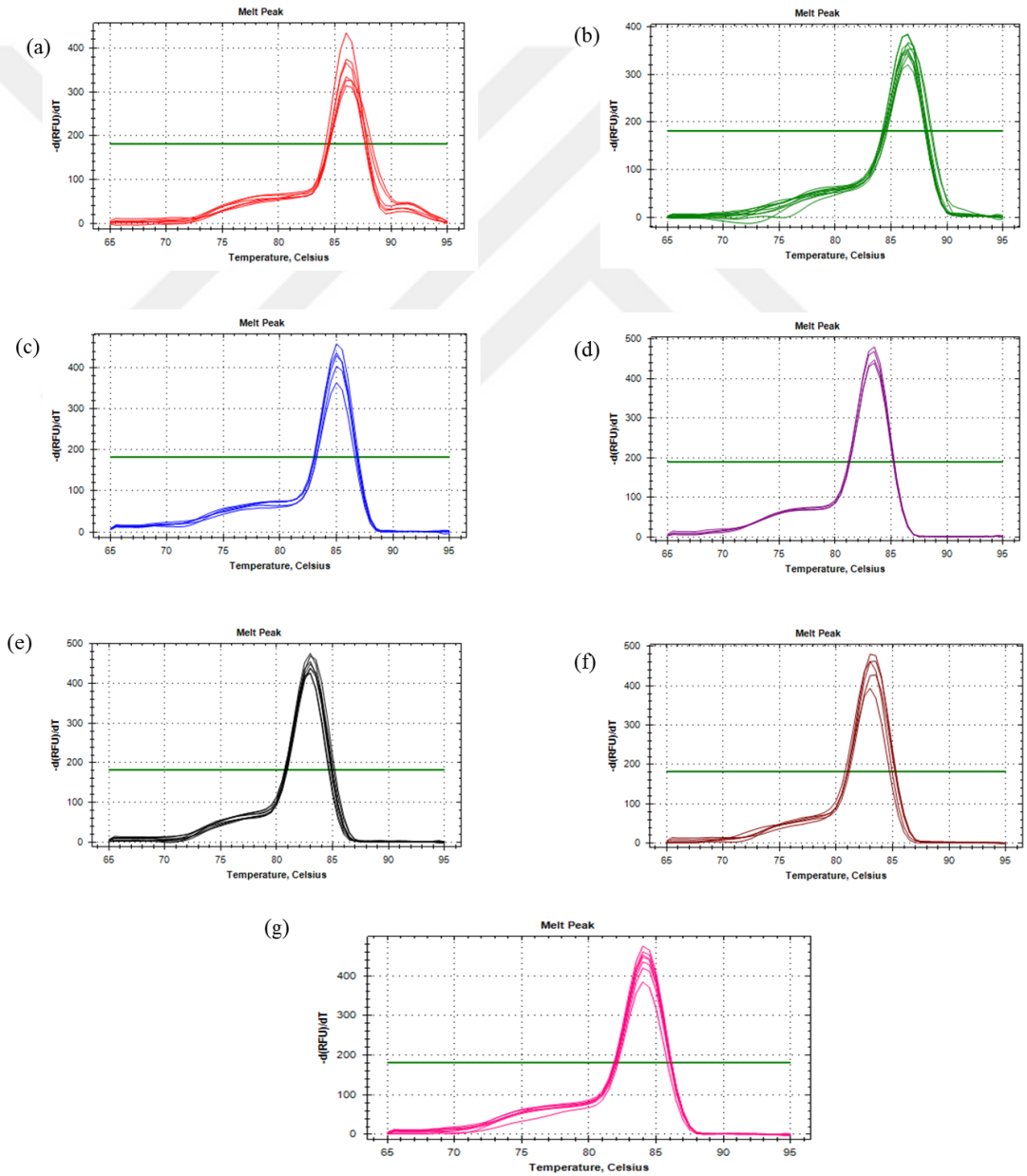
Kontrol grubuna göre RFRP-3 grubunda aydınlık kutuya ilk geçiş süresinin istatistiksel olarak anlamlı şekilde uzadığı bulunmuştur ($p < 0.05$). RFRP-3 grubu ile karşılaştırıldığında, RF9 ve RFRP-3 + RF9 gruplarında bu süre anlamlı şekilde kısalmıştır ($p < 0.001$) (Şekil 3.17).



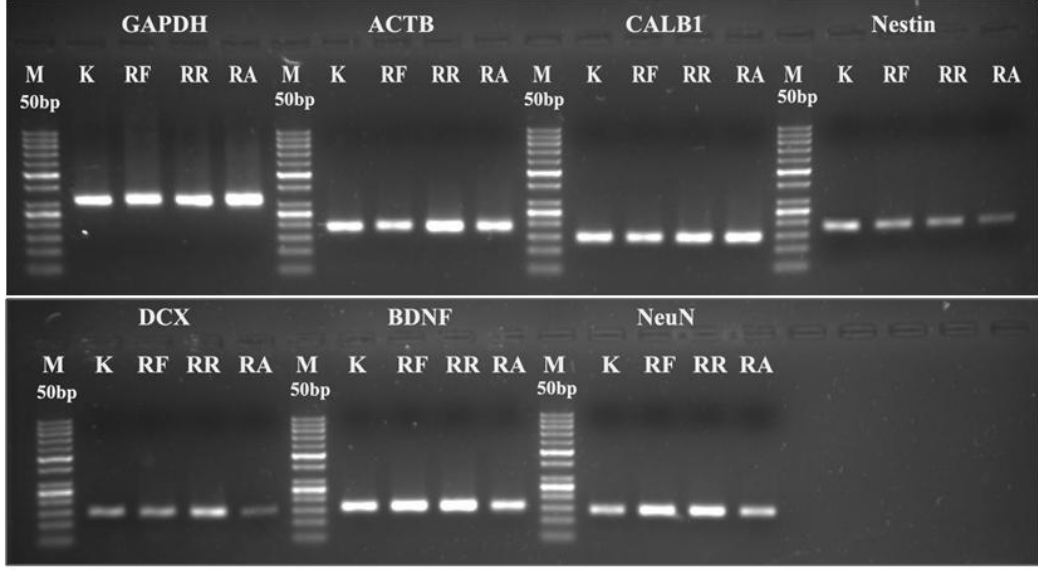
Şekil 3.17. Aydınlik kutuya ilk geçiş zamanının deney grupları arasındaki değişimi. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında * $p < 0.05$, RFRP-3 grubuyla karşılaştırıldığında ^c $p < 0.001$

3.4. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu Bulguları

Gerçek zamanlı PZR yöntemi kullanılarak nöroenez biyobelirteçleri olan Nestin, DCX, CALB1, NeuN ve BDNF genlerinin ekspresyonları çalışılmıştır. Ayrıca internal kontrol ve referans gen olarak GAPDH ve ACTB genleri kullanılmıştır. Referans genlerin ve nöroenez biyobelirteçleri olan hedef genlerin amplifikasyon sonuçlarına yönelik melt analizinin yazılım görüntüleri de Şekil 3.18'de verilmiştir. PZR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü Şekil 3.19'de gösterilmiştir. Melt analizi ve agaroz jel elektroforez sonuçları, çalışmada kullanılan tüm primerlerin spesifik olarak ilgili gen bölgesini çoğalttığını göstermektedir.

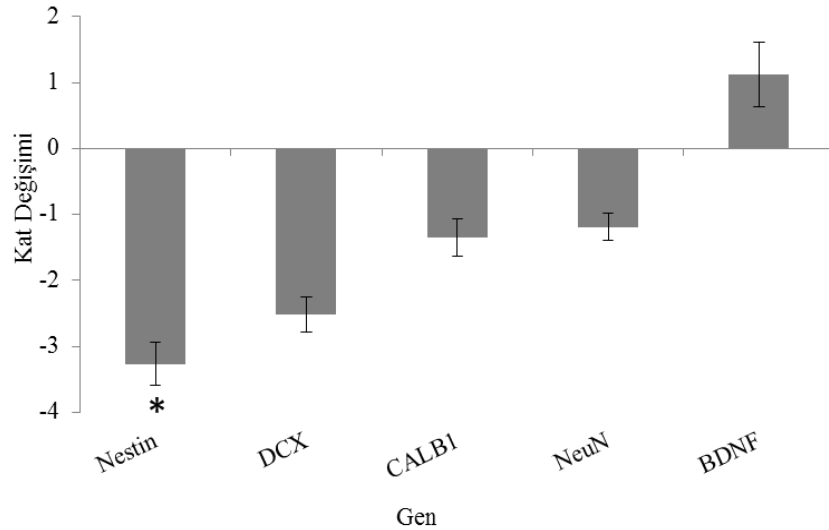


Şekil 3.18. GAPDH (a), ACTB (b), Nestin (c), DCX (d), CALB1 (e), NeuN (f) ve BDNF (g) genlerinin melt analiz eğrileri



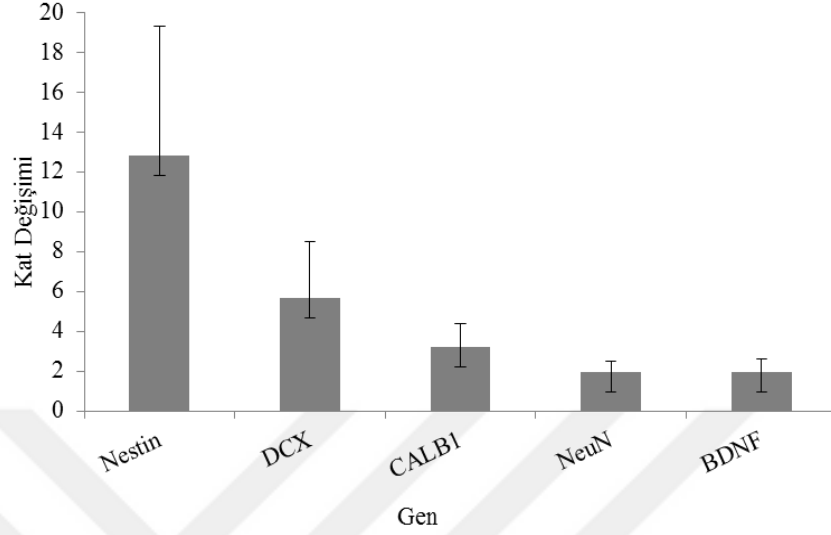
Şekil 3.19. Gerçek zamanlı PZR ürünlerinin jel görüntüsü. K: Kontrol, RF: RFRP-3, RA: RF9, RR: RFRP-3+RF9 grubu

Kontrole göre RFRP-3 grubunda nörogenez biyobelirteçlerinin gen ekspresyonları üzerine etkisi incelendiğinde, Nestin mRNA düzeyinin 3,27 kat azaldığı tespit edilmiştir ($p<0.05$). DCX, CALB1 ve NeuN mRNA düzeylerinde de azalma görülmüştür ancak istatistiksel olarak anlamlı değildir. BDNF gen ekspresyonunda ise istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir artış bulunmuştur (Şekil 3.20).



