



**TOFİSOPAM'IN SKOPOLAMİN İLE AMNEZİ  
OLUŞTURULMUŞ SIÇANLARIN KOGNİTİF  
PARAMETRELERİ VE HİPOKAMPAL  
MORFOLOJİLERİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**Doktora Tezi**

**Umut İrfan ÜÇEL**

**Eskişehir 2018**

**TOFİSOPAM'IN SKOPOLAMİN İLE AMNEZİ OLUŞTURULMUŞ  
SIÇANLARIN KOGNİTİF PARAMETRELERİ VE HİPOKAMPAL  
MORFOLOJİLERİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

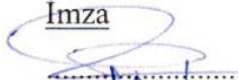

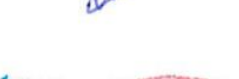
**Umut İrfan ÜÇEL**

**Doktora Tezi**  
**Farmakoloji Anabilim Dalı**  
**Danışman: Doç. Dr. Özgür Devrim CAN**

**Eskişehir**  
**Anadolu Üniversitesi**  
**Sağlık Bilimleri Enstitüsü**  
**Ocak 2018**

## JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Umut İrfan ÜÇEL'in "Tofisopam'ın Skopolamin ile Amnezi Oluşturulmuş Sıçanların Kognitif Parametreleri ve Hippokampal Morfolojileri Üzerine Etkilerinin Araştırılması" başlıklı tezi 05/01/2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği"nin ilgili maddeleri uyarınca, Farmakoloji Anabilim dalında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

	<u>Unvanı-Adı Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Üye (Tez Danışmanı) :	Doç. Dr. Özgür Devrim CAN	
Üye :	Prof. Dr. Yusuf ÖZTÜRK	
Üye :	Prof. Dr. Emel ULUPINAR	
Üye :	Prof. Dr. Başar SIRMAGÜL	
Üye :	Doç. Dr. Ümide DEMİR ÖZKAY	

  
Prof. Dr. Nalan GÜNDOĞDU KARABURUN  
Enstitü Müdürü



## ÖZET

# TOFİSOPAM'IN SKOPOLAMİN İLE AMNEZİ OLUŞTURULMUŞ SIÇANLARIN KOGNİTİF PARAMETRELERİ VE HİPOKAMPAL MORFOLOJİLERİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Umut İrfan ÜÇEL

Farmakoloji Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ocak 2018

Danışman: Doç. Dr. Özgür Devrim CAN

Bu tez çalışmasında, 2,3-benzodiazepin türevi anksiyolitik bir ilaç olan tofisopam'ın bilişsel bozuklukları tedavi etme potansiyeli, skopolamin ile amnezi indüklenmiş sıçanlar kullanılarak araştırılmıştır. Sıçanların bilişsel performansları Morris su labirenti ve pasif sakinme yöntemleriyle; motor aktivitelerindeki değişimler aktivite kafesi ve Rota-rod testleriyle ve hipokampuslarındaki morfolojik değişiklikler ise çeşitli immunohistokimyasal yöntemlerle araştırılmıştır. Elde edilen bulgular, skopolamin uygulamasının sıçanların öğrenme ve bellek parametrelerini bozduğuna işaret etmiştir. Bilişsel performanstaki zayıflamaya hipokampal sinaptofizin, Ki-67 ve GFAP dansitelerinde azalmalar ve ani nöron kayıpları eşlik etmiştir. Tofisopam'ın 50 mg/kg dozda 7 gün süre ile uygulanması amnezik sıçanların bozulmuş olan bilişsel performanslarını artırmış; hipokampusta zayıflamış olan sinaptik transmisyonu güçlendirmiş, subgranüler alanlarda proliferasyonu artırmış ve astroglial geri çekilmeyi önemli oranda düzeltmiştir. Tofisopam'ın anti-amnezik etki potansiyeli ve hipokampal sinaptogenez, nörogenez ve glial plastisite üzerindeki yararlı etkileri bu çalışma ile ilk kez ortaya konulmuştur. Klasik 1,4-benzodiazepinlerin en önemli yan etkilerinden birinin amnezi olduğu göz önünde bulundurulduğunda, anksiyolitik bir ilaç olan tofisopam'ın, bilişsel işlevler üzerindeki olumlu etkilerinin klinik açıdan önemi daha iyi anlaşılabilir. Diğer yandan, tofisopam'ın bu prelinik çalışma ile ortaya konulmuş olan anti-amnezik etkisinin iyi tasarlanmış klinik araştırmalar ile doğrulanması gerekmektedir.

**Anahtar Sözcükler:** Amnezi, GFAP, Ki-67, Sinaptofizin, Tofisopam

## ABSTRACT

### INVESTIGATING THE EFFECTS OF TOFISOPAM ON COGNITIVE PARAMETERS AND HIPPOCAMPAL MORPHOLOGIES IN RATS WITH SCOPOLAMINE INDUCED AMNESIA

Umut İrfan ÜÇEL

Department of Pharmacology

Anadolu University, Graduate School of Health Sciences, January 2018

Supervisor: Assoc. Prof. Özgür Devrim CAN

In this thesis study, therapeutic potential of tofisopam, a 2,3-benzodiazepine derivative anxiolytic drug, in the treatment of cognitive disorders, were investigated by using rats with scopolamine induced amnesia. The cognitive performances of the rats were assessed by Morris water maze and passive avoidance methods; alterations in the motor activities were investigated by activity cage and Rota-rod tests, and morphological changes in hippocampus were evaluated by various immunohistochemical methods. Obtained findings indicate that scopolamine administration significantly impairs the learning and memory parameters of rats. The failing of the cognitive performance was accompanied by decreased hippocampal synaptophysin, Ki-67 and GFAP densities, and sudden neuronal loss. Administration of tofisopam at a dose of 50 mg/kg for 7 days increased the impaired cognitive performance of amnesic rats; reinforced the weakened hippocampal synaptic transmission, increased proliferation in the subgranular areas, and improved the astroglial retraction, significantly. The anti-amnesic efficacy potential of tofisopam as well as its beneficial effects on hippocampal synaptogenesis, neurogenesis and glial plasticity were demonstrated for the first time, in this study. Considering that one of the most important side effects of the classical 1,4-benzodiazepines is amnesia, the importance of beneficial effect of anxiolytic drug, tofisopam, on cognitive functions can be better understood clinically. On the other hand, the anti-amnesic activity potential of tofisopam demonstrated by this preclinical study needs to be confirmed by well-designed clinical trials.

**Keywords:** Amnesia, GFAP, Ki-67, Synaptophysin, Tofisopam

## TEŞEKKÜR

Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı'ndaki yüksek lisans ve doktora yıllarımda ihtiyaç duyduğum her an yanımda olan, bilgi, beceri ve insanlığıyla her daim örnek alacağım hocam Doç. Dr. Özgür Devrim CAN'a,

Araştırmamın bütün aşamalarında beni hiç yalnız bırakmayan, karşılaştığım her aksaklıkta deneyimleriyle bana yol gösteren hocam Doç. Dr. Ümide DEMİR ÖZKAY'a,

Doktora tez çalışmam kapsamında gerçekleştirilen immünohistokimyasal analizler için gerekli laboratuvar olanaklarını sunan, bilgi, deneyim ve emeğiyle tezime katkı sağlayan hocam Prof. Dr. Emel ULUPINAR'a,

Tez çalışmam sırasında yardımlarını esirgemeyen Farmakoloji Anabilim Dalı asistanlarından Araş. Gör. Nazlı TURAN ve Araş. Gör. Feyza ALYU'ya,

Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı'nın değerli öğretim üyelerine,

Sevgi ve desteklerini hayatım boyunca benden esirgemeyen aileme,

En içten teşekkürlerimi sunarım.

20/12/2017

## ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalardan bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programıyla” tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara razı olduğumu bildiririm.

  
Umut İrfan ÜÇEL

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
BAŞLIK SAYFASI .....	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI .....	ii
ÖZET .....	iii
ABSTRACT .....	iv
TEŞEKKÜR .....	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ .....	vi
İÇİNDEKİLER .....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	x
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	xv
1. GİRİŞ ve AMAÇ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	4
2.1. Öğrenme ve Bellek .....	4
2.2. Bellek Tipleri .....	4
2.3. Öğrenme ve Bellek Süreçleri ile İlişkili Nöroanatomik Yapılar .....	6
2.3.1. Medial temporal lob ve hipokampus .....	8
2.3.2. Serebellum ve bazal gangliyonlar .....	11
2.3.3. Amigdala .....	12
2.4. Öğrenme ve Bellek ile İlişkili Hücresel ve Moleküler Mekanizmalar. ....	12
2.4.1. Öğrenme ve bellek süreçlerinde rol oynayan nöromediyatör sistemleri .....	12
2.4.1.1. <i>Asetilkolin</i> .....	12
2.4.1.2. <i>Glutamat</i> .....	14
2.4.1.3. <i>Nitrik oksit</i> .....	15
2.4.1.4. <i>GABA</i> .....	15
2.4.1.5. <i>Dopamin</i> .....	16
2.4.1.6. <i>Noradrenalin</i> .....	16
2.4.1.7. <i>Serotonin</i> .....	16
2.4.2. Öğrenme ve bellek süreçlerinde sinaptik plastisitenin rolü ....	17
2.4.2.1. <i>Öğrenme ve bellek süreçlerinde uzun süreli potensiyalizasyonun rolü</i> .....	18



2.4.2.2. Öğrenme ve bellek süreçlerinde uzun süreli depresyonun rolü.....	20
2.4.3. Öğrenme ve bellek süreçlerinde nörotrofik faktörlerin rolü .....	21
2.4.4. Öğrenme ve bellek süreçlerinde nörogenezin rolü .....	22
2.4.5. Öğrenme ve bellek süreçlerinde glia hücrelerinin rolü .....	23
2.5. Deneysel Amnezi Modelleri .....	26
2.6. Tofisopam .....	28
3. GEREÇLER .....	32
3.1. Deney Hayvanları .....	32
3.2. Kullanılan Kimyasal Madde ve İlaçlar .....	32
3.3. Kullanılan Cihazlar .....	33
4. YÖNTEMLER .....	34
4.1. İlaç Uygulamaları .....	34
4.2. Deneysel Amnezi Modelinin Oluşturulması .....	34
4.3. Motor Aktivitenin Değerlendirilmesi .....	35
4.3.1. Aktivite kafesi testi .....	35
4.3.2. Rota-rod testi .....	35
4.4. Öğrenme ve Bellek Parametrelerinin Değerlendirilmesi .....	36
4.4.1. Pasif sakınma testi .....	36
4.4.2. Morris su labirenti testi .....	36
4.5. Doku İşleme ve İmmünohistokimyasal Boyama Protokolü .....	37
4.6. Işık Mikroskopisi ve İmmünoaktivitenin Değerlendirilmesi .....	39
4.7. İstatistiksel Değerlendirme .....	43
5. BULGULAR ve TARTIŞMA .....	44
5.1. Sağlıklı Sıçanlarda Motor Aktivitenin Değerlendirilmesi .....	44
5.1.1. Aktivite kafesi testine ilişkin bulgular .....	44
5.1.2 Rota-rod testine ilişkin bulgular .....	45
5.2. Öğrenme ve Bellek Parametrelerinin Değerlendirilmesi .....	46
5.2.1. Pasif sakınma testine ilişkin bulgular .....	46
5.2.2. Morris su labirenti testine ilişkin bulgular .....	47
5.3. İmmünohistokimyasal İncelemelere İlişkin Bulgular .....	51
5.3.1. Hipokampal formasyona ait bölgelerde sinaptofizin immünoaktivitelerine ilişkin bulgular .....	51

5.3.2. <i>Gyrus dentatus</i> bölgelerinde Ki-67 immünoreaktivitelerine ilişkin bulgular .....	58
5.3.3. Hipokampal formasyona ait bölgelerde birim alanda bulunan nöron sayılarına ilişkin bulgular .....	62
5.3.4. Hipokampal formasyona ait bölgelerde GFAP immünoreaktivitelerine ilişkin bulgular .....	64
6. SONUÇ ve ÖNERİLER .....	73
KAYNAKÇA .....	77
EK-1	
ÖZGEÇMİŞ	



## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. Bellek oluşum basamakları.....	4
Şekil 2.2. Bellek tiplerinin sınıflandırılması.....	5
Şekil 2.3. Bellek tipleri ile ilişkili nöroanatomik yapılar.....	7
Şekil 2.4. Sıçan hipokampusunun koronal kesitinde eksitatör nöral devrelerin gösterimi.....	9
Şekil 2.5. Hipokampus nöral devrelerinin şematik gösterimi.....	10
Şekil 2.6. Serebellar korteksin nöronal devrelerinin şematik gösterimi.....	11
Şekil 2.7. NMDA reseptör organizasyonunun diyagramı.....	14
Şekil 2.8. LTP indüksiyonunun moleküler mekanizması.....	18
Şekil 2.9. Astrositlerin bellek süreçlerine katılımı ile ilişkili potansiyel mekanizmalar.....	24
Şekil 2.10. Tofisopam'ın kimyasal yapısı.....	28
Şekil 4.1. Anti-sinaptofizin antikoru ile immünohistokimyasal boyama işlemi gerçekleştirilmiş sıçan hipokampusunun temsili fotomikrografi (A). CA1-2, CA3 ve DG bölgelerinde birim alana düşen sinaptofizin dansitelerini belirlemek amacıyla sistematik rastgele örnekleme metodu ile fotomikrografları alınan bölgeleri gösteren diyagram (B).....	40
Şekil 4.2. Anti-GFAP antikoru ile immünohistokimyasal boyama işlemi gerçekleştirilmiş sıçan hipokampusunun temsili fotomikrografi (A). CA1-2, CA3 ve DG bölgelerinde birim alana düşen GFAP dansitelerini belirlemek amacıyla sistematik rastgele örnekleme metodu ile fotomikrografları alınan bölgeleri gösteren diyagram (B).....	41
Şekil 4.3. Anti-Ki-67 antikoru ile immünohistokimyasal boyama işlemi gerçekleştirilmiş sıçan hipokampusunun temsili fotomikrografi (A). <i>Gyrus dentatus</i> bölgesinde birim alanda bulunan Ki-67 immünopozitif hücre sayısını belirlemek amacıyla sistematik rastgele örnekleme metodu ile fotomikrografları alınan bölgeleri gösteren diyagram (B).....	42

<b>Şekil 5.1.</b>	50 mg/kg, 100 mg/kg ve 200 mg/kg dozlarda TOF uygulamalarının sıçanların aktivite kafesi testinde ölçülen “yatay hareket sayıları” üzerine etkileri.....	44
<b>Şekil 5.2.</b>	50 mg/kg, 100 mg/kg ve 200 mg/kg dozlarda TOF uygulamalarının sıçanların aktivite kafesi testinde ölçülen “dikey hareket sayıları” üzerine etkileri.....	45
<b>Şekil 5.3.</b>	50 mg/kg, 100 mg/kg ve 200 mg/kg dozlarda TOF uygulamalarının sıçanların Rota-rod testinde ölçülen “düşme süreleri” üzerine etkileri.....	45
<b>Şekil 5.4.</b>	7 gün süreyle her gün düzenli olarak kontrol solüsyonu uygulanan sağlıklı (Kontrol) ve kontrol solüsyonu (SCP+Kontrol), 200 mg/kg PRS (SCP+PRS) veya 50 mg/kg TOF (SCP+TOF) uygulanan amnezik sıçanların pasif sakınma testinde ölçülen karanlık alana geçiş süreleri.....	47
<b>Şekil 5.5.</b>	7 gün süreyle her gün düzenli olarak kontrol solüsyonu uygulanan sağlıklı (Kontrol) ve kontrol solüsyonu (SCP+Kontrol), 200 mg/kg PRS (SCP+PRS) veya 50 mg/kg TOF (SCP+TOF) uygulanan amnezik sıçanların Morris su labirenti testinde ölçülen “platform bulma süreleri”.....	48
<b>Şekil 5.6.</b>	7 gün süreyle her gün düzenli olarak kontrol solüsyonu uygulanan sağlıklı (Kontrol) ve kontrol solüsyonu (SCP+Kontrol), 200 mg/kg PRS (SCP+PRS) veya 50 mg/kg TOF (SCP+TOF) uygulanan amnezik sıçanların Morris su labirenti testinde hedef kadranda geçirdikleri süreler.....	49
<b>Şekil 5.7.</b>	7 gün süreyle her gün düzenli olarak kontrol solüsyonu uygulanan sağlıklı (Kontrol, A) ve kontrol solüsyonu (SCP+Kontrol, B) veya 50 mg/kg TOF (SCP+TOF, C) uygulanan amnezik sıçanların hipokampal DG bölgelerinde sinaptofizin immünoreaktivitelerinin temsili görüntüleri.....	52

<b>Şekil 5.8.</b>	7 gün süreyle her gün düzenli olarak kontrol solüsyonu uygulanan sağlıklı (Kontrol) ve kontrol solüsyonu (SCP+Kontrol) veya 50 mg/kg TOF (SCP+TOF) uygulanan amnezik sıçanların hipokampal DG bölgelerinde birim alana düşen sinaptofizin dansiteleri.....	53
<b>Şekil 5.9.</b>	7 gün süreyle her gün düzenli olarak kontrol solüsyonu uygulanan sağlıklı (Kontrol, A) ve kontrol solüsyonu (SCP+Kontrol, B) veya 50 mg/kg TOF (SCP+TOF, C) uygulanan amnezik sıçanların hipokampal CA1 alt-alanlarında sinaptofizin immünoreaktivitelerinin temsili görüntüleri.....	54
<b>Şekil 5.10.</b>	7 gün süreyle her gün düzenli olarak kontrol solüsyonu uygulanan sağlıklı (Kontrol) ve kontrol solüsyonu (SCP+Kontrol) veya 50 mg/kg TOF (SCP+TOF) uygulanan amnezik sıçanların hipokampal CA1-2 alt-alanlarında birim alana düşen sinaptofizin dansiteler.....	55
<b>Şekil 5.11.</b>	7 gün süreyle her gün düzenli olarak kontrol solüsyonu uygulanan sağlıklı (Kontrol, A) ve kontrol solüsyonu (SCP+Kontrol, B) veya 50 mg/kg TOF (SCP+TOF, C) uygulanan amnezik sıçanların hipokampal CA3 alt-alanlarında sinaptofizin immünoreaktivitelerinin temsili görüntüleri.....	56
<b>Şekil 5.12.</b>	7 gün süreyle her gün düzenli olarak kontrol solüsyonu uygulanan sağlıklı (Kontrol) ve kontrol solüsyonu (SCP+Kontrol) veya 50 mg/kg TOF (SCP+TOF) uygulanan amnezik sıçanların hipokampal CA3 alt-alanlarında birim alana düşen sinaptofizin dansitesi.....	57
<b>Şekil 5.13.</b>	7 gün süreyle her gün düzenli olarak kontrol solüsyonu uygulanan sağlıklı (Kontrol, A) ve kontrol solüsyonu (SCP+Kontrol, B) veya 50 mg/kg TOF (SCP+TOF, C) uygulanan amnezik sıçanların hipokampal DG alanlarında Ki-67 immünoreaktivitelerinin temsili görüntüleri.....	60

- Şekil 5.14.** 7 gün süreyle her gün düzenli olarak kontrol solüsyonu uygulanan sağlıklı (Kontrol) ve kontrol solüsyonu (SCP+Kontrol) veya 50 mg/kg TOF (SCP+TOF) uygulanan amnezik sıçanların hipokampal DG bölgelerinde birim alana düşen Ki-67 immünopozitif hücre sayıları..... 61
- Şekil 5.15.** 7 gün süreyle her gün düzenli olarak kontrol solüsyonu uygulanan sağlıklı (Kontrol) ve kontrol solüsyonu (SCP+Kontrol) veya 50 mg/kg TOF (SCP+TOF) uygulanan amnezik sıçanların DG bölgelerinde birim alana düşen granüler hücre sayıları..... 62
- Şekil 5.16.** 7 gün süreyle her gün düzenli olarak kontrol solüsyonu uygulanan sağlıklı (Kontrol) ve kontrol solüsyonu (SCP+Kontrol) veya 50 mg/kg TOF (SCP+TOF) uygulanan amnezik sıçanların CA1-2 alt-alanlarında birim alana düşen piramidal hücre sayıları..... 63
- Şekil 5.17.** 7 gün süreyle her gün düzenli olarak kontrol solüsyonu uygulanan sağlıklı (Kontrol) ve kontrol solüsyonu (SCP+Kontrol) veya 50 mg/kg TOF (SCP+TOF) uygulanan amnezik sıçanların hipokampal CA3 alt-alanlarında birim alana düşen piramidal hücre sayıları..... 63
- Şekil 5.18.** 7 gün süreyle her gün düzenli olarak kontrol solüsyonu uygulanan sağlıklı (Kontrol, A) ve kontrol solüsyonu (SCP+Kontrol, B) veya 50 mg/kg TOF (SCP+TOF, C) uygulanan amnezik sıçanların hipokampal DG bölgelerinde GFAP immünoreaktivitelerinin temsili görüntüleri..... 65
- Şekil 5.19.** 7 gün süreyle her gün düzenli olarak kontrol solüsyonu uygulanan sağlıklı (Kontrol) ve kontrol solüsyonu (SCP+Kontrol) veya 50 mg/kg TOF (SCP+TOF) uygulanan amnezik sıçanların DG bölgelerinde birim alana düşen GFAP dansiteleri..... 66

- Şekil 5.20.** 7 gün süreyle her gün düzenli olarak kontrol solüsyonu uygulanan sağlıklı (Kontrol, A) ve kontrol solüsyonu (SCP+Kontrol, B) veya 50 mg/kg TOF (SCP+TOF, C) uygulanan amnezik sıçanların hipokampal CA1 alt-alanlarında GFAP immünoaktivitelerinin temsili görüntüleri ..... 67
- Şekil 5.21.** 7 gün süreyle her gün düzenli olarak kontrol solüsyonu uygulanan sağlıklı (Kontrol) ve kontrol solüsyonu (SCP+Kontrol) veya 50 mg/kg TOF (SCP+TOF) uygulanan amnezik sıçanların hipokampal CA1-2 alt-alanlarında birim alana düşen GFAP dansitesi..... 68
- Şekil 5.22.** 7 gün süreyle her gün düzenli olarak kontrol solüsyonu uygulanan sağlıklı (Kontrol, A) ve kontrol solüsyonu (SCP+Kontrol, B) veya 50 mg/kg TOF (SCP+TOF, C) uygulanan amnezik sıçanların hipokampal CA3 alt-alanlarında GFAP immünoaktivitelerinin temsili görüntüleri..... 69
- Şekil 5.23.** 7 gün süreyle her gün düzenli olarak kontrol solüsyonu uygulanan sağlıklı (Kontrol) ve kontrol solüsyonu (SCP+Kontrol) veya 50 mg/kg TOF (SCP+TOF) uygulanan amnezik sıçanların hipokampal CA3 alt-alanlarında birim alana düşen GFAP dansiteleri..... 70

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AMPA	: $\alpha$ -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazol propionik asit
ANOVA	: Analysis of variance (Varyans analizi)
BDNF	: Brain derived neurotrophic factor (Beyin kökenli nörotrofik faktör)
CA	: <i>Cornu ammonis</i>
CaMKII	: Ca <sup>2+</sup> /kalmodulin-bağımlı protein kinaz II
CREB	: sAMP yanıt elementi bağlayıcı protein
DCX	: Doublecortin
DG	: <i>Gyrus dentatus</i>
EK	: Entorinal korteks
GABA	: $\gamma$ -aminobutirik asit
GFAP	: Glial fibriler asidik protein
hl	: Hilus
<i>i.p.</i>	: İntraperitoneal
İGS	: İlk geçiş süresi
İKGS	: İkinci geçiş süresi
LTD	: Long-term depression (Uzun dönem depresyon)
LTP	: Long-term potentiation (Uzun dönem potensiyalizasyon)
mGluR	: Metabotropik glutamat reseptörü
NGF	: Nerve growth factor (Sinir büyüme faktörü)
NMDA	: N-metil-D-aspartat
NO	: Nitrik oksit
NOS	: Nitrik oksit sentaz
NT	: Nörotrofin
PY	: Perforant yolak
<i>p.o.</i>	: Per oral
PDE	: Phosphodiesterase (Fosfodiesteraz)
PRS	: Pirasetam
SCP	: Skopolamin
sAMP	: 3'-5'-siklik adenzin monofosfat
sGMP	: 3'-5'-siklik guanozin monofosfat
<i>sg</i>	: <i>Stratum granulosum</i>



<i>sl</i>	: <i>Stratum lucidum</i>
<i>sm</i>	: <i>Stratum moleculare</i>
<i>so</i>	: <i>Stratum oriens</i>
<i>sp</i>	: <i>Stratum pyramidale</i>
<i>sr</i>	: <i>Stratum radiatum</i>
SSS	: Santral sinir sistemi
TAY	: Temporoammonik yolak
TOF	: Tofisopam
Trk	: Tirozin kinaz



## 1. GİRİŞ ve AMAÇ

1960'lı yılların ortalarında, klasik 1,4-benzodiazepin halka sistemindeki nitrojen atomlarının pozisyonlarının değiştirilmesi ile bazı yeni kimyasal maddeler sentezlenmiştir. Söz konusu yeni kimyasallar, benzodiazepin halkasında bulunan azot atomlarının pozisyonlarından dolayı 2,3-benzodiazepinler (homofitalazinler) olarak adlandırılmıştır (Szénási ve Hársing, 2004, s. 69; Hamed vd., 2007, s. 109). Bu yeni benzodiazepinlere ait ilk ilaç olan tofisopam (TOF), 1976 yılında Grandaxin® adı ile ruhsatlandırılmıştır. Grandaxin® günümüzde Çek Cumhuriyeti, Macaristan, Rusya ve Japonya gibi çeşitli ülkelerde anksiyete bozukluklarının tedavisi için kullanılmaktadır (Rx Media Pharma®, 2017).

TOF'tan sonra, 2,3-benzodiazepin yapısına sahip başka ajanlar da sentezlenmiştir. "Girisopam" ve "nerisopam" anksiyolitik etkinlik gösteren diğer homofitalazinlere örnek olarak verilebilir (Horváth vd., 1999, s. 230; Horváth vd., 2000, s. 309; Szénási ve Hársing, 2004, s. 70-72; Hamed vd., 2007, s. 109).

Preklinik çalışmalar 2,3-benzodiazepinlerin, klasik benzodiazepin türevlerinden farklı olarak, kas gevşetici ve antikonvülzan etkilere neden olmaksızın selektif anksiyolitik etki gösterdiklerini ortaya koymuştur (Horvart vd., 2000, s. 310). Nitekim, TOF da mutad dozlarda sedatif-hipnotik, kas gevşetici ya da antikonvülzan etkiler göstermeyen bir anksiyolitikdir (Szegó vd., 1993, s. 91; Rundfeldt vd., 2010, s.1319). TOF'un farmakodinamik etki profili ile ilgili çalışmalar bu ilacın antiparkinson ve vejetatif modülatör etkileri olduğuna işaret etmiştir (Szegó vd., 1993, s.91; Szénási ve Hársing, 2004, s.70). Diğer yandan, TOF'un psikozun adjuvant tedavisinde özellikle negatif ve kognitif semptomların giderilmesinde yararlı olabileceği ileri sürülmüştür (Rundfeldt vd., 2010, s.1319).

Yakın tarihli çalışmalar homofitalazinlerin santral sinir sistemi (SSS)'nde kortikal bölgelerde yoğunlaşan klasik 1,4 veya 1,5-benzodiazepin reseptörlerinden farklı olarak, subkortikal ganglia, *substantia nigra* ve hipotalamus'ta lokalize olmuş özel bağlanma bölgelerine bağlandığına işaret etmiştir (Horváth vd., 2000, s. 309; Leventer vd., 2008, s. 198).