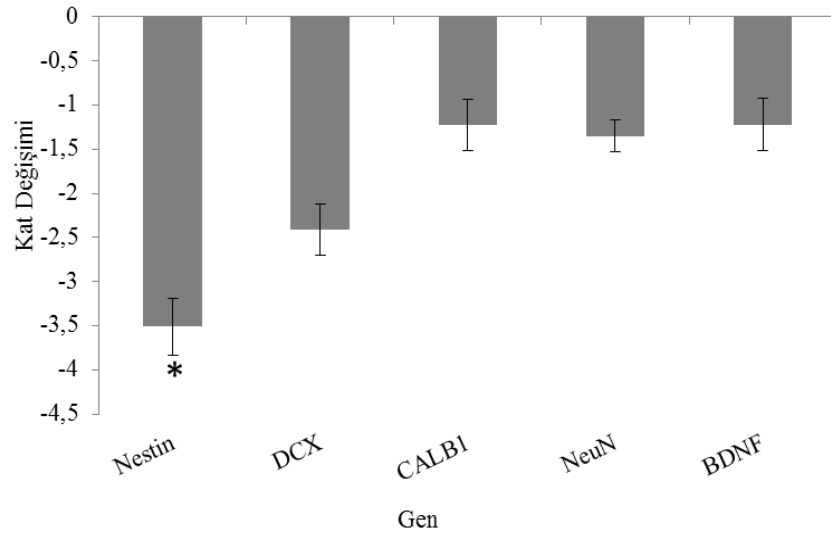
Şekil 3.20. Kontrol grubuna kıyasla RFRP-3 grubunda nörogenez biyobelirteçlerinin mRNA ekspresyon düzeyleri.* $p<0.05$

RF9'un nörogenez biyobelirteçlerinin mRNA ekspresyon düzeylerine etkisi incelendiğinde, tüm genlerin ekspresyonlarında artış saptanmıştır ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Şekil 3.21).



Şekil 3.21. Kontrol grubuna kıyasla RF9 grubunda nörogenez biyobelirteçlerinin mRNA ekspresyon düzeyleri.* $p<0.05$, ** $p<0.01$

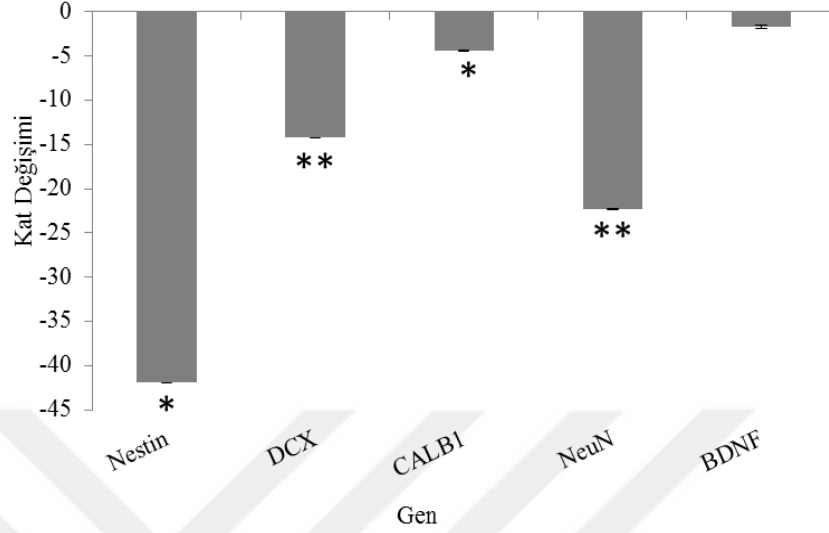
RFRP-3 ve RF9'un birlikte uygulandığı deney grubunda nörogenez biyobelirteçlerinin gen ekspresyonlarının kontrole göre azaldığı gözlenmiştir. Bununla birlikte kontrol grubuna göre RFRP-3 + RF9 grubunda istatistiksel olarak anlamlı azalış yalnızca Nestin mRNA düzeyinde kaydedilmiştir ve 3,51 kat azalma saptanmıştır ($p<0.05$) (Şekil 3.22).



Şekil 3.22. Kontrol grubuna kıyasla RFRP-3+RF9 grubunda nörogenez biyobelirteçlerinin mRNA ekspresyon düzeyleri.* $p<0.05$

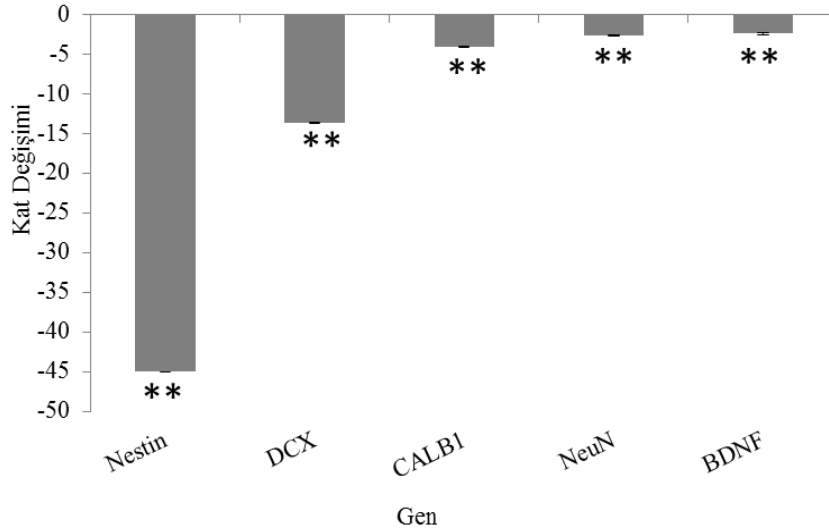
RF9 grubuna kıyasla RFRP-3 grubunda Nestin mRNA düzeyinin 41,9 kat ve CALB1 mRNA düzeyinin 4,37 kat azaldığı tespit edilmiştir ($p<0.05$). DCX gen

ekspresyonunun 14,24 kat azaldığı ve NeuN ekspresyonunun 2,3 kat azaldığı görülmüştür ($p<0.01$). BDNF düzeylerindeki azalış ise istatistiksel olarak anlamlı değildir (Şekil 3.23).



Şekil 3.23. RF9 grubuna kıyasla RFRP-3 grubunda nörogenez biyobelirteçlerinin mRNA ekspresyon düzeyleri.* $p<0.05$, ** $p<0.01$

RF9 grubuna göre RFRP-3 ve RF9'un birlikte uygulandığı deney grubunda Nestin ekspresyon düzeyinin 44,98 kat, DCX'in 13,61 kat, CALB1'in 3,96 kat, NeuN'un 2,61 ve BDNF'nin 2,37 kat azaldığı saptanmıştır ($p<0.01$) (Şekil 3.24).



Şekil 3.24. RF9 grubuna kıyasla RFRP-3+RF9 grubunda nörogenez biyobelirteçlerinin mRNA ekspresyon düzeyleri.* $p<0.05$, ** $p<0.01$

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Son zamanlarda tanımlanan yeni bir nöropeptit olan RFRP-3'ün keşfi nöroendokrinolojiye yeni bir bakış açısı kazandırmıştır. Yeni bir hipotalamik nöropeptit üreme fizyolojisinde ve üreme davranışlarında yerini almıştır. Bununla birlikte, RFRP-3'ün fizyolojik rolü ve üreme aksının ötesinde potansiyel fonksiyonlarını inceleyen çalışmalar oldukça sınırlıdır. RFRP-3 reseptörünün ve projeksiyonlarının hipokampusdaki etkisi ise açıklığa kavuşmayı beklemektedir. Mevcut tez çalışması ile RFRP-3 ve GPR147 sinyalleşmesinin hipokampusdaki olası fonksiyonlarının ve erişkin nöroenez ile anksiyete benzeri davranışlar üzerindeki etki mekanizmalarının araştırılması amaçlanmıştır.

Davranış testlerinde anksiyeteyi belirlemek için skorlanan parametreler, keşif ve sakınma davranışlarıdır. Keşif davranışları, sıçanların bilmedikleri yeni bir bölgeyi araştırma istekleri ile gösterdikleri yürüme, şahlanma ve koklama gibi davranışlardır. Anksiyete durumunda keşif davranışlarının baskılandığı bilinmektedir. Anksiyete artışı ile hayvanların hareketsizlik, saldırganlık, defekasyon gibi sakınma davranışlarında artış gözlenmektedir (Palanza 2001; Bailey ve Crawley 2009; Campos ve ark. 2013; O'Leary ve ark. 2013).