Homofitalazinlerin farmakolojik etki mekanizmalarının GABA<sub>A</sub>erjik ( $\gamma$ -aminobutirik asit), dopaminerjik ve opioiderjik sistemler ile ilişkili olabileceğini ileri süren çalışmalar bulunmaktadır. GABA<sub>A</sub>erjik sistem ile ilişkili olarak, homofitalazinlerin GABA<sub>A</sub> reseptörlerinin benzodiazepin bağlanma bölgelerine bağlanmadıkları; ancak

1,4-benzodiazepin türevlerinin benzodiazepin bağlanma bölgesine olan afinitelerini ve ayrıca musimol'ün GABA reseptörlerine bağlanma potansiyelini artırdıkları bildirilmiştir (Petócz, 1993, s.79; Hamed vd., 2007, s. 109). Dopaminerjik sinyal transdüksiyonu ile ilişkili olarak ise homofitalazinin dopaminerjik reseptörler üzerine karışık tip agonist / antagonist benzeri özellikler gösterdikleri rapor edilmiştir (Pellow ve File, 1986, s. 221). Bununla birlikte, bu maddelerin etkilerini beyinde nigrostriatal sistemde kendilerine özgü bağlanma bölgelerinde, özel bir sinyal transdüksiyonu aracılığı ile gösteriyor olmaları da mümkündür (Fekete vd., 1997, s.175; Horváth vd., 2000, s. 336; Hamed vd., 2007, s. 109;). Opioid sistem ile ilişkili olarak da homofitalazinin opioid agonistlerinin etkinliğini selektif olarak artırdığı gösterilmiş ve bu bileşiklerin etki mekanizmalarının opioidergik nörotransmisyon ile ilişkili olabileceği öne sürülmüştür (Fekete vd., 1997, s. 175; Horváth vd., 2000, s. 309; Hamed vd., 2007, s. 110).

2,3-benzodiazepinlerin etki mekanizmasına ilişkin bir başka yaklaşım da bu maddelerin farmakolojik etkilerini, sinyal iletiminde rol oynayan proteinlerin fosforilasyon süreçlerinde değişikliğe yol açarak gösterdikleri yönündedir (Horváth vd., 2000). TOF'un fosfodiesteraz (PDE) 1, 2, 3, 4, 5 ve 10 izoenzimlerine yüksek afinite ile bağlandığı ve bu enzimleri inhibe ettiği bilinmektedir (Bernard vd., 2008, s. 3196; Rundfeldt vd., 2010, s. 1323). Bu ilacın PDE-2, PDE-4 ve PDE-10 izoenzimlerine gösterdiği afinitenin, rolipram'ın PDE-4 enzimine olan afinitesinden daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Bernard vd., 2008, s. 3196; Rundfeldt vd., 2010, s. 1323). PDE enzim inhibitörlerinin beyindeki sinyal yollarında siklik adenosin monofosfat (sAMP) ve/veya siklik guanozin monofosfat (sGMP) düzeylerini yükselttikleri, bu ikinci habercilerin de bellek konsolidasyonu için gerekli olan sAMP yanıt elementi bağlayıcı protein (CREB) miktarlarını artırarak öğrenme ve bellek süreçlerini güçlendirdikleri bilinmektedir (Heckman vd., 2015, s.108). Nitekim, rolipram ve zaprinast gibi PDE enzim inhibitörlerinin bilişsel işlevleri artırdıkları bilinmektedir (Kanes vd. 2007, s. 239; Akar vd., 2014, s. 105; Akar vd., 2015, s. 86).

Anksiyete tedavisi için kullanılan klasik 1,4-benzodiazepinlerin bilişsel işlevlerde neden olduğu aksaklıklar göz önünde bulundurulduğunda (Chapouthier ve Venault, 2002, s.841; Inamura vd., 2015, s. 171), anksiyolitik bir ilaç olan TOF'un PDE enzim inhibitörü etkinliği ile ilişkili olarak sahip olduğu nootropik etki potansiyelinin terapötik açıdan oldukça değerli olabileceği açıktır. Buna rağmen, literatürde TOF'un bilişsel işlevler üzerine etkisine ilişkin çalışmalar son derece sınırlı sayıdadır. Bunlardan biri, Szegó ve

arkadaşları tarafından 1993 yılında yapılmıştır. Söz konusu çalışmada TOF'un psikomotor ve entelektüel performansı bozmadığı; hatta aksine hafif stimüle edici etkisi olduğu ileri sürülmüştür (Szegó vd., 1993, s. 91). Arushanian ve arkadaşları tarafından yapılan diğer bir çalışmada ise, TOF'un tekrarlı uygulanmalarının genç erişkinlerde görsel ve sözel kısa süreli belleği iyileştirdiği bildirilmiştir (Arushanian vd., 2004, s. 23).

TOF'un bir PDE enzim inhibitörü olarak kognitif süreçler üzerine olumlu etki potansiyelinin (Kanes vd. 2007, s. 239; Akar vd., 2014, s. 105; Akar vd., 2015, s. 86; Heckman vd., 2015, s.108) yanı sıra bilişsel ve psikomotor performansı artırdığına işaret eden önceki raporların (Szegó vd., 1993, s. 91; Arushanian vd., 2004, s. 23) ışığında, bu tez çalışmasında, bu ilacın öğrenme ve bellek bozuklukları üzerine olası farmakolojik etkisi deneysel amnezi modeli oluşturulmuş sıçanlar kullanılarak araştırılmıştır. Ayrıca, yine bu tez çalışması kapsamında; beyinde öğrenme, bellek ve mantık yürütme gibi işlevlerin regülasyonunu yapan ana merkez olan hipokampus (Jarrard, 1993, s. 9; Goel vd. 2004, s. 654) odaklanılmış ve TOF uygulamasının amnezik sıçanların hipokampuslarında neden olduğu olası morfolojik değişiklikler çeşitli immunohistokimyasal yöntemler kullanılarak araştırılmıştır.

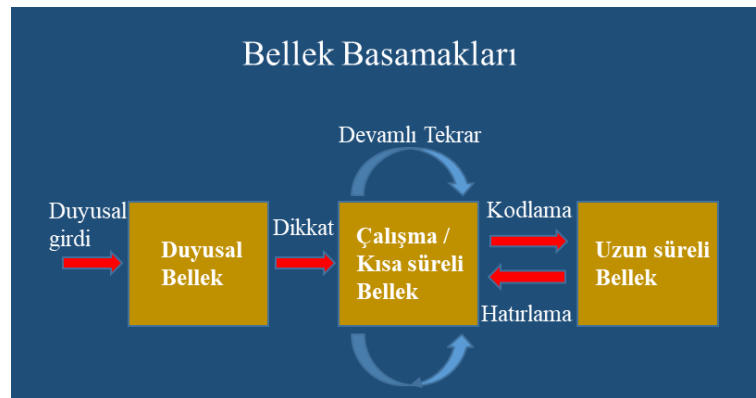
## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Öğrenme ve Bellek

Canlıların değişen çevresel şartlara uyum sağlayıp yaşamlarını sürdürebilmeleri adaptasyon yeteneklerine bağlıdır. Bireylerin hayatta kalmaları, kalıtsal olarak aktarılan biyolojik özelliklerin ve yeterliliklerin yanı sıra; bireyin kendi yaşamı süresince sürekli değişen koşullara uyumlu davranış ve stratejiler geliştirmesini gerektirmektedir. Anıları oluşturma, koruma ve kullanma kapasitesi canlının koşullara adaptasyonu için gereken en temel zihinsel süreçler arasında yer alır (Bruehl-Jungerman vd., 2007b, s.492). Bilginin kaydedilmesi ve yeniden kullanılması yeteneğinin genelleme, öngörme, bütünleştirme ve sonuç çıkarma gibi çeşitli adaptif davranışların olmazsa olmazı olduğunu söylemek mümkündür (Chaudhuri ve Fiete, 2016, s. 394). Öğrenme bilginin edinilmesi için geçen süreç, bellek ise deneyimlerin ve tekrarlanan uygulamanın sonucunda elde edilen bilginin davranışsal yanıt olarak ifade edilebilmesi olarak tanımlanmaktadır (Gazzaniga vd., 2014, s. 380). Daha açık bir ifadeyle, sinirsel ağların aktivitesinde veya bağlanabilirliğinde meydana gelen, bir uyarana ya da durum tarafından tetiklenen ve tetikleyici olaydan daha uzun süreli veya kalıcı olan değişim bellek olarak adlandırılır (Chaudhuri ve Fiete, 2016, s. 394).

### 2.2. Bellek Tipleri

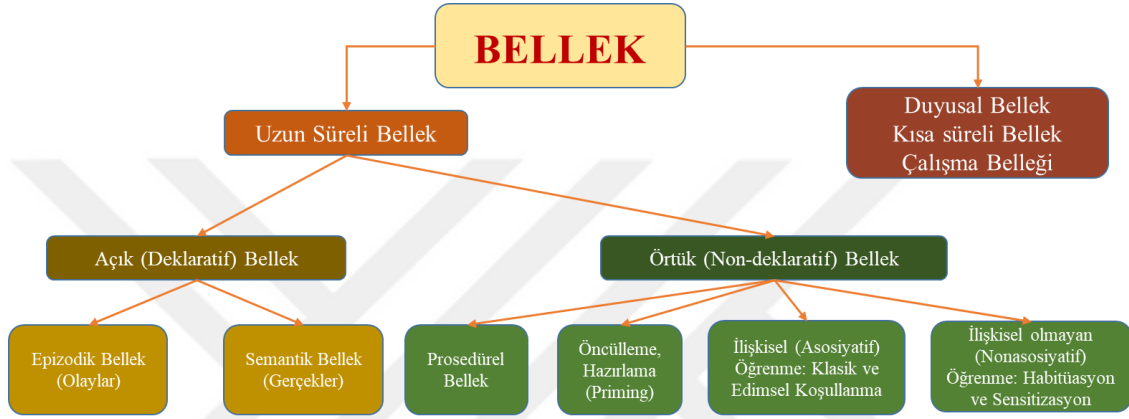
Belleği meydana getiren süreç kodlama (encoding), depolama (storage) ve geri çağırma (retrieval) basamaklarından oluşmaktadır. Kodlama (encoding) işlemi, gelen duyuşsal bilginin bellek izi olarak kaydedilmesini içeren edinim (acquisition) ve sağlamlaştırma (consolidation) süreçlerini kapsar (Gazzaniga vd., 2014, s. 381). Belleğin oluşum basamakları ile ilişkili şema Şekil 2.1.'de gösterilmiştir.



Şekil 2.1. Bellek oluşum basamakları

Öğrenme ve bellek konusunda gerçekleştirilen araştırmalar farklı bellek tipleri ile ilgili sınıflandırmalar yapılabilmesine olanak sağlamıştır. Örneğin, 1968 yılında Atkinson ve Shiffrin bellek sistemlerinin yapısal özelliklerine göre duyuşal bellek (kayıt), kısa süreli bellek ve uzun süreli bellek olmak üzere üç temel bileşenden oluştuğunu öne sürmüşlerdir (Atkinson ve Shiffrin, 1968, s. 89).

Şekil 2.2.'de bellek sistemlerinin bellek izinin kayıtlı tutulduğu süreye ve kaydedilen bilginin işlevine göre sınıflandırılmasına ilişkin bir şema sunulmuştur.



Şekil 2.2. Bellek tiplerinin sınıflandırılması (Gazzaniga vd., 2014, s. 381)

Uzun süreli bellek, açık (deklaratif) bellek ve örtük (non-deklaratif) bellek olmak üzere ikiye ayrılmaktadır (Clark ve Squire, 1998, s. 77). Deklaratif bellek, gerçekler (semantik) ve olayların (epizodik) kaydedilmesini destekleyen bellek sistemidir. Olay ve gerçeklerin bilinçli algılanmasını gerektirir. Buna karşın örtük bellek beceri, alışkanlık ve koşullanmanın basit formlarını kapsamaktadır. Örtük bellek türlerinin ortak özelliği belleğin bilinç dışı olmasıdır (Squire vd., 2004, s. 280-281).

Örtük bellek çeşitlerinden olan “prosedürel bellek” ya da “işlem belleği”, becerilerden ve alışkanlıklardan ibaret olup, motor becerilerin edinilmesi ile ilgilidir. Karmaşık bir motor dizgenin sırasına uygun olarak hatırlanması, söz gelimi bir müzik aletini çalmak, prosedürel tipte örtük belleğe örnek olarak verilebilir.

Diğer bir örtük bellek çeşidi olan öncülleme (hazırlama), bilginin bilince yansımadan tanınması olarak tanımlanabilir. Bireyin önceden gördüğü bir yüzü, resmi ya da kelimeyi daha kolay algılaması bu bellek tipine örnek olarak verilebilir (Moscovitch vd., 2005, s.38-39).

Günlük öğrenme aktivitesinin büyük kısmını oluşturan asosiyatif öğrenmede, organizma bir uyaran ile diğeri arasındaki ilişkiyi öğrenir (Squire vd., 2008, s. 1133-1134;

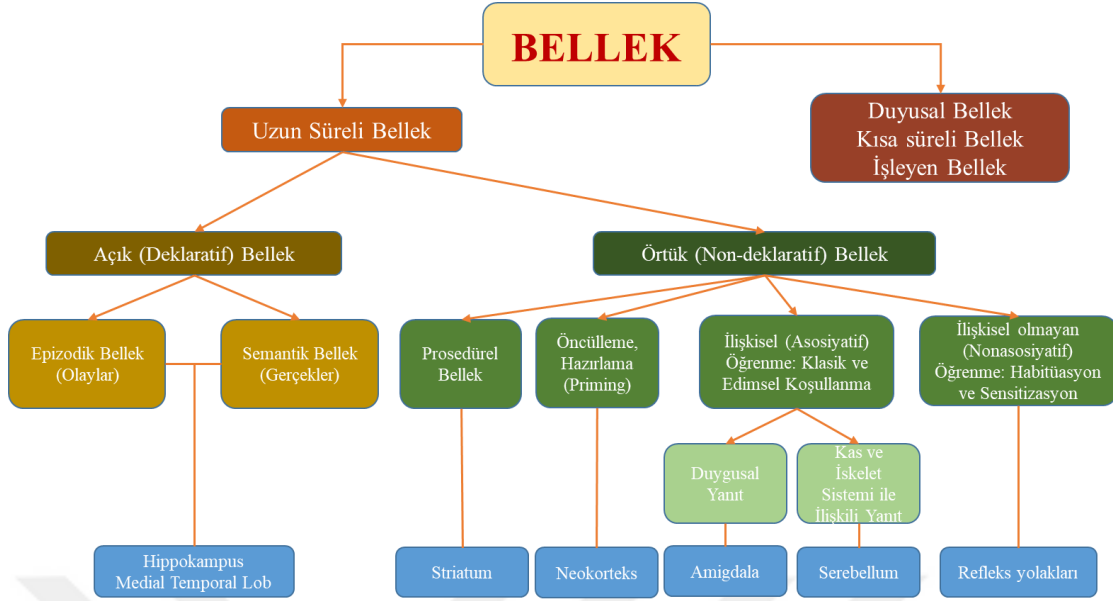
Barret vd., 2010, s. 290). Asosiyatif öğrenme, klasik ve edimsel koşullanma olmak üzere iki temel paradigma ile temsil edilmektedir. Otomatik ve refleksif davranışsal tepkinin olduğu bir öğrenme biçimi olan klasik (Pavlovian) koşullanmada ‘koşullu uyaran’ olarak adlandırılan doğal bir uyarıcı ile normal koşullarda davranışsal bir yanıt oluşturmayan ‘koşulsuz uyarının’ eşleştirilerek tekrarlanması sonrasında; yalnızca koşulsuz uyaran uygulandığında organizmada normal şartlarda doğal uyarana verilen davranışsal yanıt indüklenir. Edimsel ya da başka bir ifadeyle enstrümental koşullanmada ise organizmanın kendi davranışları ile sonuçlarını ilişkilendirdiği ödüllendirme veya cezalandırmaya dayalı bir öğrenme söz konusudur (Kirsch vd., 2004, s.369; Squire vd., 2008 s. 1134).