Açık alan testi, sakınma ve keşif davranışlarının ve otonom fonksiyonların eş zamanlı ölçülmesini sağlamaktadır. Deney hayvanı açık alan düzeneğine yerleştirildiğinde, farklı bir ortamda bulunduğu için huzursuz olacak ve etrafı keşfetme isteği ile kat ettiği mesafe artacaktır (Prut ve Belzung 2003). RFRP-3 grubu sıçanlarda alınan yolun anlamlı olarak artması ve RFRP-3 grubuyla karşılaştırıldığında RF9 grubundaki anlamlı azalışı (Şekil 3.1), RFRP-3'ün anksiyojenik etkilerine işaret etmektedir.

Sıçanlarda açık alanın çevresinde duvar kenarlarına yakın sınırlarda gezinme isteğinin artması ve alanın orta bölümüne daha az girmesi anksiyete göstergesi olarak kabul edilmektedir. Anksiyolitik bileşiklerin merkezi bölgeden kaçınmayı azalttığı ve merkezde geçirilen süreyi uzattığı bilinmektedir (Bailey ve Crawley 2009; O'Leary ve ark. 2013). RFRP-3, kontrol grubuna kıyasla merkezde geçirilen süreyi azaltırken, kenar bölgesinde geçirilen süreyi arttırmıştır (Şekil 3.3). RFRP-3'ün bu anksiyojenik etkileri, RF9 uygulaması ile azalmıştır ancak RFRP-3 + RF9 grubunda merkezden

kaçınma ve duvara yakın kısımlarda vakit geçirme isteğinin sürdürüldüğü belirlenmiştir.

Anksiyete ile ilişkilendirilen temel belirteçlerden birisi de hızın artışıdır (Milner ve Crabbe 2008). İcv RFRP-3 uygulamasının, hızı anlamlı şekilde arttırdığı gözlemlenmiştir (Şekil 3.2).

Rearing (şahlanma), sıçanların ön pençelerini kaldırıp arka iki ekstremitesinin üzerinde yükselerek durdukları pozisyonudur. Çevreyi tanımak ve bilgi toplamak için yapılan bu hareket bir araştırma göstergesidir. Anksiyete ile birlikte bu davranışta azalma meydana gelmektedir (Prut ve Belzung 2003; O’Leary ve ark. 2013). RFRP-3 grubunda “*rearing*” frekansının ve süresinin önemli derecede azaldığı belirlenmiştir (Şekil 3.6). Bu keşif davranışının da baskılanması, RFRP-3’ün anksiyete benzeri etkiler oluşturduğunu desteklemektedir. RF9’un, RFRP-3’ün bu anksiyojenik etkilerini antagonize edemediği Şekil 3.6’da görülmektedir.

Anksiyetenin arttığı durumlarda otonom fonksiyonlar da arttığı için defekasyon sayısında ve “*grooming*” davranışında artış görülmektedir. Bununla birlikte, anksiyete benzeri davranışlara “*grooming*” davranışında azalma ya da defekasyon sayısında farklı sonuçların eşlik ettiği de rapor edilmiştir (Kalueff ve Tuohimaa 2005; Campos ve ark. 2013). Elde edilen bulgularda defekasyon sayısında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadığı gibi (Şekil 3.10), RFRP-3 grubunda “*grooming*” frekansı ve süresinin anlamlı şekilde azaldığı belirtilmiştir (Şekil 3.8, 3.9).

Yükseltilmiş artı labirent testinde değerlendirilen temel parametre açık kollardaki zaman yüzdesidir (Mineur ve ark. 2013). Sıçanlar içgüdüsel olarak yüksek ve açıkta bulunan alanlardan kaçınmaktadır. Açık kollarda geçirilen zamanın ve açık kollara giriş sayısının azalması, yüksek anksiyete seviyelerini yansıtmaktadır (Andreatini ve Bacellar 1999).

RFRP-3 uygulaması, açık kollardaki zaman yüzdesini önemli derecede azaltmıştır (Şekil 3.11). Açık alan testi ile ölçülen kat edilen mesafe parametresi, sıçanların lokomotor aktivitesini ifade etmektedir. RFRP-3 grubu sıçanlarda kontrol grubuna kıyasla kat edilen mesafede bir azalma olmadığı aksine anlamlı bir artış bulunduğu Şekil 3.1’de görülmektedir. Dolayısıyla, açık kollardaki zaman yüzdesi,

lokomotor aktividen bağımsız bir şekilde azalmıştır. RFRP-3 uygulanan sıçanların kat ettikleri mesafenin kontrol grubuna kıyasla daha az olmaması (Şekil 3.1), açık kollardaki zaman yüzdesinin lokomotor aktivite kaybından dolayı değil de, anksiyete benzeri bir davranış belirteci olarak azaldığını göstermektedir. Sonuç olarak, icv RFRP-3 uygulaması lokomotor aktiviteden bağımsız olarak anksiyojenik etkiler göstermiştir. RF9'un yetersiz antagonist etkileri bu parametre için de geçerlidir (Şekil 3.11).

Merkez bölgesine yüzü açık kollara bakacak şekilde bırakılan deney hayvanları, yükseklikten ve açık alandan korktukları için karanlık olan kapalı kola geçme eğilimindedirler (Zheng ve ark. 2015). Kapalı kollarda geçirilen sürenin uzaması ve kapalı kollara giriş sayısındaki artış anksiyeteye işaret etmektedir. RFRP-3, açık kollara giriş sayısını diğer grupların aksine anlamlı bir şekilde azaltırken, kapalı kollara giriş sayısını arttırmıştır. RF9 ve RFRP-3 + RF9 gruplarında da kapalı kollara geçiş sayısında belirgin bir artış tespit edilmiştir (Şekil 3.12, 3.13). Elde edilen bu bulgu da RF9'un antagonistik ve anksiyolitik etki göstermede yetersiz kaldığını desteklemektedir.

EPM'de skorlanan keşif davranışlarından birisi de “*head dipping*” denilen hayvanın başını açık kollarin kenarlarından aşağı zemine doğru sarkıtarak yaptığı araştırma davranışdır. *Head dipping* frekansında azalma anksiyete göstergesi olarak değerlendirilmektedir (Tchekalarova ve ark. 2016). Diğer gruplara kıyasla “*head dipping*” frekansında anlamlı azalma sadece RFRP-3 grubunda bulunmuştur (Şekil 3.14).

LDB testinde, karanlık kutuya bırakılan sıçanların açık kutuya girmesi için geçen süre ve bu kutuda kalış süresi değerlendirilmiştir. RFRP-3 ve RFRP-3 + RF9 gruplarında kaydedilen karanlık kutuda kalma süresinin uzaması anksiyetenin bir göstergesidir (Şekil 3.15). Anksiyolitik ajanlar aydınlık kutuya geçiş sayısını arttırıcı etki gösterirken, anksiyojenikler tam tersi etki göstermektedir (Campos ve ark. 2013). Aydınlık ve karanlık kutular arası geçiş sayısı, RFRP-3 ve RFRP-3 + RF9 grubu sıçanlarda kontrole kıyasla önemli ölçüde azalmıştır (Şekil 3.16). Dahası, RFRP-3 grubu sıçanların aydınlık kutuya ilk geçişi diğer gruplarla karşılaştırıldığında çok uzun zaman sonra olmuştur (Şekil 3.17).

Kaewwongse ve çalışma arkadaşları (2011), erkek sıçanlarda yaptıkları açık alan testinde RFRP-3'ün anksiyete benzeri davranışları uyardığını göstermiştir. İcv RFRP-3 enjeksiyonu, merkez bölgesinde geçirilen süreyi anlamlı bir şekilde azaltmıştır. RFRP-3'ün davranışsal stres cevabının kontrolünde rol oynayabileceği ileri sürülmüştür (Kaewwongse ve ark. 2011).

Kim ve ekibinin (2015) yaptığı çalışmada, RFRP-3 ilk kez anksiyojenik bir nöropeptit olarak tanımlanmıştır. Dişi farelere ozmotik minipompa yoluyla 5 gün icv RFRP-3 infüzyonu gerçekleştirilmiştir. RFRP-3 uygulanan farelerde serum CORT düzeylerinin diğer gruplara kıyasla önemli ölçüde yüksek olduğu belirtilmiştir. RFRP-3, kortikosteron salgılanmasını uyaran ve anksiyojenik cevaplara yol açan güçlü bir HPA aktivatörü olarak rapor edilmiştir. RFRP-3 uygulaması, açık alan testinde merkezde ve EPM'de açık kollarda geçirilen zamanı önemli ölçüde azaltmıştır. RFRP-3 grubu fareler kontrol farelerine kıyasla aydınlık kutuya daha az geçmiştir ve aydınlık alanda çok daha az zaman geçirmiştir (Kim ve ark. 2015). Tüm bu veriler, mevcut çalışmada elde edilen davranış testleri bulgularıyla uyumludur.

RF9, RFRP-3 reseptör (GPR147 ve GPR74) antagonisti olarak bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda hem farelerde hem de sıçanlarda RFRP-3'n baskıladığı GnRH ve gonadotropin salgılanmasını, RF9 uygulamasının geri döndürdüğü rapor edilmiştir (Simonin ve ark. 2006; Pineda ve ark. 2010b; Glanowska ve ark. 2014; Xiang ve ark. 2015).

Sahin ve çalışma arkadaşları (2015), RF9'un yalnızca RFRP-3 reseptörlerini bloke etmekle kalmadığını, aynı zamanda kisspeptin reseptörlerini de aktiveştiriyor olabileceğini tespit etmiştir. RF9'un hedef dışı etkilerinin olabileceğini ve kisspeptin reseptörlerinin de muhtemel hedefleri olabileceğini öne srmşlerdir. Dişi sıçanlarda kisspeptinin ve RF9'un pubertenin düzenlenmesi ve LH salgılanması üzerine etkileri, kisspeptin antagonisti (p235) uygulaması ile geri döndürülmüştür. P234'n kisspeptinle birlikte RF9'u da antagonize ettiği bildirilmiştir. RF9'un HPG aksı ile ilişkili fonksiyonlarını kisspeptin/GPR54 sinyalleşmesini modüle ederek gösterebileceği rapor edilmiştir (Sahin ve ark. 2015).

Kim ve arkadaşlarının yaptığı araştırmada (2015), ticari olarak edinilebilen tek RFRP-3 antagonisti olan RF9'un kisspeptin reseptörünün (KISS1R) agonisti

olduğu belirtilmiştir. Yeni, güçlü ve spesifik bir GPR147 antagonisti (GJ14) tanımlanmıştır. GJ14, RFRP-3'ün etkilerini *in vitro* ve *in vivo* koşullarda manipüle etmiştir. GJ14'ün RFRP-3'ün indüklediği kortikosteron salgılanmasını ve CRH nöronlarındaki nöronal aktivasyonu tamamen bloke ettiği ortaya konulmuştur. RFRP-3'ün anksiyojenik etkilerine karşın, GJ14 anksiyolitik benzeri etkilere yol açmıştır. RFRP-3 ve GJ14'ün birlikte uygulanması, RFRP-3'ün anksiyojenik ve HPA aksını uyarıcı etkilerinin tamamen ortadan kalkması ile sonuçlanmıştır. Araştırmacılar, RF9'un RFRP-3'ün farmakolojik manipülasyonunu sağlamada başarılı olamadığını rapor etmiştir (Kim ve ark. 2015)

RF9'un GnRH nöronlarını uyarıcı etkilerinin yalnızca GPR147 üzerindeki antagonistik etkilerine değil, aynı zamanda KISS1 reseptörleriyle bağlantısına da dayandığı ifade edilmiştir (Liu ve Herbison 2014). RF9'un KISS1R sinyalleşmesi üzerine direk etkilerinin olduğu ise ilk kez Min ve ekibi (2015) tarafından rapor edilmiştir. RF9'un, hem KISS1R aracılı IP3 sinyalleşme yolağını ve hücre içi Ca^{+2} artışı hem de ERK fosforilasyonunu uyararak KISS1R agonisti gibi davrandığı gösterilmiştir. RF9'un KISS1R'ne spesifik olarak bağlandığı ve KISS1R'i aktifleştirdiği bu bulgularla desteklenmiştir (Min ve ark. 2015).

Mevcut çalışmanın davranış testlerinden elde edilen bulgularının, RF9 açısından da literatürle uyumlu olduğu görülmektedir. RF9'un RFRP-3'ün anksiyojenik etkilerini manipüle etmedeki yetersizliği ve RFRP-3 + RF9 grubundaki sıçanların anksiyete benzeri davranışlar sergilemesi, RF9'un başka sinyal yollarıyla etkileşim içinde olabileceğini desteklemektedir.

Hipokampusda RFRP-3 ve GPR147 sinyalleşmesi ile ilgili ilk bulgular, RFRP-3'ün HPG aksı dışında başka olası rollerine ışık tutmuştur. Hipokampusda geniş bir dağılım gösteren RFRP-3-ir lifleri ve GPR147 ekspresyonu, RFRP peptitlerinin hipokampal aktivitenin modülasyonuna katılabileceğini düşündürmüştür. Hipokampal RFRP-3 lif projeksiyonlarının en yoğun CA2/CA3'ün piramidal tabakalarında bulunması da bu görüşü desteklemiştir (Rizwan ve ark. 2009).

Erişkin sıçan hipokampusunda ilk kez RFRP-3-ir hücre gövdelerinin tespit edilmesi (Ferris ve ark. 2015), bu nöropeptitin hipokampusdaki olası fonksiyonunun

aydınlatılması açısından önemli bir bulgudur. RFRP-3'ün hipokampal astrositlerde lokal olarak sentezlendiği aynı araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir.

Erişkin nörogenezin her bir aşaması sırasında çeşitli spesifik biyobelirteçler eksprese edilmektedir. Bu belirteçlerin tespiti ile nörojenik süreç ve yeni doğan hücrelerin kaderi detaylı ve net bir şekilde izlenebilmektedir (Duan ve ark. 2008; von Bohken ve Halbach 2011). Mevcut çalışmada, nörogenez biyobelirteçlerinden nestin, DCX, CALB1, NeuN ve BDNF genlerinin ekspresyon değişimleri incelenmiştir.

Nörogenez sürecinde, bölünen nöral kök hücreler, farklılaşacakları bölgeye doğru göç eden progenitörleri meydana getirmektedir. Bu nöral prekürsörler eksprese ettikleri nestin proteininden tanınmaktadır. Nestin, nöral progenitör biyobelirteçidir (Jin ve Galvan 2007). Elde edilen bulgular değerlendirildiğinde, RFRP-3 uygulamasının nestinin mRNA ekspresyonunu önemli ölçüde baskıladığı görülmektedir (Şekil 3.20, Şekil 3.22). Nestin ekspresyonundaki bu azalma, nöral progenitör kayıplarına işaret etmektedir.

Hipokampusda nörogenez, dentat girusun subgranüler zonu ile sınırlıdır (Christian ve ark. 2014; Kempermann ve ark. 2015) ve RFRP-3-ir hücre gövdelerinin hipokampusda en çok DG'da bulunduğu tespit edilmiştir (Ferris ve ark. 2015). Bununla birlikte, nörogenez artışının tespitinde hipokampal hücre proliferasyonu temel biyobelirteç olarak kullanılmaktadır (Murai ve ark. 2014; Sakharkar ve ark. 2016). Erişkin nörogeneze ev sahipliği yapan DG'da yoğunlaşan RFRP-3'ün, nöral progenitör çoğalmasını bu denli baskılaması mevcut çalışmanın hipotezini doğrular niteliktedir.

Progenitör hücreler bölünerek, SGZ'dan granüler hücre tabakasına göç eden nöroblastları üretmektedir (Christie ve ark. 2013). Nöroblastlar, çoğalarak göç eden hücrelerdir. DCX, mitoz sonucu yeni doğan nöronlarda eksprese edilen bir nöroblast/immatür nöron biyobelirteçidir. (Shapiro ve ark. 2005; Liu ve ark. 2010). DCX geni, hem fetal hem de erişkin beyinde göç eden ve farklılaşan nöronlarda eksprese edilmektedir (Jin ve Galvan 2007). Farklılaşan, olgunlaşan, elektriksel olarak aktif, fonksiyonel bir nöron, matür nöron belirteci olan NeuN ve kalbindini eksprese etmeye başlamaktadır (Abrous ve ark. 2005; Yamagishi ve ark. 2015). Nöron gelişimi sırasında eksprese edilen bu genlerin yanısıra BDNF düzeyinin *up-*

regülasyonunun hipokampal nörogenez artışını yansıttığı bilinmektedir (Xu ve ark. 2015).

Yapılan çalışmada RFRP-3'ün, DCX, CALB1 ve NeuN ekspresyonunu azalttığı görülmektedir (Şekil 3.20). Bu azalma istatistiksel açıdan anlamlı olmasa da, RFRP-3'ün nörogenez üzerindeki inhibitör etkilerini desteklemektedir. RFRP-3, BDNF gen ekspresyonunu arttırsa bile bu artış istatistiksel açıdan anlamlı değildir (Şekil 3.20).

RF9'un nörogenez biyobelirteçlerinin mRNA ekspresyon düzeylerine etkisi incelendiğinde, tüm genlerin ekspresyonlarında anlamlı olmasa da artış görülmektedir (Şekil 3.21). RF9 nörogenez üzerindeki etkilerini hem hücre proliferasyonunu hem de sağ kalımı arttırarak göstermiştir. RF9 ile ilgili bulgular birlikte ele alındığında, RF9'un bu nörojenik etkilerinde, GPR147 ile beraber başka bir reseptör grubunun da pay sahibi olabileceği görüşü doğrulanmaktadır.

Erişkin hipokampusda astrositlerin nörojenik potansiyeli (Ehninger ve Kempermann 2008; Zhao ve ark. 2008), hipokampal nörogenezin astrositik kontrolü (Abrous ve ark. 2005) ve astrositlerin hipokampusda glutamat ve GABA sinyalleşmesinin modülatörleri gibi davradıkları (Ferris ve ark. 2015) göz önünde bulundurulduğunda, astrositlerde ekspresyonu keşfedilen RFRP-3'ün erişkin hipokampal nörogenez üzerindeki bu inhibitör etkileri şaşırtıcı değildir.

Azalmış ya da bozulmuş nörogenezin anksiyeteye yol açabileceği birçok araştırmacı tarafından rapor edilmiştir (Ageta ve ark. 2008; Schloesser ve ark. 2009; Sahay ve ark. 2011; Petrik ve ark. 2012; Cameron ve Glover 2015; Marques ve ark. 2016). Erişkin hipokampal nörogenezin inhibisyonu, EPM ve LDB testlerinde anksiyete benzeri davranışları arttırmıştır (Revest ve ark. 2009). Erişkin SGZ'da üretilen yeni nöronların korku ve anksiyetenin regülasyonuna katıldığı öngörülmüştür. Yenidoğan hipokampal nöronların uyardığı artmış nöroplastisiteye, azalmış anksiyetenin eşlik ettiği bildirilmiştir. (Marques ve ark. 2016). Mevcut çalışmada, RFRP-3 anksiyete benzeri davranışları uyarmıştır ve erişkin hipokampal nörogenezi baskılamıştır. Tüm bu destekleyici bulgular, RFRP-3'ün anksiyojenik etkilerinde erişkin hipokampal nörogenezin aracı bir mekanizma olarak rol oynayabileceğini göstermektedir. RFRP-3, hipokampal nörogenezi baskılayarak

anksiyete benzeri davranışların uyarılmasına yol açmış olabilir. RFRP-3'ün nörogenez üzerindeki baskılayıcı etkisini, nörogenezin negatif düzenlenmesine katılan (Kheirbek ve ark. 2012; Marques ve ark. 2016) HPA aksını aktifleştirerek (Kim ve ark. 2015) gerçekleştirmesi kuvvetle muhtemeldir.