Öğrenmenin basit bir formu olan non-asosiyatif öğrenmenin iki farklı biçimi “habitüasyon” ve “sensitizasyon” dur. Habitüasyon organizmaya tekrar eden bir uyarının uygulanması sonucunda davranışsal yanıtta (genellikle refleksif) gözlemlenen azalma ile karakterize bir durumdur (Bailey vd., 2015, s. 104). Diğer yandan, sensitizasyon terimi ise güçlü bir uyarının tekrarlı uygulanması sonucu organizmanın uyarana karşı reaktivitesinde meydana gelen artışı ifade etmektedir (Duerr ve Quinn, 1982, s. 3646).

Bellek tipleri işlenen bilginin kullanım biçimine göre çalışma belleği (working memory) ve arşivsel bellek olarak da ikiye ayrılabilir (Izquierdo vd., 1999, s. 1). Çalışma belleği, tipik olarak, olayları " kısa süre akılda tutma" yeteneği olarak tanımlanır. Çalışma belleğindeki bilgiler, davranışı yönlendirmek için kullanıldığından sürekli güncellenmektedir. İnsanlarda ve diğer primatlarda gerçekleştirilen kapsamlı araştırmalar, çalışma belleğinin prefrontal korteks ve posterior asosiyasyon alanlarını içeren bir nöronal devreye dayandığı fikrini desteklemektedir (Sarnthein vd., 1998, s. 7092).

### **2.3. Öğrenme ve Bellek Süreçleri İle İlişkili Nöroanatomik Yapılar**

Öğrenme ve bellek süreçlerinde farklı beyin bölgelerinin farklı görevler üstlendiği 1950’lerden bu yana benimsenmeye başlanmış olan bir görüştür (Shu vd., 2003, s. 609). **Şekil 2.3.**’te çeşitli bellek tipleriyle ilişkili nöroanatomik yapılara ait bir şema sunulmuştur.



**Şekil 2.3.** Bellek tipleri ile ilişkili nöroanatomik yapılar (Barret vd., 2010, s. 290)

1957 yılında yapılan bir çalışmada, bilateral medial temporal lob rezeksiyonu gerçekleştirilmiş hastalarda bellek süreçlerinin bozulduğu, bazı vakalarda hem anterograd hem retrograd amnezi; bazılarında ise yalnızca anterograd amnezi görüldüğü bildirilmiştir. Ayrıca, bu etkilerin hipokampus ve amigdala gibi yapılarla ilişkili olduğu ileri sürülmüştür (Scoville ve Milner, 1957, s. 21). Takip eden çalışmalarla hipokampus ile prefrontal korteks; talamus ile hipokampus; prefrontal korteks ile talamus; amigdala ile hipokampus; Meynert'in bazal nükleusu ile medial temporal lob sistemi ve amigdala ile talamus arasındaki bağlantılar ve işlevsel ilişkiler gösterilmiştir (Shu vd., 2003, s. 609). Böylece belleğin tek bir nöroanatomik yapıda toplanmadığı ve beyinde farklı nöroanatomik yapılar tarafından desteklenen çeşitli bellek tiplerinin olduğu açıkça ortaya konulmuştur (Poldrack ve Packard, 2003, s. 245).

İleri sürülen çoklu bellek sistemleri hipotezine göre, hipokampus ve onunla anatomik olarak ilişkili yapılar deklaratif bellek ile ilgilidir. Bu noktadan hareketle, diğer bazı bellek tiplerinin hipokampus ve diğer medial temporal lob yapılarıyla doğrudan ilişkili olmadığı sonucu çıkarılmaktadır (Tranel vd., 1994, s. 165; Poldrack ve Packard, 2003, s. 245). Örneğin hipokampal kompleks-medial temporal lob veya diensefalik hasar sonucu amnezi oluşan bireylerde örtük bellek tipleri ile ilişkili edinim, saklama ve hatırlama süreçlerinin sağlam kaldığı bildirilmiştir (Moscovitch vd., 2005, s. 39).

Parkinson, Huntington ve Alzheimer hastalarında farklı örtük bellek tiplerinin değerlendirildiği diğer bir araştırmada da konu ile ilgili ilginç bulgular elde edilmiştir. Bu



çalışmada Huntington hastalarında motor öğrenmede bozukluk görülürken, sözel hazırlamanın (lexical priming) bozulmadığı gösterilmiştir. Alzheimer tipi demanslı hastalarda ise tam tersi bir durum olduğu; sözel hazırlamanın bozulduğu ancak motor öğrenmenin etkilenmediği gösterilmiştir. Elde edilen bulgular, sözel hazırlamanın semantik belleğin depolanmasına katılan neokortikal asosiyasyon alanlarının bütünlüğüne bağlı olduğuna; motor becerilerin öğrenimine ise kortikostriatal bir sistemin aracılık ettiğine işaret etmiştir (Heindel vd., 1989, s. 582).

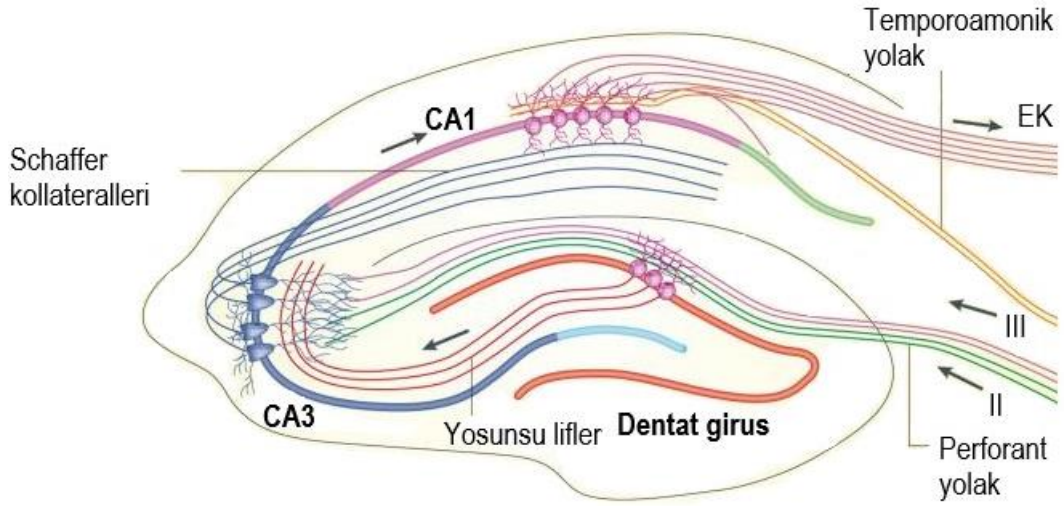
Günümüzde, motor dizgelerin öğrenilmesinde; objelerin, yüzlerin ve kelimelerin algılanmasında posterior neokorteksin; sıralı motor aktivitelerde ise *striatum*, *substantia nigra* ve *pars compacta* gibi yapıları içeren bazal gangliyonların önemli işlevleri olduğu bilinmektedir (Graybiel, 1995, s. 733; Moscovitch vd., 2005, s. 39). Yine serebellum, talamus ve frontal lobun motor kortikal bölgeleri de motor davranışların öğrenilmesi ve hatırlanması süreçlerinde önemli rol oynayan nöroanatomik bölgelerdir (Graybiel, 1995, s. 733; Doyon vd., 1997, s. 218).

Farklı bellek tipleri ile ilişkili başlıca nöroanatomik yapılar aşağıda özetlenmiştir.

### **2.3.1. Medial temporal lob ve hipokampus**

Medial temporal lob, deklaratif bellek ile ilişkili temel anatomik yapıları kapsayan bir sistemi içermektedir. Bu sistem *cornu ammonis* (CA) alanları, *gyrus dentatus* (DG), subikular kompleksi barındıran hipokampal kompleks ve bu bölgeye komşu olan peririnal, parahipokampal ve entorinal korteks (EK) alanlarından oluşmaktadır (Squire vd., 2004, s. 280; Schultz ve Engelhardt, 2014, s. 6).

Hipokampus (**Şekil 2.4.**), medial temporal lobun bir parçası olan lateral ventriküllerin temporal boynuzu tabanında yerleşmiş C harfi şeklinde bir yapıdır (Schultz ve Engelhardt, 2014, s. 6). Hipokampus öncelikli olarak EK ve subikulum olmak üzere çok çeşitli limbik, kortikal ve subkortikal alanlardan multimodal duyuşal girdiler almaktadır. Hipokampusu innerve eden primer eksitatör nöral yolağı EK'den projekte olan nöronları DG nöronlarına bağlayan perforant yolak (PY) ile birlikte CA1 ve CA3 nöronlarını innerve eden kollateraller oluşturmaktadır (Knowles, 1992, s. 252).

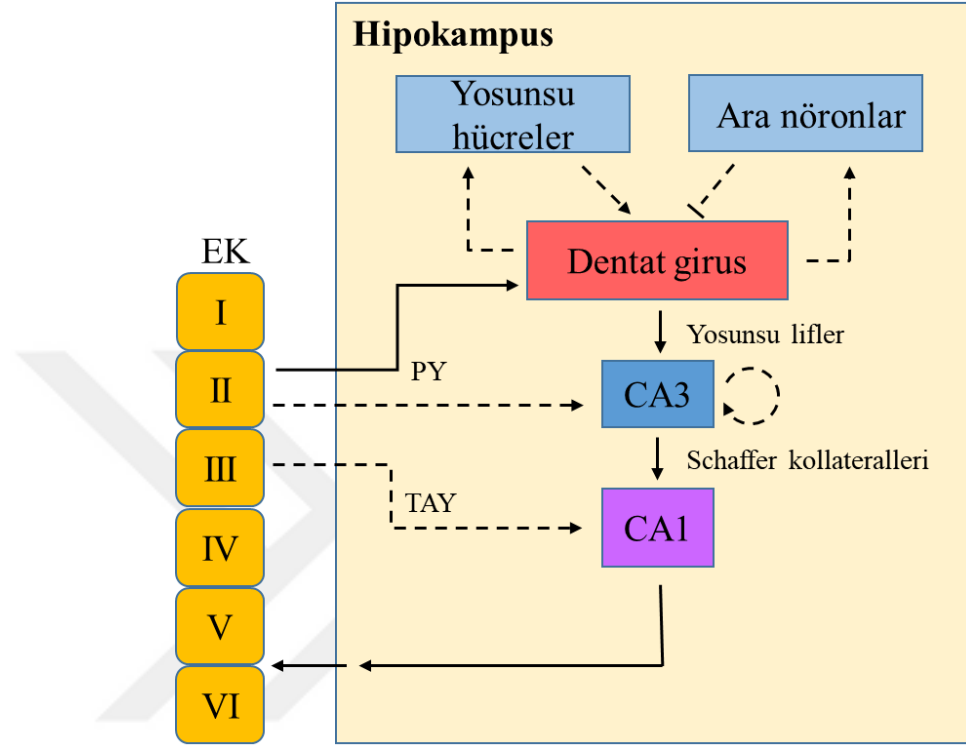


**Şekil 2.4.** Sıçan hipokampusunun koronal kesitinde eksitator nörall devrelerin gösterimi (Deng vd., 2010, s. 348)

EK, DG, CA3 ve CA1 nöronları arasında oluşan bu temel nöronal yollar trisinaptik devre olarak adlandırılmaktadır (Wojtowicz, 2012, s. 490; Kaptan ve Üzüm, 2016, s. 152). EK'nin II. hücre tabakasındaki nöronların aksonları lateral ve medial PY aracılığıyla DG'ye projekte olmaktadır. Lateral PY ile gelen nöronlar, DG'nin dış moleküler hücre tabakasında sonlanır. Kortikal girdilerin % 80'inden fazlası medial PY aracılığıyla orta moleküler hücre tabakasını innerve eder. Granüler hücre tabakasının hemen üstünde yer alan iç moleküler hücre tabakası, kontralateral hipokampustan gelen asosiyasyonel/kommissüral girdiler alır. Bu girdilerin çoğunluğunu beynin diğer hemisferindeki hipokampustan projekte olan piramidal nöronların akson kollateralleri oluşturmaktadır (Wojtowicz, 2012, s. 491). Bunlara ek olarak, beynin çeşitli bölgelerinden gelen kolinerjik, serotonerjik, noradrenerjik ve peptiderjik modülatör afferentlerin aksonları DG'nin çeşitli tabakalarında sonlanmaktadır (Wojtowicz, 2012, s. 491). Hipokampusun temel nöral devrelerine ait şema (**Şekil 2.5.**) sunulmuştur.

DG granüler nöronları, hilus (hl)'da bulunan yosunsu hücreler ve hilar ara-nöronlar ile eksitator ve inhibitör döngüsel projeksiyonlar oluşturmaktadır. DG yosunsu lifler aracılığıyla CA3 piramidal nöronlarına projeksiyonlar göndermektedir. CA3 bölgesi de EK'nin II. tabakasından PY lifleri aracılığıyla direkt projeksiyonlar almaktadır. CA1 nöronlarına gelen sinirsel uyarılar Schaffer kollateralleri aracılığıyla CA3 bölgesinden gönderilmektedir. Ayrıca CA1 bölgesi EK'nin III. tabakasından temporoammonik yolak (TAY) lifleri aracılığıyla direkt projeksiyonlar almaktadır. CA1 bölgesinden çıkan aksonlar tekrar EK'nin derin tabakalarını innerve etmektedir. Böylelikle, hipokampusa

gelen bilgi, işlenmesinin ve konsolidasyonunun ardından beyin aktivitesini etkilemek üzere EK'ye geri dönmektedir (Deng vd., 2010, s. 348; Wojtowicz, 2012, s. 490; Kaptan ve Üzüm, 2016, s. 152).



Şekil 2.5. Hipokampus nöral devrelerinin şematik gösterimi, Trisinpaptik eksitator yolak (EK-DG-CA3-CA1-EK) düz oklarla gösterilmektedir. (Deng vd., 2010, s. 348)

Trisinpaptik devrenin belleğin kodlanması sürecinde aktif rol oynadığı düşünülmektedir (Kaptan ve Üzüm, 2016, s. 152). Gerçekleştirilen yakın tarihli bir çalışma; özellikle DG-CA3 hücreleri arasındaki bağlantının ayırıcı ve yeni bilgilerin kodlanmasında özel önem taşıdığına işaret etmiştir (Bakker vd., 2008, s. 1640).

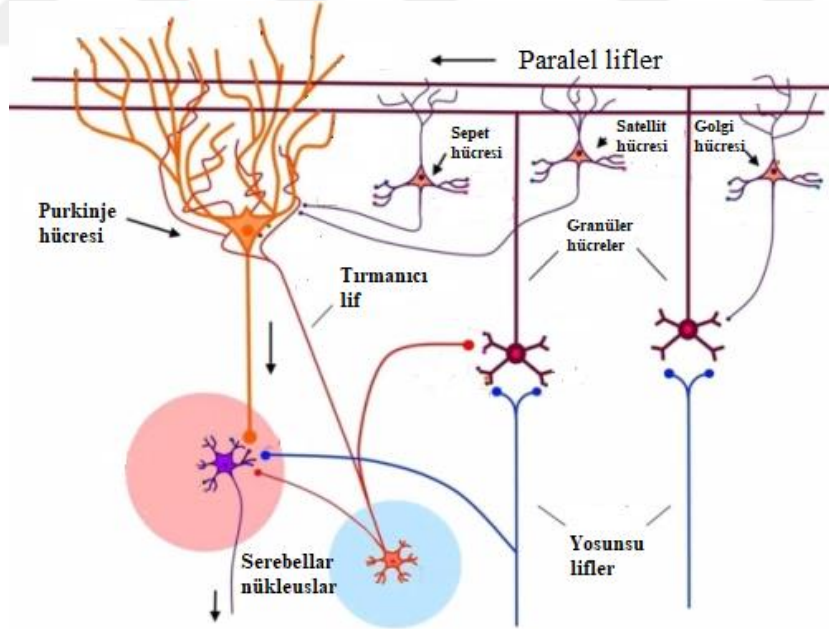
Hipokampusun da bir parçası olduğu medial temporal korteksin deklaratif belleğin oluşumu ile ilişkili süreçlerde önemli rol oynadığı bilinmektedir. Öyle ki, hipokampusta sınırlı bölgedeki bir hasara, medial temporal korteks hasarının da eklendiği durumlarda, bellek kaybının derecesinin ciddi oranda arttığı bilinmektedir (Rempel-Clower vd., 1996, s. 5253; Stefanacci vd., 2000, s. 7024). Medial temporal lobda bulunan yapıların yeni anıların oluşumunda ve yakın zamanda oluşturulmuş anıların hatırlanmasında rol oynadığı bilinmekle birlikte; uzun süreli epizodik bellek için neokortikal yapıların ve bunlar arasından özellikle frontal, lateral temporal ve oksipital lobların katılımının son derece önemli olduğu da ortadadır (Bayley vd., 2005, s. 807). Dolayısıyla, hipokampusun

neokortekste dağılmış halde bulunan bölgeler ile birlikte deklaratif bellek deposunun bütününe oluşturduğunun altını çizmek gerekir (Squire, 1992, s.195).

### 2.3.2. Serebellum ve bazal gangliyonlar

Organizmanın hareketlerinin planlanmasından prefrontal korteks ve premotor alanlar sorumludur. Serebellum ve bazal gangliyonlar ise motor öğrenme için gerekli olan ana subkortikal alanlardır (Ito, 2000, s. 237).

Serebellum, korteks ve nükleuslardan oluşan bir arka beyin bölümüdür (Hirano, 2013, s. 183). Serebellar kortekse giren iki temel eksitator yolak vardır (Şekil 2.6.). Bunlardan ilki, beyin sapı ve omurilikten gelen duysal ve motor bilgilerin yosunsu lifler ile taşındığı ve sonra granüler ara nöronlar aracılığıyla purkinje hücrelerine iletiildiği yolaktır. Granüler nöronların aksonlarının oluşturduğu paralel lifler purkinje hücreler ile indirekt sinaptik bağlantılar oluşturmaktadır. İkinci eksitator yolak ise inferior olive nükleustan köken alıp doğrudan purkinje hücrelerine bağlanan tırmanıcı lifler tarafından oluşturulan yolaktır (Ito vd., 1982, s.114; Massey ve Bashir, 2007, s. 178; Hirano, 2013, s. 183).



Şekil 2.6. Serebellar korteksin nöronal devrelerinin şematik gösterimi (Marmolino ve Manto, 2010, s. 43)

İnhibitör purkinje hücrelerinin aksonları ise vestibüler ve derin serebellar nükleuslara projekte olurlar (Massey ve Bashir, 2007, s. 178).

Bazal gangliyonların öğrenme ve bellek ile ilişkilerinin en belirgin kanıtı Parkinson hastalarında rastlanan bilişsel işlev bozukluklarıdır. *Substantia nigra* ve striatum arasındaki dopaminerjik etkinliğin progresif biçimde hasarlandığı bu hastalıkta, ekstrapiramidal sistem ile ilişkili hareket bozukluklarına öğrenme ve bellek bozuklukları da eşlik etmektedir (Foerde ve Shohamy, 2011, s. 625-626).

### **2.3.3. Amigdala**

Amigdala, her temporal lobun medial ön kutbunun korteksinin hemen altında bulunan çekirdek topluluğudur. Amigdala işlevsel olarak “bazolateral kompleks” ve “santral çekirdek” olmak üzere iki alt ana kısımdan oluşur. Limbik sistem ile çok sayıda çift yönlü bağlantılara sahip bir yapı olan amigdala, limbik korteksin bütün bölümlerinden olduğu kadar; temporal, pariyetal, oksipital lobların neokortekslerinden, özellikle işitsel ve görsel asosiasyon alanlarından nöron sinyalleri alır. Sinyallerini ise yukarı kortikal alanlara, hipokampus, septuma, talamusa ve hipotalamusa gönderir (Hall, 2011, s. 719).

Amigdalanın duygusal tetiklenmeye bağlı öğrenme ve bellek süreçlerinde düzenleyici görevler üstlendiği bilinmektedir. Bu görevler özellikle amigdalanın bazolateral kompleksi ile ilişkilendirilmiş, bu kompleksteki muskarinik ve noradrenerjik aktivasyonu etkileyen bazı nöromodülatör sistemlerin de sürece katkılarının bulunduğu gösterilmiştir. Amigdalanın kaudat nükleus, nükleus akumbens ve korteksin de dâhil olduğu diğer beyin bölgelerine gönderdiği efferentlerin de bellek konsolidasyonun düzenlenmesine katkıda bulunduğu bildirilmiştir (McGaugh, 2004, s. 1).

## **2.4. Öğrenme ve Bellek ile İlişkili Hücresel ve Moleküler Mekanizmalar**

Öğrenme ve bellekle ilişkili süreçlerde çok sayıda nöromediyatör sisteminin ve nörotrofik faktörün önemli rolleri olduğu bilinmektedir.

### **2.4.1. Öğrenme ve bellek süreçlerinde rol oynayan nöromediyatör sistemleri**

#### **2.4.1.1. Asetilkolin**

Kolinerjik nörotransmisyonun yeni bilgilerin depolanması ve geri çağrılmasındaki rolünün değerlendirildiği ilk çalışma 1971 yılında gerçekleştirilmiştir (Deutsch, 1971, s. 788). O günden bu yana kolinerjik reseptörleri etkileyen ajanların öğrenme ve bellek

performansı üzerine etkilerinin incelendiği pek çok araştırma yapılmıştır (Bunce vd., 2004, s. 450).

İnsanda, muskarinik kolinerjik reseptörlerin skopolamin (SCP) gibi antagonist ilaçlar tarafından bloke edilmesinin yeni anıların kodlamasını bozduğu; ancak daha önce depolanan anıların hatırlanmasını engellemediği bilinmektedir (Atri vd., 2004, s. 223; Hasselmo, 2006, s. 710). Kolinerjik muskarinik reseptörleri bloke eden ajanların deney hayvanlarına uygulanmasının bellek bozukluğu oluşturduğunun fark edilmesi üzerine, non-selektif muskarinik reseptör blokörü bir madde olan SCP, deneysel amnezi modeli oluşturmak için sıklıkla kullanılan bir ajan haline gelmiştir (Drachman ve Leavitt, 1974, s.113; Blokland vd.,1992, s.373; Tang vd., 1997, s. 12667; Potter vd., 2000, s.37; Atri vd., 2004, s. 223). SCP'ye benzer şekilde spesifik muskarinik M<sub>1</sub> reseptör antagonisti pirenzepin'in, kolin gerilim inhibitörü bir madde olan hemikolinyum'un ve nikotinik reseptör antagonisti bir ilaç olan mekamilamin'in de öğrenme ve bellek parametreleri üzerine olumsuz etkileri olduğu bildirilmiştir (Blokland, 1995, s. 286). Diğer yandan, asetilkolinesteraz enzim inhibitörlerinin deney hayvanlarında SCP ile indüklenen amneziyi düzelttiği gösterilmiştir (Snyder vd., 2005, s. 126). Tüm bu çalışmalar, kolinerjik sistemin öğrenme ve bellek süreçlerinin devamı için önemini ortaya koymaktadır.

Klinik açıdan bakıldığında da, kolinerjik sistemin bilişsel işlevler açısından yaşamsal önemini ortaya koyan en temel patolojinin Alzheimer hastalığı olduğu söylenebilir. Progresif, irreversibl nörodejeneratif bir hastalık olan Alzheimer hastalığının kolinerjik nöronlarda hasar ile karakterize olduğu bilinmektedir. Alzheimer hastalığına benzer biçimde, yaşlanmaya bağlı diğer demans formlarında da Meynert'in bazal nükleusunda bulunan kolinerjik magnoselüler nöronların dejenerasyonu karakteristik bir patolojik bulgudur. Nitekim bu çekirdekten neokortekse projekte olan kolinerjik nöronlarda hasar oluşturularak deneysel demans modeli indüklemek mümkündür (Muir, 1997, s. 687).

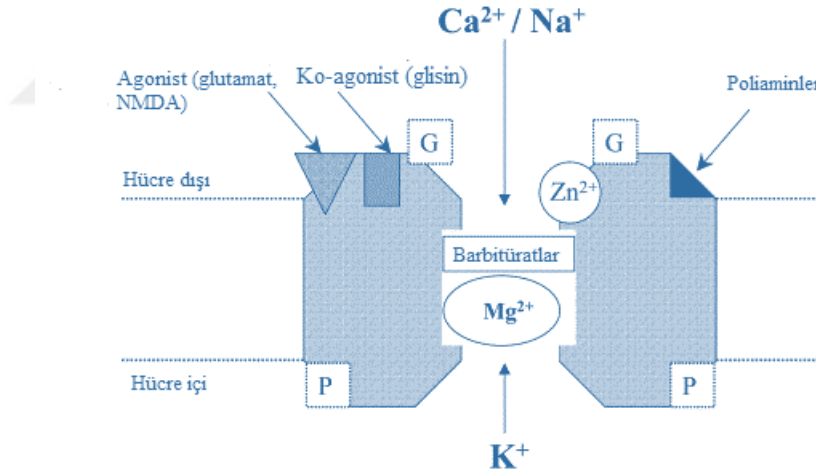
Bazal ön beyin kompleksi ve pontomesensefalik kompleks başta olmak üzere, SSS'de bellek ile ilişkili nöroanatomik yapılardan olan hipokampus, striatum ve amigdala kolinerjik iletimin büyük önem taşıdığı alanlar arasındadır (Gold, 2003, s.195; Barret vd., 2010, s. 134). Diğer yandan, bazal ön beyin kolinerjik nöronlarının glutamat, GABA, katekolaminler, hipokretin/oreksin, adenozin, vazopresin, oksitosin, P maddesi,

nöropeptid Y ve galanın gibi nöromediyatör sistemleri tarafından modülasyonunun da bilişsel süreçler açısından önemli olduğu bilinmektedir (Blake ve Boccia, 2017, baskıda).

#### 2.4.1.2. Glutamat

Glutamat, SSS'nin ana eksitator nörotransmitteridir (McEntee ve Crook, 1993, s. 391). Glutamat nöronal iletişim, sinyal işleme, öğrenme ve bellek oluşumunu belirleyen süreçler üzerine etkilerini, presinaptik ve postsinaptik dağılım gösteren iyonotropik ve metabotropik reseptörleri aracılığı ile gerçekleştirmektedir (Riedel vd., 2003, s. 2).

Esas olarak postsinaptik yerleşimli metabotropik glutamat reseptörlerinden (mGluR), mGluR1 ve mGluR5 reseptörlerinin aktivasyonu, intraselüler inozitol trifosfat ve diaçil gliserol seviyelerinin yükselmesine; esas olarak presinaptik yerleşimli olan mGluR2, mGluR3, mGluR4, mGluR6, mGluR7 ve mGluR8 reseptörlerin aktivasyonu ise intraselüler sAMP seviyelerinin azalmasına yol açar. Bu reseptörlerin SSS'de yaygın dağılım gösterdikleri ve özellikle hipokampus ve serebellumdaki sinaptik plastisite süreçlerine katıldıkları bilinmektedir (Barret vd., 2010, s. 141).



**Şekil 2.7.** NMDA reseptör organizasyonunun diyagramı, P: fosforilasyon bölgeleri; G: glikozilasyon bölgeleri (Riedel vd., 2003, s. 4.)

İyonotropik glutamat reseptörleri ise  $\alpha$ -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazol propionik asit (AMPA)/kainat ve N-metil-D-aspartat (NMDA) (Şekil 2.7.) reseptörleri olarak sınıflandırılabilirler. NMDA reseptörleri öğrenme ve bellek süreçlerine doğrudan katılırken; AMPA reseptörlerinin öğrenme ve bellek süreçlerine katılımı daha sınırlı ve dolaylıdır (Riedel vd., 2003, s. 2).