GnRH'nın hipokampal fonksiyonları ve plastisiteyi modüle ettiği, literatürde birçok çalışmanın sonucu olarak ortaya konulmuştur. GnRH reseptörlerinin en yoğun olduğu beyin bölgesinin hipokampus olması ve hipokampal GnRH'nın sinaptik plastisite biyobelirteçlerini *up regüle* etmesi, dendritik dallanmayı arttırması ve nöral eksitasyonu uyarması, GnRH'nın nöromodülatör etki gösterdiğini desteklemektedir (Gould ve ark. 2000; Liu ve ark. 2011; Ferris ve ark. 2015).

RFRP-3'ün hipokampusdaki muhtemel rollerinden birinin lokal steroid üretiminin düzenlenmesi olduğu kanısına varılmıştır. GnRH'nın ve astrositlerin ikisinin de hipokampal dendritik dallanma yoğunluğunu hızlıca modüle ettiği göz önünde bulundurulduğunda, hipokampal RFRP-3'ün hipokampal GnRH ile etkileşerek hipokampusdaki sinaptik bağlantıları modüle edebileceği ihtimaller dahilindedir (Ferris ve ark. 2015).

Sıçan hipokampusunda GnRH-ir hücre gövdelerinin bulunmaması ve GnRH-I'nin sentezlenmediğinin tespit edilmesi (Ferris ve ark. 2015) ve DG'da GPR54 ekspresyonunun bölge spesifik yoğunluğu (Lee ve ark. 1999), RFRP-3'ün hipokampusdaki etkilerini daha ziyade kisspeptin nöronlarını baskılayarak oluşturabileceğini de düşündürmektedir.

Literatürde RFRP-3 ile ilgili araştırmalar, ağırlıklı olarak üreme ve üreme davranışları ile ilgilidir. Mevcut tez çalışması, RFRP-3 ve GPR147 sinyalleşmesinin erişkin hipokampal nörogenez üzerine etkilerinin incelendiği ilk çalışmadır. Bu çalışma ile ilk kez RFRP-3'ün hipokampal nörogenezi baskıladığı gösterilmiştir. RFRP-3, hipokampal nörogenezi baskılayarak anksiyete benzeri etkileri oluşturmuştur. Hipokampal RFRP-3 sinyalleşmesinin etki mekanizmasına yönelik, RFRP-3'ün hipokampal GnRH ve kisspeptin sinyalleşmesi ile etkileşebileceği düşünülmektedir.

RFRP-3 ve GPR147 sisteminin fizyolojik rollerinin anlaşılmasının, hipokampal fonksiyonlarının ve erişkin nörogenezle etkileşimlerinin

aydınlatılmasının, nöral hasar ve nörodejenerasyona karşı koruyucu mekanizmaların desteklenmesine katkı sağlayabileceği umulmaktadır. Yapılacak detaylı araştırmalarla, astrositlerde hipokampal RFRP-3 ekspresyonunun hipokampal nöroplastisiteyi düzenlemede oynadığı net rol ve GnRH ve kisspeptin sinyalleşmesi ile etkileşimlerinin altında yatan mekanizmalar açıklığa kavuşmayı beklemektedir.



5. KAYNAKLAR

1. Abrous, D.N, Koehl, M., Le Moal, M. Adult neurogenesis: from precursors to network and physiology. 2005; *Physiol. Rev.* 85 (2), 523-569.
2. Ageta H, Murayama A, Migishima R, Kida S, Tsuchida K, Yokoyama M et al. Activin in the brain modulates anxiety-related behavior and adult neurogenesis. *PLoS ONE* 2008; 3: e1869.
3. Akyazi İ. Ratlarda D-ala², D-leu⁵-Enkaphalin (DADLE)'in nöroprotektif adaptasyona ilişkin bazı parametrelere etkileri. İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Fizyoloji Anabilim Dalı, Doktora tezi, İstanbul, 2005 (Tez Danışmanı: Prof. Dr. Ülker Çötelioglu).
4. Anderson, G.M., Relf, H.L., Rizwan, M.Z., Evans, J.J. Central and peripheral effects of RFamide-related peptide-3 on luteinizing hormone and prolactin secretion in rats. *Endocrinology*. 2009; 150, 1834-1840.
5. Andreatini R, Bacellar LFS. The relationship between anxiety and depression in animal models: a study using the forced swimming test and elevated plus-maze. *Braz J Med Biol Res.* 1999; 32(9): 1121-6.
6. Anjum, S., Krishna, A., Sridaran, R., Tsutsui, K. Localization of gonadotropin-releasing hormone (GnRH), gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH), kisspeptin and GnRH receptor and their possible roles in testicular activities from birth to senescence in mice. *J. Exp. Zool. A. Ecol. Genet. Physiol.* 2012; 317, 630-644.
7. Bailey ve Crawley. Anxiety-Related Behaviors in Mice. NCBI Bookshelf. A service of the National Library of Medicine, National Institutes of Health. Buccafusco JJ, editor. *Methods of Behavior Analysis in Neuroscience*. 2nd edition. Boca Raton (FL): CRC Press; 2009.
8. Barnett, D.K., Bunnell, T.M., Millar, R.P., Abbott, D.H. Gonadotropin-releasing hormone II stimulates female sexual behavior in marmoset monkeys. *Endocrinology*. 2006; 147, 615-623.
9. Bekinschtein P, Oomen CA, Saksida LM, Bussey TJ. Effects of environmental enrichment and voluntary exercise on neurogenesis, learning and memory, and pattern separation: BDNF as a critical variable? *Semin Cell Dev Biol.* 2011 Jul;22(5):536-42.
10. Bentley, G.E., Perfito, N., Ukena, K., Tsutsui, K., Wingfield, J.C. Gonadotropin-inhibitory peptide in song sparrows (*Melospiza melodia*) in different reproductive conditions, and in house sparrows (*Passer domesticus*) relative to chicken-gonadotropin-releasing hormone. *J. Neuroendocrinol.* 2003; 15, 794-802.
11. Bently GE, Ubuka T, McGuire NL, Calisi R, Perfito N, Kriegsfeld LJ, et al. Gonadotropin-inhibitory hormone: a multifunctional neuropeptide. *J Neuroendocrinol.* 2009; 21(4):276-81.
12. Bergami M, Rimondini R, Santi S, Blum R, Go^{tz} M, Canossa M. Deletion of TrkB in adult progenitors alters newborn neuron integration into hippocampal circuits and increases anxiety-like behavior. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105:15570–15575
13. Bonaguidi MA, Wheeler MA, Shapiro JS, Stadel RP, Sun GJ, Ming GL, Song H. In vivo clonal analysis reveals self-renewing and multipotent adult neural stem cell characteristics. 2001. *Cell.* 24;145(7):1142-55.
14. Braun SM, Jessberger S. Adult neurogenesis: mechanisms and functional significance. *Development.* 2014; 141(10):1983-6.
15. Brunton PJ. Effects of maternal exposure to social stress during pregnancy: consequences for mother and offspring. *Reproduction.* 2013 Oct 1;146(5):R175-89.
16. Cameron HA, Glover LR. Adult neurogenesis: beyond learning and memory. *Annu Rev Psychol.* 2015 Jan 3;66:53-81.
17. Campos AC, Fogaça MV, Aguiar DC, Guimaraes FS. Animal models of anxiety disorders and stress. *Rev Bras Psiquiatr.* 2013; 35 Suppl 2:S101-11.
18. Christian KM, Song H, Ming GL. Functions and dysfunctions of adult hippocampal neurogenesis. *Annu Rev Neurosci.* 2014; 37:243-62.
19. Christie KJ, Turbic A, Turnley AM. Adult hippocampal neurogenesis, Rho kinase inhibition and enhancement of neuronal survival. *Neuroscience.* 2013 Sep 5;247:75-83.
20. Clarke LE, Barres BA. Emerging roles of astrocytes in neural circuit development. *Nat Rev. Neurosci.* 2013 May;14(5):311-21.
21. Deng W, Aimone JB, Gage FH. New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory. *Nat Rev Neurosci* 2010; 11(5):339-50.
22. DeCarolis NA, Eisch AJ. 2010 Hippocampal neurogenesis as a target for the treatment of mental illness: A critical evaluation. *Neuropharmacology.* 58(6):884-93.
23. Dias GP, Cavegn N, Nix A, do Nascimento Bevilacqua MC, Stangl D, Zainuddin MS, Nardi AE, Gardino PF, Thuret S. The role of dietary polyphenols on adult hippocampal neurogenesis: molecular mechanisms and behavioural effects on depression and anxiety. *Oxid Med Cell Longev.* 2012; 2012:541971.
24. Duan X, Kang E, Liu CY, Ming G, Song H. Development of neural stem cell in the adult brain. *Curr Opin Neurobiol.* 2008; 18(1):108-115.
25. Ducret E, Anderson GM, Herbison AE. RFamide-related peptide-3, a mammalian gonadotropin-inhibitory hormone ortholog, regulates gonadotropin-releasing hormone neuron firing in the mouse. *Endocrinology* 2009; 150:2799-804.
26. Ehninger D, Kempermann G. Neurogenesis in the adult hippocampus. *Cell Tissue Res.* 2008; 331:243-250.
27. Eisch, A.J., Cameron, H.A., Encinas, J.M., Meltzer, L.A., Ming, G.L., Overstreet-Wadiche, L.S. Adult neurogenesis, mental health, and mental illness: hope or hype? *J. Neurosci.* 2008; 28 (46), 11785:11791.
28. Eriksson PS, Perfilieva E, Björk-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med.* 1998; 4(11):1313-7
29. Ferris JK, Tse MT, Hamson DK, Taves MD, Ma C, McGuire N, Arckens L, Bently GE, Galea LA, Floresco SB, Soma KK. Neuronal gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and astrocytic gonadotropin inhibitory hormone (GnIH) immunoreactivity in the adult rat hippocampus. *J Neuroendocrinol.* 2015; 27(10):772-86.
30. Fu LY, van den Pol AN. Kisspeptin directly excites anorexigenic proopiomelanocortin neurons but inhibits orexigenic neuropeptide Y cells by an indirect synaptic mechanism. *J Neurosci.* 2010 Jul 28; 30(30):10205-19.
31. Ge S, Yang CH, Hsu KS, Ming GL, Song H. A critical period for enhanced synaptic plasticity in newly generated neurons of the adult brain. *Neuron.* 2007; 54:559–566.
32. Ge S, Sailor KA, Ming GL, Song H. Synaptic integration and plasticity of new neurons in the adult hippocampus. *J Physiol.* 2008 Aug 15;586(16):3759-65.