#### **2.4.1.3. Nitrik oksit**

Deney hayvanları üzerinde gerçekleştirilen araştırmalar, nitrik oksit (NO)'in; beslenme, penil ereksiyon, esneme, damar dilatasyonu ve immün cevap gibi süreçlerin yanı sıra; kortikal uyarılma ve öğrenme ve bellek gibi nöronal olaylarda da önemli görevler üstlendiğine işaret etmektedir (Paul ve Ekambaram, 2011, s. 473).

NO'nun sinir sistemindeki dağılımı, NO sentaz (NOS) enziminin lokalizasyonu ile açıklığa kavuşturulmuştur. NOS, kortekste somatostatin, nöropeptid Y ve GABA içeren nöronlarda; serebellumda ise glutaminerjik granül hücreleri ile GABAerjik basket hücrelerinde bulunmaktadır. *Corpus striatum*'da da korteks ile benzer şekilde nöropeptid Y ve somatostatin ile ko-lokalize halde bulunmaktadır (Dawson ve Dawson, 1995, s. 9).

Geleneksel nörotransmitterlerden farklı olarak NO salıverilmeden hemen önce sentezlenir ve veziküller içerisinde depolanmaz. NO üretimi, intraselüler  $Ca^{+2}$  konsantrasyonunun artmasına bağlı olarak tetiklenir (Susswein vd., 2004, s. 154). NOS enzimi hücrede  $Ca^{+2}$ /kalmodulin aracılığıyla aktive olarak NO üretimine aracılık eder. NO sentezlendikten sonra, hedef molekülü olan çözünebilir guanilil siklaz (sGC) enzimine ait hem grubuna bağlanarak sGMP üretimine aracılık eder (Haley vd., 1992, s. 211). sGMP de protein kinaz G ve protein kinaz A gibi kinazların aktivasyonuna yol açarak hücre sel cevabı oluşturur (Susswein vd., 2004, s. 154).

NO, hem su hem de lipid içerisinde çözünebilir olduğundan sentezlendiği hücreden dışarıya difüze olabilmektedir. Bu özelliğinden dolayı, retrograd bir sinyal molekülü olarak işlev görür ve presinaptik nöronların ve/veya glia hücrelerinin uzun süreli potansiyelizasyon sürecine katılımlarına olanak sağlar (Haley vd., 1992, s. 215). Bunlara ek olarak, endojen NO'nun asetilkolin, serotonin, histamin, adenzin ve eksitator ve inhibitör aminoasitlerin salıverilmesinde de modulator işlevleri olduğu bilinmektedir (Prast ve Philippu, 2001, s. 51).

#### **2.4.1.4. GABA**

GABA, SSS'nin ana inhibitör nöromediyatörüdür (Kalueff ve Nutt, 1996, s. 100). Benzodiazepinler gibi GABAerjik etkinliği artırdığı bilinen maddelerin bellek işlevleri üzerinde olumsuz etkileri olduğu gösterilmiştir (Chapouthier ve Venault, 2002, s. 841; Inamura vd., 2015, s. 171). GABAerjik etkinliği azaltan  $\beta$ -karbolin-3-karboksilik asit etilester, pentilentetrazol ve pikrotoksin gibi maddelerin düşük dozlarda, hafif düzeyde



anksiyeteye neden olarak bellek süreçlerini olumlu yönde etkiledikleri ileri sürülmüştür (Chapouthier ve Venault, 2002, s. 841).

#### **2.4.1.5. Dopamin**

Dopamin'in öğrenme, bellek ve sinaptik plastisitenin belirli aşamalarında gözlenen spesifik sinaptik değişikliklerde düzenleyici işlevleri olduğu bildirilmiştir. Striatum, hipokampus ve prefrontal korteks beyinde dopaminerjik innervasyon ile sinaptik plastisitenin ilişkilendirildiği temel bölgelerdir (Jay, 2003, s. 376).

#### **2.4.1.6. Noradrenalin**

Noradrenalin'in dikkat, duygulanım ve bellek oluşumu gibi fizyolojik işlevlerde rol oynadığı bilinmektedir (Kobayashi ve Yasoshima, 2001, s. 371).

Noradrenerjik nöronların beyin sapında bulunan lateral tegmental alan ve *locus coeruleus*'ta bulunan hücre gruplarından köken alarak, farklı aksonal yollar üzerinden korteks, hipokampus ve amigdalyayı da içeren çeşitli beyin bölgelerine projekte oldukları bilinmektedir (Kobayashi ve Yasoshima, 2001, s. 371; Tully ve Bolshakov, 2010, s. 2). *Locus coeruleus*'un uyarılmasının, uyarılmanın derecesine bağlı olarak, duyu, dikkat ve bellek ile ilişkili nöronal devrelerde "bilgilerin toplanması" ve "işlenmesi" süreçlerini artırdığı ve/veya düzenlediği bildirilmiştir (van Stegeren, 2008, s. 533; Berridge ve Waterhouse, 2003, s. 33).

#### **2.4.1.7. Serotonin**

Serotonin'in SSS'de duygulanımın, beslenmenin, motor aktivitenin, vücut ısısının, sirkadiyen ritmin, cinsel davranışın ve ağrı algısının düzenlenmesi gibi çeşitli fizyolojik işlevlerde rol oynadığı bilinmektedir.

Gerek prelinik çalışmalar gerekse negatif semptomlu şizofreni hastalarında yapılan çalışmalar, triptofan (serotonin prekürsörü) uygulamasının bilişsel işlevleri artırdığını ortaya koymuştur (Haider vd., 2006, s. 421; Levkovits vd., 2010, s. 568). Bunun yanı sıra, yaşlılarda ve Alzheimer hastalarında triptofan deplesyonu sonucu bellek parametrelerinin bozulması da serotonerjik sistemin bilişsel süreçlerde de düzenleyici görevler üstlendiğine işaret etmektedir (Porter vd., 2003, s. 41; Buhot, 2000, s. 210; Švob Štrac vd., 2016, s. 35). Beyin sapında yer alan rafe nükleusundan köken alan serotonerjik

nöronların (Meneses ve Liy-Salmeron, 2012, s. 545) serebral korteks, hipokampus, septum ve amigdala gibi öğrenme ve bellek ile ilişkili beyin bölgelerini innerve ediyor olması da bu düşünceyi desteklemektedir (Ogren vd., 2008, s. 54). Ayrıca, serotonerjik sistemin bilişsel işlevler üzerine etkilerini yalnız başına değil; kolinerjik, glutaminerjik, dopaminerjik ve GABAerjik sistemler ile etkileşerek gösterdiği bilinmektedir (Buhot, 2000, s. 210).

#### **2.4.2. Öğrenme ve bellek süreçlerinde sinaptik plastisitenin rolü**

İç ve dış uyaranlara bağlı olarak beyindeki nöronların ve bunların oluşturduğu sinapsların yapısal özelliklerindeki ve işlevlerindeki değişiklikler “plastisite” olarak tanımlanır. Sinapsların iletim etkinliğinde gerçekleşen değişimin, diğer bir ifade ile sinaptik plastisitenin, bellek oluşumunun temel mekanizması olduğu ileri sürülmüştür (Okano vd., 2000, s. 1403). Kısaca ifade etmek gerekirse, kısa süreli bellek halihazırda var olan proteinlerin kovalent modifikasyonunu ve var olan sinaptik bağlantıların gücündeki değişiklikleri içerirken; uzun süreli bellek yeni proteinlerin sentezini ve yeni sinaptik bağlantıların oluşmasını gerektirir (Mayford vd., 2012, s. 10).

Nöronlar arasındaki bağlantının gücünün değiştirilmesinin, SSS’de bellek izlerini kodlayan ve depolayan mekanizma olduğu kabul edilmektedir. Söz konusu sinaptik bağlantıların gücü, nörotransmitter salıverilmesinin modülasyonu ile belirlenir. Örneğin, nörotransmitter salıverilmesinde azalmanın kısa süreli habitüasyon ile; artmanın ise dishabitüasyon ve sensitizasyon ile ilişkili olduğu bilinmektedir (Castelluci vd., 1970, s. 1745; Castellucci ve Kandel, 1974, s. 5004; Castellucci ve Kandel, 1976, s. 1176).

Sinaptik plastisite ve bellek hipotezine göre, aktivite-bağımlı sinaptik plastisite bellek oluşumu sırasında uygun sinapslarda indüklenir ve söz konusu plastisitenin gözlemlendiği beyin alanı ile ilişkili bellek süreçleri için gereklidir. Bununla birlikte, öğrenme ve bellek oluşumu için sinaptik plastisitedeki değişimi destekleyen başka faktörlerin de olabileceğinin altı çizilmiştir (Martin vd., 2000, s. 649).

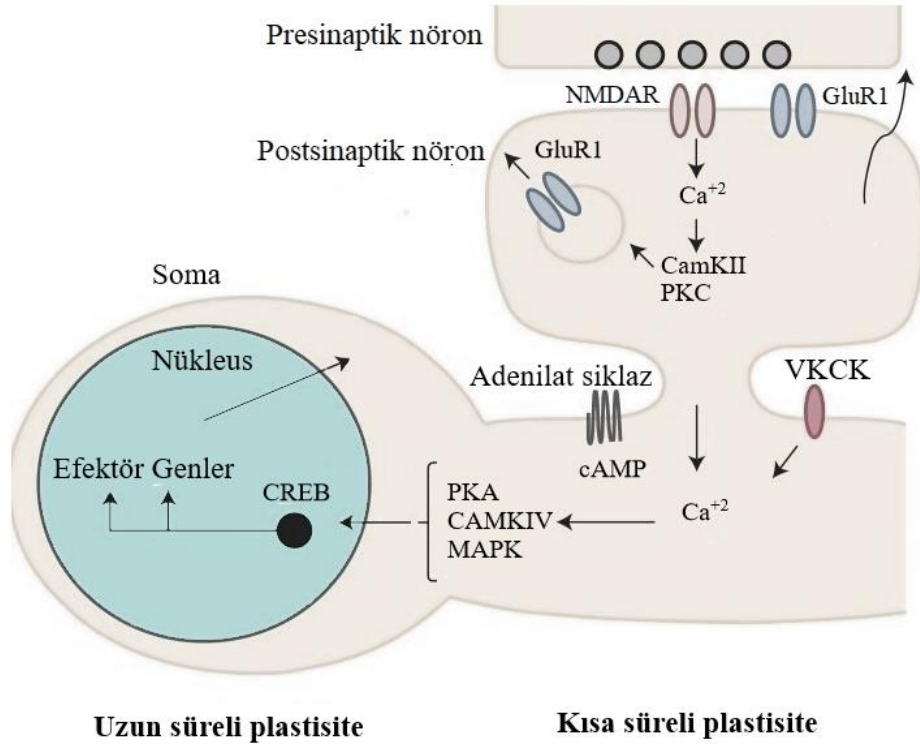
Nöronal iletimin uzun süreli potansiyelizasyonu (LTP) ve uzun süreli depresyonu (LTD), memeli beyinde bellek oluşumu ile ilişkili olduğu bilinen iki temel fizyolojik süreçtir (Malenka ve Bear, 2004, s. 5; Cooke ve Bliss, 2006, s. 1659; Kumar, 2011, s. 3). Bu iki temel fizyolojik sürece ilişkin temel bilgiler aşağıda özetlenmiştir.

### 2.4.2.1. Öğrenme ve bellek süreçlerinde uzun süreli potansiyalizasyonun rolü

LTP, gerçekleştirilen aktivite paternlerine bağlı olarak sinapsların kalıcı bir şekilde güçlendirilmesi olarak tanımlanabilir. Söz konusu sinaptik aktivite paternleri, iki nöron arasındaki sinyal iletiminde uzun süreli bir artış yaratmaktadır.

LTP, memeli beyinde ilk kez entorinal korteksten çıkan PY fiberlerinin DG'deki granüler nöronlar ile yaptıkları eksitator glutamaterjik sinapslarda tanımlanmıştır (Bliss ve Gardner-Medwin, 1973, s. 357; Bliss ve Lomo, 1973, s. 331; Bliss ve Collingridge, 1993, s. 31). Sonrasında amigdala (Rogan vd., 1997, s. 604), korteks (Tsumoto, 1990, s. 573; Kirkwood vd., 1993, s. 1518; Fox, 2002, s. 799), striatum (Charpier ve Deniau, 1997, s. 7036) ve serebellum (Salin vd., 1996, s. 797) gibi çeşitli beyin bölgelerinde de gösterilmiştir.

SSS'de LTP indüksiyonu, oluşumu ve devamlılığı için birden fazla moleküler mekanizma olduğu düşünülmektedir (Kumar, 2011, s. 3). LTP oluşumunun sinapslarda glutamat aracılıklı NMDA reseptör aktivasyonu sonucu, reseptörle ilişkili  $Ca^{+2}$  kanallarının açılması ile ilgili olduğu bilinmektedir (Lynch, 2004, s. 93). LTP indüksiyonu sırasında sinaps düzeyinde gelişen olaylar **Şekil 2.8.**'de sunulmuştur.



Şekil 2.8. LTP indüksiyonunun moleküler mekanizması (Mayford vd., 2012, s. 8)

İlk aşamada presinaptik liflerin tetanik stimülasyonu, glutamat başta olmak üzere bazı nörotransmitterlerin sinaptik boşluğa salımına neden olmaktadır. Salıverilen glutamatın postsinaptik AMPA reseptörlerine bağlanması, pozitif yüklü  $\text{Na}^+$  iyonlarının postsinaptik membrandan hücre içine akışını tetikler ve depolarizasyona neden olur. AMPA reseptör aktivasyonuna bağlı oluşan bu depolarizasyon, postsinaptik hücrede NMDA reseptörüne bağlı non-selektif katyon kanalındaki  $\text{Mg}^{+2}$  bloğunu ortadan kaldırmak için yeterli düzeyde ise kanal  $\text{Ca}^{+2}$  ve  $\text{Na}^+$  iyonlarının hücre içine akışına izin verir (Soderling ve Derkach, 2000, s. 75; Kumar, 2011, s. 3). Bu süreçte, LTP indüksiyonunun postsinaptik intraselüler  $\text{Ca}^{+2}$  konsantrasyonunun artması ile yakından ilişkili olduğu; voltaj ve ligand-kapılı  $\text{Ca}^{+2}$  kanallarının blokajının LTP oluşumunu baskıladığı gösterilmiştir (Grover ve Teyler, 1990, s. 477). Diğer yandan, postsinaptik AMPA reseptörlerinin sayısının ve aktiviteye bağımlı regülasyonunun da sinapsların uzun süreli ve kapsamlı reorganizasyonu, varolan sinapsların kaybolması ve yeni sinapsların oluşumu gibi süreçler açısından önemli olduğunun altı çizilmelidir (Malenka, 2003, s. 9).

LTP oluşum sürecinde, intraselüler  $\text{Ca}^{+2}$  konsantrasyonunun ani yükselişi  $\text{Ca}^{+2}$ /kalmodulin-bağımlı protein kinaz II (CaMKII), protein kinaz C ve tirozin kinaz Fyn gibi çeşitli kinazların aktivasyonunu tetiklemektedir (Kumar, 2011, s. 3; Kandel, 2012, s. 7). CaMKII'nin kalmodulin tarafından otofosforilasyonu, enzimin  $\text{Ca}^{+2}$  varlığından bağımsız biçimde aktif kalmasına neden olmaktadır (Lisman, 1994, s. 406). CaMKII aktivasyonunun çok sayıda hücre içi hedef molekülün fosforilasyonuna ve regülasyonuna neden olduğu ve nörotransmisyon, nöronal plastisite, hücre eksitabilitesi, gen ekspresyonu, hücre şekli ve iskeletinde meydana gelen değişimler ile ilişkili olaylara aracılık ettiği bildirilmiştir (De Koninck ve Schulman, 1998, s. 227). Protein kinaz C'nin aktivasyonu ise  $\text{Ca}^{+2}$ , diaçil gliserol, araşidonik asit gibi bir dizi ikinci haberci tarafından düzenlenmektedir (Nishizuka, 1992, s. 607).

LTP'nin beyinde saniyelerle sınırlı bir sürede tetiklendiği; ancak çok uzun süreli etkiler oluşabildiği bilinmektedir (Malenka ve Nicoll, 1999, s.1870). LTP'nin erken fazı için tetanus oluşması yeterli iken; geç faz için gen transkripsiyonu ve *de novo* protein sentezi gerektirdiği ortaya konulmuştur (Madison vd., 1991, s. 389; Lynch, 2004, s. 90). Diğer bir ifade ile NMDA reseptörünün uyarılması sonucu postsinaptik nörona  $\text{Ca}^{+2}$  girişine bağlı protein kinazların aktivasyonu ve sinapsa yeni reseptörlerin entegrasyonu kısa süreli plastisite ile ilişkili iken; uzun süreli plastisite, çeşitli protein kinazların etkinliğine bağlı olarak nükleusta CREB-1 bağımlı gen aktivasyonu gerektirmektedir.

SSS'de NMDA-bağımlı LTP oluşumunun istisnası CA3-yosunsu lif (mossy fiber) sinapslarıdır (Lynch, 2004, s. 93). Yosunsu lif tipi LTP, NMDA bağımlı LTP'nin aksine presinaptik terminalde aktivite-bağımlı intraselüler  $Ca^{+2}$  konsantrasyonunun yükselmesini gerektirmektedir. Ayrıca, presinaptik kainat reseptörlerinin endojen glutamat tarafından aktive edilmesinin de yosunsu lif tipi LTP'nin tetiklenmesinde fasilitatör bir rolü bulunmaktadır (Malenka ve Bear, 2004, s. 8).

#### ***2.4.2.2. Öğrenme ve bellek süreçlerinde uzun süreli depresyonun rolü***

LTD, uzun paternli bir uyarı sonrasında nöronal sinapsların etkinliğinde saatlerce veya daha da uzun süren aktivite bağımlı bir azalmadır. LTD, LTP'nin tersine, sinaptik kuvvette uzun süreli bir düşüşe neden olur. Hipokampus ve serebellum, LTD süreçlerinin oldukça başarılı biçimde karakterize edildiği yerler olmakla birlikte; LTD oluşumunun SSS'nin başka alanlarında da meydana geldiği bilinmektedir. LTD'nin çeşitli nörotransmitterleri salgılayan farklı nöron türlerinde oluştuğu keşfedilmiş olmakla birlikte; LTD sürecinde rol oynayan ana nörotransmitterin glutamat olduğu bilinmektedir. L-glutamat'ın LTD oluşumu ile ilgili etkilerini, NMDA, AMPA ve metabotropik glutamat reseptörleri üzerinden gerçekleştirdiği düşünülmektedir. LTD'yi serebellar Purkinje hücrelerinde olduğu gibi güçlü bir sinaptik uyarım oluşturabileceği gibi; hipokampusta olduğu gibi zayıf bir sinaptik stimülasyon da indükleyebilir (Massey ve Bashir, 2007, s. 176). LTD'nin hipokampusla ilişkili tüm bellek tiplerine ait bilgilerin kodlanması süreçlerinde işlev gördüğü ve hipokampal LTD'nin eski bellek izlerinin temizlenmesi için önemli olduğu bilinmektedir (Malenka ve Bear, 2004, s. 8; Nicholls vd., 2008, s. 104; Malleret vd., 2010, s. 3813). Benzer şekilde, serebellumda paralel lif-purkinje hücresi sinapslarında oluşan LTD'nin de motor öğrenmede önemli olduğu hipotezi ileri sürülmüştür (Schonewille vd., 2011, s. 43; s. 9).

LTD'nin esas olarak postsinaptik reseptör yoğunluğundaki azalmadan kaynaklandığı düşünülmekle birlikte; presinaptik nörotransmitter salınımında azalmanın da bu süreçte rol oynaması mümkündür (Massey ve Bashir, 2007, s. 176).

Özet olarak LTD, LTP'nin neden olduğu sinaptik güçlendirmeyi yapıcı bir şekilde kullanabilmek için spesifik sinapslarda selektif zayıflatıcı etki gösteren birkaç işlemde biridir. Sinapslardaki söz konusu zayıflatıcı etkinin yaşamsal bir önemi vardır; çünkü sinaptik gücün sürekli artmaya devam etmesi halinde maksimum etkinlik düzeyine ulaşan sinapsların yeni bilgileri kodlaması mümkün olmayacaktır (Purves, 2008, s. 197).

Günümüzde, sinaptik plastisite LTP'nin ve LTD'nin yanı sıra, sinaps morfolojisinde meydana gelen değişiklikler ile de ilişkilendirilmektedir. Örneğin, yeni ve işlevsel dendritik çıkıntılarının (spine) oluşması ya da var olan uzantıların büyümesi gibi değişimlerin sinaptik plastisite ve dolayısıyla bilişsel işlevler açısından önemli olduğu gösterilmiştir (Malenka ve Bear, 2004, s. 7).

### **2.4.3. Öğrenme ve bellek süreçlerinde nörotrofik faktörlerin rolü**

Nöronlar yaşamak, farklılaşmak ve nöroplastisite için kendi salgıladıkları nörotrofik faktörlere gereksinim duymaktadırlar. Nörotrofik faktörler, nöronların gelişimini ve korunmasını sağlayan biyomoleküllerdir. Büyüme için gereken trofik desteği sağlayarak hücre sağkalımını artırır ve hücre ölüm döngülerini inhibe ederler (Kotan vd., 2009, s. 27).

Günümüzde nörotrofik faktörler arasında en iyi tanımlanmış grup nörotrofinler (NT) olarak adlandırılan beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF), sinir büyüme faktörü (NGF), NT-3 ve NT-4/5'ten oluşan gruptur (Hellweg ve Jockers-Scherübl, 1994, s. 2165).

Nörotrofik faktörler, fizyolojik işlevlerini hücre zarı reseptörlerine bağlanıp hücre içi sinyal ileti döngülerini düzenleyerek gerçekleştirmektedirler. Bu moleküllerin tirozin kinaz ailesi reseptörleriyle etkileşerek otfosforilasyon gerçekleştirdikleri ve bu mekanizma ile çeşitli intraselüler sinyal moleküllerini aktive ettikleri bildirilmiştir (McKay vd., 1999, s. 193). NGF, tirozin kinaz (Trk) A reseptörüne; BDNF ve NT-4/5, Trk B reseptörüne; NT-3 ise Trk C reseptörüne bağlanmaktadır (Kotan vd., 2009, s. 27).

NT'lerin yüksek bağlanma gösterdikleri Trk reseptörlerinin yanı sıra; onlardan yapısal olarak farklı olan ve daha düşük bağlanma gösterdikleri pan-nörotrofik reseptörler olan p75 reseptörleri ile de etkileştikleri bildirilmiştir. Nörotrofik faktörler, reseptörlerine bağlandıktan sonra reseptörleri ile beraber hücre içine alınmaktadırlar (Kotan vd., 2009, s. 28; Meakin ve Shooter, 1992, s. 323).

Nörotrofik faktörlerin, trofik etkilerinin yanı sıra; sinir sisteminde sinaptik plastisitede yer alan moleküler olaylara katkıda buldukları ve bilişsel işlevleri destekledikleri bilinmektedir (McKay vd., 1999, s. 193). Örneğin, hipokampusta yaşam boyu üretilen bir nörotrofik faktör olan NGF'nin septal kolinerjik nöronlara retrograd biçimde taşındığı, kolinerjik inputları ve böylece hipokampal plastisiteyi modüle edici etkiler gösterdiği bildirilmiştir. Endojen NGF blokajının hipokampal LTP'yi azalttığı ve uzamsal belleği bozduğu; dolayısıyla NGF'nin intakt erişkin beyinde plastisitenin ve

bellek ile ilgili fizyolojik mekanizmaların düzenlenmesinde önemli bir rolü olduğu rapor edilmiştir (Conner vd., 2009, s. 10883).

Morris su labirenti, korku ile koşullanma ve pasif sakinma gibi testlerde öğrenme performansındaki artışa, BDNF'nin mesajcı ribonükleik asit ekspresyon düzeylerinde hızlı ve geçici bir artışın ve TrkB reseptör aktivasyonunun eşlik etmesi (Yamada ve Nabeshima, 2003, s. 268); anti-BDNF antikoru uygulanmış sıçanlarda pasif sakinma ve Morris su labirenti testlerinde bellek parametrelerinin bozulması (Mu vd., 1999, s. 259; Alonso vd., 2002, s. 551) ve ayrıca NT-3 geni silinmiş farelerde uzamsal belleğin ve DG'de nörogenezin bozulduğunun gösterilmesi (Shimazu vd., 2006, s. 307) nörotrofik faktörlerin bilişsel işlevler açısından önemini ortaya koyan çalışmalardan bazılarıdır.

Klinik çalışmalar, nörotrofik faktörlerin dengesiz dağılımının ve disregülasyonunun Alzheimer hastalığı gibi nörodejeneratif demanslarda karakteristik bir bulgu olduğuna işaret etmektedir (Schindowski vd., 2008, s. 43).

#### **2.4.4. Öğrenme ve bellek süreçlerinde nörogenezin rolü**

Nöronal kök hücrelerinden nöronların üretildiği sürece "nörogenez" adı verilmektedir. Genel kanının aksine, nörogenez yalnızca gelişim sürecindeki beyinde görülmez; nörogenez sürecinin erişkin beynin belirli bölgelerinde aralıksız devam ettiği bilinmektedir (Ernst ve Frisé, 2015, s. e1002045).

Nörogenez, erişkin insan beyninde hipokampal DG ve subgranüler tabakada görülür (Altman, 1963, s. 573; Altman, 1965, s. 319; Altman, 1969, s. 433). Striatumda da yeni nöronlar oluşmakla birlikte, bunlar internöron özellik gösteren ve beynin diğer bölgelerine projekte olmayan nöronlardır. Diğer yandan, memelilerin diğer türlerinde, özellikle kemirgenlerde, yeni oluşan nöronlara *bulbus olfactorius*'ta da rastlanmaktadır (Dayer vd., 2003, s. 563; Vadodaria vd., 2014, s. 1114; Ernst vd., 2014, s. 1072).

Beyinde nörogenez açısından en dikkat çekici bölge DG'dir. DG'de yeni oluşan nöronların bir kısmı, oluştuktan kısa bir süre sonra ölmekte (Shors vd., 2001, s. 372; Dayer vd., 2003, s. 563); diğer bir kısmı ise çevresindeki beyin dokusuna işlevsel olarak entegre olmaktadır (Toni vd., 2007, s. 727; Toni vd., 2008, s. 901; Vivar vd., 2012, s.1107). Yetişkin insanlarda hipokampusa her gün yaklaşık 700 yeni nöron eklenmektedir (Spalding vd., 2013, s.1219).

Erişkin nörogenezinin bilişsel ve emosyonel süreçler üzerinde önemli bir etki potansiyeline sahip olduğu açıktır. Erişkin memeli beyninin DG, *bulbus olfactorius* gibi

bazı özel bölgelerinde progenitör hücrelerin mitotik aktivite gösterdiklerinin, olgun nöronlara dönüşerek işlevsellik kazandıklarının ve yerel sinir ağına entegre olduklarının ortaya konulması, öğrenme ve bellek alanında gerçekleştirilen çalışmalar açısından bir dönüm noktası olmuştur (Bruehl-Jungerman vd., 2007a, s. 93).

Hipokampal erişkin nörogenezinin öğrenme ve bellek için son derece önemli olduğu (Neves vd., 2008, s. 65); nörogenez kapasitesinde artışın bilişsel performansı artırdığı bilinmektedir. Yeni oluşan nöronların; bellek kapasitesini arttırdığı (Becker, 2005, s. 722), anılar arasındaki bulanıklığı azalttığı (Wiskott vd., 2006, s. 329) ve anı-zaman ilişkisini güçlendirdiği (Aimone vd., 2006, s. 723) ileri sürülmüştür.

Diğer yandan, öğrenme etkinliğinin de nörogenezini artırdığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Gould vd., 1999, s. 260). Örneğin, deneklerde hipokampus bağımlı bir öğrenme tipi olan uzamsal öğrenmeyi destekleyen eğitimlerinin, DG’de yeni oluşan nöronların sayısında anlamlı bir artışa yol açtığı gösterilmiştir (Gould vd., 1999, s. 262; Shors vd., 2001, s.372; Dupret vd., 2008, s. 1). Hatta, bazı öğrenme tiplerinin nörogenez bağımlı olduğunu ileri süren araştırmalara rastlamak mümkündür (Shors vd., 2002, s. 578).