33. Gibson EM, Humber SA, Jain S, Williams WP 3rd, Zhao S, Bentley GE, Tsutsui K, Kriegsfeld, LJ. Alterations in RFamide-related peptide expression are coordinated with the preovulatory luteinizing hormone surge. *Endocrinology*. 2008; 149, 4958-4969.
34. Glanowska KM, Burger LL, Moenter SM. Development of gonadotropin releasing hormone secretion and pituitary response. *J. Neurosci*. 2014; 34, 15060-15069.
35. Gojska NM., Belsham DD. Glucocorticoid receptor-mediated regulation of Rfrp (GnIH) and Gpr147 (GnIH-R) synthesis in immortalized hypothalamic neurons. *Mol. Cell. Endocrinol*. 2014; 384, 23-31.
36. Gould E, Cameron HA, Daniels DC, Woolley CS, and McEwen BS. Adrenal hormones suppress cell division in the adult rat dentate gyrus. *J. Neurosci*. 1992; 12, 3642-3650.
37. Gould E, Tanapat P, Rydel T, Hastings N. Regulation of hippocampal neurogenesis in adulthood. *Biol Psychiatry*. 2000; 48:715-720.
38. Grote HE, Hannan AJ. Regulators of adult neurogenesis in the healthy and diseased brain. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2007; 34(5-6):533-45.
39. Hinuma S, Shintani Y, Fukusumi S, Iijima N, Matsumoto Y, Hosoya M, Fujii R, Watanabe T, Kikuchi K, Terao Y, Yano T, Yamamoto T, Kawamata Y, Habata Y, Asada M, Kitada C, Kurokawa T, Onda, H, Nishimura O, Tanaka M, Ibata Y, Fujino M, New neuropeptides containing carboxy-terminal RFamide and their receptor in mammals. *Nat. Cell. Biol*. 2000; 2, 703-708.
40. Ikemoto T, Park MK. Chicken RFamide-related peptide (GnIH) and two distinct receptor subtypes: identification, molecular characterization, and evolutionary considerations. *J. Reprod. Dev*. 2005; 51, 359-377.
41. Iwasa T, Matsuzaki T, Murakami M, Kinouchi R, Osugi T, Gereltsetseg G, Yoshida S, Irahara M, Tsutsui K. Developmental changes in the mammalian gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH) ortholog RFamide-related peptide (RFRP) and its cognate receptor GPR147 in the rat hypothalamus. *Int. J. Dev. Neurosci*. 2012; 30, 31-37.
42. Iwasa T, Matsuzaki T, Tungalagsuvd A, Munkhzaya M, Kawami T, Niki H, Kato T, Kuwahara A, Uemura, H, Yasui T, Irahara M. Hypothalamic Kiss1 and RFRP gene expressions are changed by a high dose of lipopolysaccharide in female rats. *Horm. Behav*. 2014; 66, 309-316.
43. Jacobi JS, Coleman HA, Enriori PJ, Parkington HC, Li Q, Pereira A, Cowley MA, Clarke IJ. Paradoxical effect of gonadotropin-inhibiting hormone to negatively regulate neuropeptide Y neurons in mouse arcuate nucleus. *J. Neuroendocrinol*. 2013; 25, 1308-1317.
44. Jin K, Galvan V. Endogenous neural stem cells in the adult brain. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2007; 2(3):236-42.
45. Johnson, M.A., Tsutsui, K., Fraley, G.S. Rat RFamide-related peptide-3 stimulates GH secretion, inhibits LH secretion, and has variable effects on sex behavior in the adult male rat. *Horm. Behav*. 2007; 51, 171-180.
46. Jørgensen, S.R., Andersen, M.D., Overgaard, A., Mikkelsen, J.D. Changes in RFamide-related peptide-1 (RFRP-1)-immunoreactivity during postnatal development and the estrous cycle. *Endocrinology*. 2014; 155, 4402-4410.
47. Kaewwongse, M., Takayanagi, Y., Onaka, T. Effects of RFamide-related peptide (RFRP)-1 and RFRP-3 on oxytocin release and anxiety-related behaviour in rats. *J. Neuroendocrinol*. 2011; 23, 20-27.
48. Kalueff AV, Tuohimaa P. The grooming analysis algorithm discriminates between different levels of anxiety in rats: potential utility for neurobehavioural stress research. *J Neurosci Methods* 2005; 143:169-177.
49. Kempermann G, Song H, Gage FH. Neurogenesis in the adult hippocampus. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2015; 1:7(9).
50. Kheirbek MA, Klemenhagen KC, Sahay A, Hen R. Neurogenesis and generalization: a new approach to stratify and treat anxiety disorders. *Nat Neurosci*. 2012; 15(12):1613-20.
51. Kim JS, Brownjohn PW, Dyer BS, Beltramo M, Walker CS, Hay DL, Painter GF, Tyndall JD, Anderson GM. Anxiogenic and stressor effects of the hypothalamic neuropeptide RFRP-3 are overcome by the NPFFR antagonist GJ14. *Endocrinology*. 2015; 156(11):4152-62.
52. Kim S, Kim S, Khalid A, Jeong Y, Jeong B, Lee ST, Jung KH, Chu K, Lee SK, Jeon D. Rhythmical Photic Stimulation at Alpha Frequencies Produces Antidepressant-Like Effects in a Mouse Model of Depression. *Plos One*. 2016; 11(1):e0145374.
53. Kirby, E.D., Geraghty, A.C., Ubuka, T., Bentley, G.E., Kaufer, D. Stress increases putative gonadotropin inhibitory hormone and decreases luteinizing hormone in male rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 2009; 106, 11324-11329.
54. Kovács, A., László, K., Gálosi, R., Ollmann, T., Péczely, L., Zagoracz, O., Bencze, N., Lénárd, L. Intraamygdaloid microinjection of RFamide-related peptide-3 decreases food intake in rats. *Brain. Res. Bull*. 2014; 107, 61-68.
55. Kriegsfeld LJ, Mei DF, Bentley GE, Ubuka T, Mason AO, Inoue K, et al. Identification and characterization of a gonadotropin-inhibitory system in the brain of mammals. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103(7):25410-5.
56. Küçük A, Gölgeli A. Deney hayvanlarında anksiyete modelleri ve anksiyetenin değerlendirilmesi. *Sağlık Bilimleri Dergisi*. 2005; 14(3):209-17.
57. Lee DK, Nguyen T, O'Neill GP, Cheng R, Liu Y, Howard D. Discovery of a receptor related to the galanin receptors. *FEBS Lett*. 1999; 446: 103-7.
58. Liu S, Wang J, Zhu D, Fu Y, Lukowiak K, and Lu YM. Generation of functional inhibitory neurons in the adult rat hippocampus. *J Neurosci* 2003; 23: 732-736.
59. Liu Y, Namba T, Liu J, Suzuki R, Shioda S, Seki T. Glial fibrillary acidic protein-expressing neural progenitors give rise to immature neurons via early intermediate progenitors expressing both glial fibrillary acidic protein and neuronal markers in the adult hippocampus. *Neuroscience* 2010; 166(1):241-51.
60. Liu L, Diaz Brinto D. Gonadal Hormones, Neurosteroids, and Clinical Progestins as Neurogenic Regenerative Agents: Therapeutic Implications. In: Mellon, AGaS, editor. *Hormones in Neurodegeneration, Neuroprotection and Neurogenesis*. Weinheim, Germany: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co; 2011. p. 281-303
61. Liu X, Herbison AE. RF9 excitation of GnRH neurons is dependent upon Kiss1r in the adult male and female mouse. *Endocrinology*. 2014;155:4915-4924.
62. Marques AA, Bevilaqua MC, da Fonseca AM, Nardi AE, Thuret S, Dias GP. Gender Differences in the Neurobiology of Anxiety: Focus on Adult Hippocampal Neurogenesis. *Neural Plast*. 2016; 2016:5026713.
63. Milner LC, Crabbe JC (2008) Three murine anxiety models: results from multiple inbred strain comparisons. *Genes Brain Behav* 7:496-505

64. Min L, Leon S, Li H, Pinilla L, Carroll RS, Tena-Sempere M, Kaiser UB. RF9 acts as a Kiss1R agonist in vivo and in vitro. *Endocrinology*. 2015; 156(12):4639-48.
65. Mineur YS, Obayemi A, Wigstrand MB, Fote GM, Calarco CA, Li AM, Picciotto MR. Cholinergic signaling in the hippocampus regulates social stress resilience and anxiety and depression like behavior. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013; 110(9):357-8.
66. Ming GL, Song H. 2011. Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions. *Neuron*. 70(4):687-702.
67. Molnár, C.S., Kalló, I., Liposits, Z., Hrabovszky, E., 2011. Estradiol down-regulates RF-amide-related peptide (RFRP) expression in the mouse hypothalamus. *Endocrinology*. 152, 1684-1690.
68. Murai K, Qu Q, Sun G, Ye P, Li W, Asuélime G, Sun E, Tsai GE, Shi Y. Nuclear receptors TLX stimulates hippocampal neurogenesis and enhances learning and memory in a transgenic mouse model. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014; 111(25):9115-20.
69. Murakami, M., Matsuzaki, T., Iwasa, T., Yasui, T., Irahara, M., Osugi, T., Tsutsui, K., 2008. Hypophysiotropic role of RFamide-related peptide-3 in the inhibition of LH secretion in female rats. *J. Endocrinol.* 199, 105-112.
70. Nargund, V.H., 2015. Effects of psychological stress on male fertility. *Nat. Rev. Urol.* 12, 373-382.
71. O'Leary TP, Gunn RK, Brown RE. What are we measuring when we test strain differences in anxiety in mice? *Behav Genet.* 2013 Jan;43(1):34-50.
72. Oishi, H., Klausen, C., Bentley, G.E., Osugi, T., Tsutsui, K., Gilks, C.B., Yano, T., Leung, P.C., 2012. The human gonadotropin-inhibitory hormone ortholog RFamide-related peptide-3 suppresses gonadotropin-induced progesterone production in human granulosa cells. *Endocrinology*. 153, 3435-3445.
73. Osugi, T., Ukena, K., Bentley, G.E., O'Brien, S., Moore, I.T., Wingfield, J.C., Tsutsui, K., 2004. Gonadotropin-inhibitory hormone in Gambel's white-crowned sparrow (*Zonotrichia leucophrys gambelii*): cDNA identification, transcript localization and functional effects in laboratory and field experiments. *J. Endocrinol.* 182, 33-42.
74. Osugi, T., Son, Y.L., Ubuka, T., Satake, H., Tsutsui, K., 2015. RFamide peptides in agnathans and basal chordates. *Gen. Comp. Endocrinol.* In press. doi: 10.1016/j.ygcen.2015.06.012.
75. Palanza P. Animal models of anxiety and depression: how are females different? *Neurosci Biobehav Rev.* 2001; 25(3):219-33.
76. Paxinos G, Watson C: (1998) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates* 6th Edition, New York: Academic Press.
77. Perera, T.D., Park, S., Nemirovskaya, Y., 2008. Cognitive role of neurogenesis in depression and antidepressant treatment. *Neuroscientist* 14 (4), 326:338.
78. Petrik D, Lagace DC, Eisch AJ. The neurogenesis hypothesis of affective and anxiety disorders: are we mistaking the scaffolding for the building? *Neuropharmacology*. 2012; 62(1):21-34.
79. Piekarski, D.J., Zhao, S., Jennings, K.J., Iwasa, T., Legan, S.J., Mikkelsen, J.D., Tsutsui, K., Kriegsfeld, L.J., 2013. Gonadotropin-inhibitory hormone reduces sexual motivation but not lordosis behavior in female Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*). *Horm. Behav.* 64, 501-510.
80. Pineda, R., Garcia-Galiano, D., Sanchez-Garrido, M.A., Romero, M., Ruiz-Pino, F., Aguilar, E., Dijcks, F.A., Blumenröhr, M., Pinilla, L., van Noort, P.I., Tena-Sempere, M., 2010a. Characterization of the inhibitory roles of RFRP3, the mammalian ortholog of GnIH, in the control of gonadotropin secretion in the rat: *in vivo* and *in vitro* studies. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 299, E39-46.
81. Pineda, R., Garcia-Galiano, D., Sanchez-Garrido, M.A., Romero, M., Ruiz-Pino, F., Aguilar, E., Dijcks, F.A., Blumenröhr, M., Pinilla, L., van Noort, P.I., Tena-Sempere, M., 2010b. Characterization of the potent gonadotropin-releasing activity of RF9, a selective antagonist of RF-amide-related peptides and neuropeptide FF receptors: physiological and pharmacological implications. *Endocrinology*. 151, 1902-1913.
82. Poling MC, Kauffman AS. Regulation and function of RFRP-3 (GnIH) neurons during postnatal development. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2015;6:150.
83. Price, D.A., Greenberg, M.J., 1977. Structure of a molluscan cardioexcitatory neuropeptide. *Science*. 197, 670-671.
84. Prut L, Belzung C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: A review. *European Journal of Pharmacology*. 2003;463 (1-3):3-33.
85. Qi, Y., Oldfield, B.J., Clarke, I.J., 2009. Projections of RFamide-related peptide-3 neurones in the ovine hypothalamus, with special reference to regions regulating energy balance and reproduction. *J. Neuroendocrinol.* 21, 690-697.
86. Quennell, J.H., Rizwan, M.Z., Relf, H.L., Anderson, G.M., 2010. Developmental and steroidogenic effects on the gene expression of RFamide related peptides and their receptor in the rat brain and pituitary gland. *J. Neuroendocrinol.* 22, 309-316.
87. Raffa, R.B., 1988. The action of FMRFamide (Phe-Met-Arg-Phe-NH₂) and related peptides on mammals. *Peptides* 9, 915-922.
88. Rastogi, R.K., D'Aniello, B., Pinelli, C., Fiorentino, M., Di Fiore, M.M., Di Meglio, M., Iela, L., 2001. FMRFamide in the amphibian brain: a comprehensive survey. *Microsc. Res. Technol.* 54, 158-172.
89. Revest JM, Dupret D, Koehl M, Funk-Reiter C, Grosjean N, Piazza PV, Abrous DN. Adult hippocampal neurogenesis is involved in anxiety-related behaviors. *Mol Psychiatry*. 2009; 14(10):959-67.
90. Rizwan, M.Z., Porteous, R., Herbison, A.E., Anderson, G.M., 2009. Cells expressing RFamide-related peptide-1/3, the mammalian gonadotropin-inhibitory hormone orthologs, are not hypophysiotropic neuroendocrine neurons in the rat. *Endocrinology*. 150, 1413-1420.
91. Rizwan MZ, Poling MC, Corr M, Augustine RA, Quennell JH, Kauffman AS, Anderson GM. RFamide related peptide-3 receptor gene expression in GnRH and kisspeptin neurons and GnRH-dependent mechanism of action. *Endocrinology*. 2012; 153(8):3770-9.
92. Rizwan, M.Z., Harbid, A.A., Inglis, M.A., Quennell, J.H., Anderson, G.M., 2014. Evidence that hypothalamic RFamide related peptide-3 neurones are not leptin responsive in mice and rats. *J. Neuroendocrinol.* 26, 247-257.
93. Russo, K.A., La, J.L., Stephens, S.B., Poling, M.C., Padgaonkar, N.A., Jennings, K.J., Piekarski, D.J., Kauffman, A.S., Kriegsfeld, L.J., 2015. Circadian control of the female reproductive axis through gated responsiveness of the RFRP-3 system to VIP signaling. *Endocrinology*. en20141762.

94. Sahay A, Scobie KN, Hill AS, O'Carroll CM, Kheirbek MA, Burghardt NS, Fenton AA, Dranovsky A, Hen R. Increasing adult hippocampal neurogenesis is sufficient to improve pattern separation. *Nature*. 2011; 472(7344):466-70.
95. Sahay, A., Hen, R., 2007. Adult hippocampal neurogenesis in depression. *Nat. Neurosci.* 10 (9), 1110:1115.
96. Sahin Z, Canpolat S, Ozcan M, Ozgocer T, Kelestimur H. Kisspeptin antagonist prevents RF9-induced reproductive changes in female rats. *Reproduction*. 2015; 149(5):465-73.
97. Sakharkar AJ, Vetreno RP, Zhang H, Kokare DM, Crews FT, Pandey SC. A role for histone acetylation mechanisms in adolescent alcohol exposure-induced deficits in hippocampal brain-derived neurotrophic factor expression and neurogenesis markers in adulthood. *Brain Struct Funct*. 2016;Mar 3.
98. Salehi, M.S., Jafarzadeh Shirazi, M.R., Zamiri, M.J., Pazhoohi, F., Namavar, M.R., Niazi, A., Ramezani, A., Tanideh, N., Tamadon, A., Zarei, A., 2013. Hypothalamic expression of KiSS1 and RFamide-related peptide-3 mRNAs during the estrous cycle of rats. *Int. J. Fertil. Steril.* 6, 304-309.
99. Sarro EC, Sullivan RM, Barr G. Unpredictable neonatal stress enhances adult anxiety and alters amygdala gene expression related to serotonin and GABA. *Neuroscience*. 2014; 258:147-61.
100. Satake, H., Hisada, M., Kawada, T., Minakata, H., Ukena, K., Tsutsui, K., 2001. Characterization of a cDNA encoding a novel avian hypothalamic neuropeptide exerting an inhibitory effect on gonadotropin release. *Biochem. J.* 354, 379-385.
101. Schloesser RJ, Manji HK, Martinowich K. Suppression of Adult Neurogenesis Leads to an Increased HPA Axis Response. *Neuroreport*. 2009;20(6):553-557.
102. Semaan, S.J, Kauffman, A.S., 2015. Daily successive changes in reproductive gene expression and neuronal activation in the brains of pubertal female mice. *Mol. Cell. Endocrinol.* 401, 84-97.
103. Seri B, Garcia-Verdugo JM, McEwen BS, Alvarez-Buylla A. Astrocytes Give Rise to New Neurons in the Adult Mammalian Hippocampus. *J Neurosci.* 2002;21(18):7153-60
104. Sethi, S., Tsutsui, K., Chaturvedi, CM., 2010. Temporal phase relation of circadian neural oscillations alters RFamide-related peptide-3 and testicular function in the mouse. *Neuroendocrinology.* 91,189-199.
105. Shapiro LA, Korn MJ, Shan Z, Ribak CE. GFAP-expressing radial glia-like cell bodies are involved in a one-to-one relationship with doublecortin-immunolabeled newborn neurons in the adult dentate gyrus. 2005. *Brain Res* 1040: 81-91.
106. Simonin F, Schmitt M, Laulin JP, Laboureyras E, Jhamandas JH, MacTavish D, Matifas A, Mollereau C, Laurent P, Parmentier M, Kieffer BL, Bourguignon JJ, Simonnet G. RF9, a potent and selective neuropeptide FF receptor antagonist, prevents opioid-induced tolerance associated with hyperalgesia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2006; 103: 466-471.
107. Singh, P., Krishna, A., Sridaran, R., Tsutsui, K., 2011a. Immunohistochemical localization of GnRH and RFamide-related peptide-3 in the ovaries of mice during the estrous cycle. *J. Mol. Histol.* 42, 371-381.
108. Smith, J.T., Shahab, M., Pereira, A., Pau, K.Y., Clarke, I.J., 2010. Hypothalamic expression of KiSS1 and gonadotropin inhibitory hormone genes during the menstrual cycle of a non-human primate. *Biol. Reprod.* 83, 568-577.
109. Soga, T., Dalpatadu, S.L., Wong, D.W., Parhar, I.S., 2012. Neonatal dexamethasone exposure down-regulates GnRH expression through the GnIH pathway in female mice. *Neuroscience.* 218, 56-64.
110. Soga, T., Kitahashi, T., Clarke, I.J., Parhar, I.S., 2014. Gonadotropin-inhibitory hormone promoter-driven enhanced green fluorescent protein expression decreases during aging in female rats. *Endocrinology.* 155, 1944-1955.
111. Son YL, Ubuka T, Millar RP, Kanasaki H, Tsutsui K. Gonadotropin-inhibitory hormone inhibits GnRH-induced gonadotropin subunit gene transcriptions by inhibiting AC/cAMP/PKA-dependent ERK pathway in LβT2 cells. *Endocrinology.* 2012; 153(5):2332-43.
112. Son, Y.L., Ubuka, T., Narihiro, M., Fukuda, Y., Hasunuma, I., Yamamoto, K., Belsham, D.D., Tsutsui, K., 2014. Molecular basis for the activation of gonadotropin-inhibitory hormone gene transcription by corticosterone. *Endocrinology.* 155, 1817-1826.
113. Stuchlik A. Dynamic learning and memory, synaptic plasticity and neurogenesis: an update. *Front Behav Neurosci.* 2014 Apr 1;8:106
114. Taylor CJ, Jhaveri DJ, Barlett PF. The therapeutic potential of endogenous hippocampal stem cells for the treatment of neurological disorders. *Front Cell Neurosci.* 2013 Jan 28;7:5.
115. Tchekalarova J, Nenchovska Z, Atanasova m, Kortenska L, Stefanova M, Alova L, Lazarov N. Consequences of long-term treatment with agomelatine on depressive-like behavior and neurobiological abnormalities in pinealectomized rats. *Behav Brain Res.* 2016 Apr 1;302:11-28.
116. Theeuwes F. *Delivery of Active Agents by Osmosis, Controlled Release Technologies: Methods, Theory, and Applications*, (Kydonieus, A. Ed.) , CRC press, 195-205. (1980)
117. Toni N, Teng EM, Bushong EA, Aimone JB, Zhao C, Consiglio A, Praag H van, Martone ME, Ellisman MH, Gage FH (2007) Synapse formation on neurons born in the adult hippocampus. *Nat Neurosci* 10:727-734
118. Tsutsui K, Saigoh E, Ukena K, Teranishi H, Fujisawa Y, Kikuchi M. A novel avian hypothalamic peptide inhibiting gonadotropin release. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000; 275(2): 661-7.
119. Tsutsui K. How to contribute to the progress of neuroendocrinology: New insights from discovering novel neuropeptides and neurosteroids regulating pituitary and brain functions. *Gen Comp Endocrinol.* 2015;(15)00180.
120. Tsutsui K, Ubuka T. Breakthrough in neuroendocrinology by discovering novel neuropeptides and neurosteroids: 1. Discovery of gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH) acrossvertebrates. *Gen Comp Endocrinol.* 2014;205:4-10.
121. Ubuka, T., Kim, S., Huang, Y.C., Reid, J., Jiang, J., Osugi, T., Chowdhury, V.S., Tsutsui, K., Bentley, G.E., 2008. Gonadotropin-inhibitory hormone neurons interact directly with gonadotropin-releasing hormone-I and -II neurons in European starling brain. *Endocrinology.* 149, 268-278. Erratum in: *Endocrinology.* 2008. 149, 4229.
122. Ubuka T, Morgan K, Pawson AJ, Osugi T, Chowdhury VS, Minakata H, et al. Identification of human GnIH homologs, RFRP-1 and RFRP-3, and the cognate receptor, GPR147 in the human hypothalamic pituitary axis. *Plos one.* 2009;4(12):8400.

123. Ubuka, T., Inoue, K., Fukuda, Y., Mizuno, T., Ukena, K., Kriegsfeld, L.J., Tsutsui, K., 2012a. Identification, expression, and physiological functions of Siberian hamster gonadotropin-inhibitory hormone. *Endocrinology*. 153, 373-385.
124. Ubuka T, Son YL, Tsutsui K. Molecular, cellular, morphological, physiological and behavioral aspects of gonadotropin-inhibitory hormone. *Gen Comp Endocrinol*. 2015;6480(15)00252.
125. Ubuka T, Son YL, Tsutsui K. Molecular, cellular, morphological, physiological and behavioral aspects of gonadotropin-inhibitory hormone. *Gen Comp Endocrinol*. 2016 Feb 1;227:27-50
126. Ubuka, T., Tsutsui, K., 2014. Evolution of gonadotropin-inhibitory hormone receptor and its ligand. *Gen. Comp. Endocrinol*. 209, 148-161
127. Ukena, K., Iwakoshi, E., Minakata, H., Tsutsui, K., 2002. A novel rat hypothalamic RFamide-related peptide identified by immunoaffinity chromatography and mass spectrometry. *FEBS. Lett*. 512, 255-258.
128. Ukena, K., Ubuka, T., Tsutsui, K., 2003b. Distribution of a novel avian gonadotropin-inhibitory hormone in the quail brain. *Cell. Tissue. Res*. 312, 73-79.
129. Vivar C, Potter MC, van Praag H. All About Running: Synaptic Plasticity, Growth Factors and Adult Hippocampal Neurogenesis. *Curr Top Behav Neurosci*. 2013 ; 15: 189–210.
130. von Bohlen ve Halbach O. 2011. Immunohistological markers for proliferative events, gliogenesis, and neurogenesis within the adult hippocampus. *Cell Tissue Res*. 345:1-19.
131. Winner B, Winkler J. Adult Neurogenesis in Neurodegenerative Diseases *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2015 Apr 1;7(4):a021287..
132. Xiang, W., Zhang, B., Lv, F., Ma, Y., Chen, H., Chen, L., Yang, F., Wang, P., Chu, M., 2015. The inhibitory effects of RFamide-related peptide 3 on luteinizing hormone release involves an estradiol-dependent manner in prepubertal but not in adult female mice. *Biol. Reprod*. In press. pii: biolreprod.115.128777.
133. Xu XF, Li T, Wang DD, Chen B, Wang Y, Chen ZY. Integrin-linked kinase is essential for environmental enrichment enhanced hippocampal neurogenesis and memory. *Sci Rep*. 2015;5:11456.
134. Yamagishi S, Yamada K, Sawada M, Nakano S, Mori N, Sawamoto K, Sato K. Netrin-5 is highly expressed in neurogenic regions of the adult brain. *Front Cell Neurosci*. 2015;9:146.
135. Yano, T., Iijima, N., Hinuma, S., Tanaka, M., Ibata, Y., 2004. Developmental expression of RFamide-related peptides in the rat central nervous system. *Brain. Res. Dev. Brain. Res*. 152, 109-120.
136. Yano, T., Iijima, N., Kakihara, K., Hinuma, S., Tanaka, M., Ibata, Y., 2003. Localization and neuronal response of RFamide related peptides in the rat central nervous system. *Brain. Res*. 982, 156-167.
137. Yin, H., Ukena, K., Ubuka, T., Tsutsui, K., 2005. A novel G protein-coupled receptor for gonadotropin-inhibitory hormone in the Japanese quail (*Coturnix japonica*): identification, expression and binding activity. *J. Endocrinol*. 184, 257-266.
138. Zhao C, Deng W, Gage FH. Mechanisms and Functional Implications of Adult Neurogenesis. *Cell*. 2008 Feb 22;132(4):645-60.
139. Zheng, L., Su, J., Fang, R., Jin, M., Lei, Z., Hou, Y., Ma, Z., Guo, T., 2015. Developmental changes in the role of gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH) and its receptors in the reproductive axis of male Xiaomeishan pigs. *Anim. Reprod. Sci*. 154, 113-120.

6. ÖZGEÇMİŞ

1987 yılında İzmir’de doğdum. İlköğretim ve lise eğitimimi aynı şehirde tamamladım. 2009 yılında Pamukkale Üniversitesi Biyoloji Bölümünden mezun oldum. 2014 yılında Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Fizyoloji Bölümü ÖYP (Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı) araştırma görevlisi kadrosuna atandım. Yüksek lisans öğrencisi olarak devam etmekteyim.