#### **2.4.5. Öğrenme ve bellek süreçlerinde glia hücrelerinin rolü**

Glialar, santral ve periferik sinir sistemlerinde nöronlara destek ve koruma sağlayan hücrelerdir. SSS’deki glial hücreler; astrositler, oligodendrositler, ependimal hücreler ve mikroglialardır. Gliaların başlıca fonksiyonları, nöronları çevrelemek ve yerinde tutmak; nöronlara besin maddeleri ve oksijen sağlamak; bir nöronu başka bir nörondan izole etmek; patojenleri ve ölü nöronları yok etmek olarak sıralanabilir (Fields vd., 2014, s. 427).

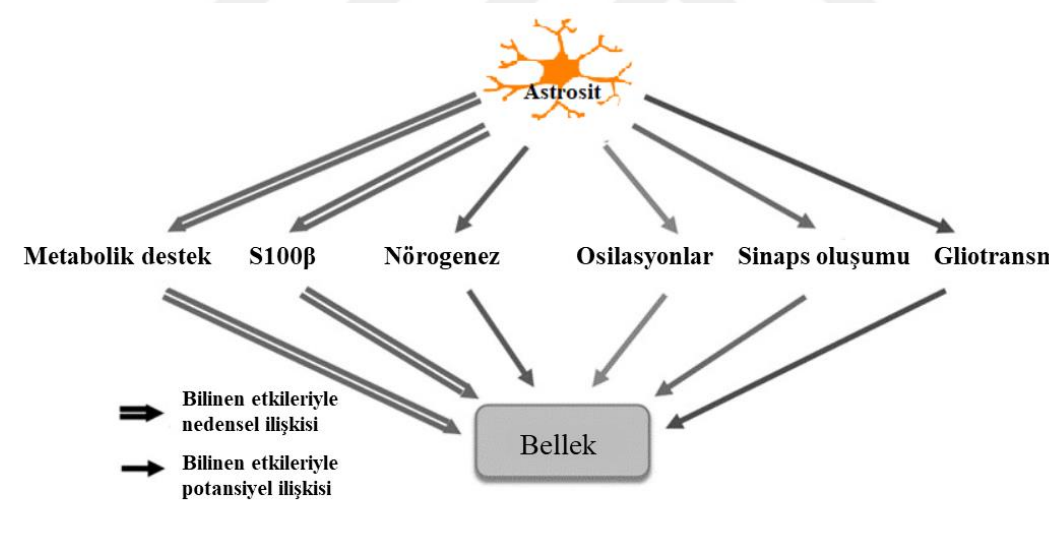
Astrositler, nöronlar ve kan damarları ile yakın temas halinde bulunan ve binlerce nöronu sarmalayan yıldız şeklinde glial hücrelerdir (Genoud vd., 2006, s. 2064; Oberheim vd., 2009, s. 3276). Bu hücrelerin GAP-bağlantılarıyla birbirine bağlanabildikleri ve komşu hücreler arasında çok az örtüşme ile yüksek oranda organize edilmiş anatomik alanlar oluşturabildikleri bilinmektedir (Houades vd., 2008; s. 5207; Oberheim vd., 2009, s. 3276). Sahip oldukları eşsiz morfolojik ve fenotipik özellikler sayesinde, astrositler çevrelerini hissedebilmekte ve çevresel değişikliklere dinamik olarak cevap verebilmektedirler. Astrositlerin glukoz metabolizmasının korunmasını, glutamat ve potasyum düzeylerinin izlenmesini, serebral kan akışının düzenlenmesini ve nörotrofik



faktörlerin sekresyonunu da içeren çok çeşitli homeostatik ve destekleyici fonksiyonlara sahip oldukları bilinmektedir. Söz konusu destekleyici fonksiyonların hepsi normal nöronal işlevlerin sürdürülebilirliği ve dolayısıyla da bilişsel süreçlerin sağlıklı biçimde işlemesi için son derece önemlidir (Adamsky ve Goshen, 2017, s. baskıda).

Astrositlerin sinapslar ile olan uzamsal ilişkileri, homeostatik işlevleri ve sağladıkları metabolik desteğin yanı sıra eksprese ettikleri nörotransmitter reseptörlerinin çeşitliliği, bu hücrelerin SSS’de öğrenme ve bellek gibi özelleşmiş beyin fonksiyonlarına olası katılımlarının yakından incelenmesine neden olmuştur. Son yirmi yılda yapılan araştırmalar, astrositlerin bilgi işleme ve bellek oluşumunun altyapısını oluşturan ve nöronal aktiviteyi doğrudan etkileyen “sinaps oluşumunun regülasyonu”, “sinaptik transmisyon”, “nöromodülasyon” ve “plastisite” gibi işlevler üzerine şaşırtıcı etkileri olduğuna işaret etmiştir (Eroglu ve Barres, 2010, s.223; Araque vd., 2014, s. 728; Adamsky ve Goshen, 2017, s. baskıda).

Astrositlerin bellek süreçlerine katılımı ile ilişkili potansiyel mekanizmalar, **Şekil 2.9.**’da özetlenmiştir.



**Şekil 2.9.** *Astrositlerin bellek süreçlerine katılımı ile ilişkili potansiyel mekanizmalar (Adamsky ve Goshen, 2017, s. baskıda)*

Bellek modülasyonu için astrositlerin ve nöronların karşılıklı etkileşiminin son derece önemli olduğu kabul edilmektedir. Astrositlerin, öğrenme ve bellek süreçleri ile ilgili olumlu etkilerini, yeni sinaptik bağlantıların oluşumunu regüle ederek ve ayrıca var olan sinapslarda modülatör etkiler göstererek gerçekleştirdikleri düşünülmektedir. Sinaptik modülasyon üzerindeki etkilerinin ise bu hücrelerin “sinaptik aktiviteye yanıt verme”, “onu şekillendirme” ve hatta “sinaptik kılıf üzerindeki düzenleyici işlevleri” ile

ilişkili olduğu ileri sürülmüştür. Diğer yandan, astrositlerin doğrudan nöronlar üzerindeki modülatör etkilerinin de bilişsel işlevlerin sürdürülmesi için önemli olduğunun altını çizmek gerekir (Adamsky ve Goshen, 2017, s. baskıda).

Astrositlerdeki veziküler salınımın; öğrenme, depolama ve geri çağırma gibi süreçler ile ilişkili olduğu bilinen gama frekans bandındaki (25-80 Hertz) osilasyonların sürekliliğine ve tanıma belleğine katkıda bulunduğunu ortaya konulmuş ve söz konusu veziküler salınımın bellek oluşumuna ve konsolidasyonuna önemli ölçüde katkıda bulunabileceği ileri sürülmüştür (Başar-Eroglu vd., 1996, s. 101; Lee vd., 2014, s. E3343; Adamsky ve Goshen, 2017, s. baskıda).

Veziküler salınımına ek olarak; astrositlerin sinaptik fonksiyonu modüle etmesine aracılık edebilecek başka mekanizmalar da önerilmiştir. Bunlardan biri de konneksin hemikanallarıdır (Chever vd., 2014, s. 11228; Bazargani ve Attwell, 2016, s. 182). Bellek konsolidasyonu sırasında konneksin<sup>43</sup> hemikanallarının bloke edilmesinin, uzun süreli belleği bozduğu görülmüştür. Söz konusu bellek kaybının astrositlerden salındığı bilinen glutamat, glutamin, laktat, D-serin, glisin ve adenosin trifosfat gibi gliotransmitterlerin karışımının ko-üfüzyonundan sonra düzelebildiği ileri sürülmüştür (Stehberg vd., 2012, s. 3649). Tüm bu bulgular, nöroaktif moleküllerin astrositler tarafından alınımının ve onlar tarafından sağlanmasının bellek oluşumu ve konsolidasyonu için gerekliliğini ortaya koymuştur.

Astrosit-nöron sinyalizasyonunda yer aldığı öne sürülen adaylardan biri de  $Ca^{+2}$  bağlayıcı bir protein olan S100 $\beta$ 'dir. Esas olarak astrositlerde sentezlendiği düşünülen bu protein, immunohistokimyasal çalışmalarda bir belirteç olarak kullanılmaktadır. İnsan S100 $\beta$ 'sını aşırı düzeyde eksprese eden transgenik farelerin, hipokampal LTP oluşumlarında ve uzamsal öğrenme yeteneklerinde bozulma olduğu (Gerlai vd., 1995, s. 26); buna karşılık S100 $\beta$ 'dan yoksun mutant farelerde hipokampal LTP'nin arttığı ve hipokampus bağımlı öğrenme ve bellek işlevlerinin güçlendiği belirlenmiştir (Nishiyama vd., 2002, s. 4037).

Astrositlerin, iyonların ve enerji substratlarının nöronlar ve lokal kan akımı arasındaki değişimini kontrol ettikleri bilinmektedir (Moore ve Cao, 2008, s. 2035). Güncel çalışmalar, astrositlerin sağladığı metabolik desteğin, civcivlerde ve kemirgenlerde bellek oluşumunda önemli rol oynadığına işaret etmiştir (Hertz ve Gibbs, 2009, s.10; Suzuki vd., 2011, s. 810). Örneğin, bellek depolama işleminin ilk aşaması sırasında, glikojenolizin farmakolojik yolla inhibisyonunun, öğrenilen görevin geri

çağrılmasını engellediği gösterilmiştir. Glikojenoliz engellendiğinde, ekzojen laktat uygulamasının bellek bozukluğunun tamirine yardımcı olmuş olması, astrosit ile nöron arasındaki laktat taşınımının sinaptik plastisite ve uzun süreli bellek konsolidasyonu için gerekli olduğunun bir işareti olarak kabul edilebilir (Suzuki vd., 2011, s. 810). Diğer yandan, bilişsel performansta ilaç kullanımına bağlı artışın da astrositler tarafından nöronlara sağlanan metabolik destek ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Boury-Jamot vd., 2016a, s. 1070, Boury-Jamot vd., 2016b, s. 1266; Zhang vd., 2016, s. 928).

## 2.5. Deneysel Amnezi Modelleri

Amnezi terimi; beyin hasarına yol açan cerrahi girişim, hastalık, fiziksel ya da psikolojik travma gibi nedenlerden kaynaklanan bellek bozuklukları ve kayıplarını ifade eder. Amnezik bireylerde tipik olarak belirli bellek türlerinde veya bellek işleme süreçlerinde eksiklikler görülür. Amnezi kısa süreli bellek, çalışma belleği ve uzun süreli bellek yeteneklerini çeşitli düzeylerde etkileyebilmektedir. Hasar oluşumundan öncesine ait olaylar ve bilgilere ait bellek kayıpları retrograd amnezi olarak adlandırılır. Lezyon sonrasında meydana gelen olaylara ait bellek kaybı ise anterograd amnezi olarak bilinmektedir (Gazzaniga vd., 2014, s. 382).

Öğrenme, bellek ve dikkatin fizyolojik ve nörolojik temellerinin aydınlatılması, potansiyel terapötik ajanların etkilerinin araştırılması, çevresel kirleticilerin ve ilaç suistimalinin neden olduğu nörotoksik etkilerinin test edilmesinde deney hayvanı modelleri kritik bir önem taşımaktadır. Bilişsel işlev bozukluklarını araştırmak üzere en yaygın kullanılan yöntemler, bellek bozukluğunun farmakolojik ajanlar ile indüklendiği modellerdir. Farmakolojik modeller, Alzheimer hastalığı ve yaşlanma ile ilişkili diğer demans tablolarının ve ayrıca Parkinson hastalığı ve şizofreni gibi hastalıklara eşlik eden bilişsel bozuklukların tedavisinde potansiyel nootropik ajanların olası etkilerinin test edilmesi için anahtar niteliğindedir (Levin ve Buccafusco, 2006, s. 1).

Günümüzden yaklaşık yarım yüzyıl önce, görece düşük doz muskarinik reseptör antagonisti uygulanan genç gönüllülerde, yaşlılardakine benzer bilişsel gerileme belirtilerinin görülmüş olması; beynin kolinerjik sisteminin bilişsel işlevler açısından önemini ortaya koymuştur (Drachman ve Leavitt, 1974, s. 121). Nitekim, SSS'de kolinerjik fonksiyon kaybının Alzheimer hastalığı ve senil demans ile yakından ilişkili olduğu bilinmektedir (Terry, 2006, s. 6).

Kolinerjik sistemin bilişsel işlevler için kritik önemini ortaya konulmasını takiben, non-selektif muskarinik reseptör antagonisti bir madde olan “SCP” deney hayvanlarında bilişsel işlev bozukluğunu indüklemek amacı ile kullanılmaya başlanmıştır. Böylece, SCP ile indüklenmiş deneysel amnezi modelleri; Morris su labirenti (Terry vd., 1999, s. 97; Bejar vd., 1999, s. 231; Buckton vd., 2001, s. 229; Albiston vd., 2004, s. 239), T-labirent (Spangler vd., 1986, s. 673), Y-labirent (Kwon vd., 2010, s. 210), radyal kollu labirent (Dennes ve Barnes, 1993, s. 435; Ormerod, ve Beninger, 2002, s. 139), pasif sakınma (Bejar vd., 1999, s. 231; Albiston vd., 2004, s. 239; Foley vd., 2004, s. 93) ve korku koşullandırması (Wallenstein ve Vago, 2001, s. 245) gibi öğrenme ve bellek testleri ile kombine edilerek kullanılmaya başlanmıştır.

SCP'nin yanı sıra bilişsel fonksiyonları bozduğu bilinen atropin (Nilsson ve Gage, 1993, s.487; Fontana vd., 1997, s.689), pirenzepin (Sala vd., 1991, s. 45), triheksifenidil, biperiden (Roldan vd., 1997, s. 93), benztropin (Jones ve Shannon, 2000, s. 1071), disiklomin (Fornari vd., 2000, s. 287) gibi diğer muskarinik reseptör antagonistlerinin de deneysel amnezi modeli oluşturmak amacıyla kullanılabildiği rapor edilmiştir.

Literatürde, muskarinik reseptörlerin yanı sıra; nikotinik reseptörlerin de bilişsel performans ile ilişkili süreçlere katıldığına ve bu reseptörleri uyaran ajanların nootropik etkili olduklarına ilişkin çalışmalara rastlamak mümkündür (Levin, 1992, s. 417; Decker vd., 1993, s. 571; Levin, 1996, s. 188). Muskarinik reseptör blokörü SCP'ye benzer biçimde non-selektif, non-kompetitif bir nikotinik reseptör antagonisti olan mekamilamin'in de rodentlerde amnezi oluşturmak amacı ile kullanılabildiği bilinmektedir (Roegge ve Levin, 2006, s. 22).

Beynin öğrenme ve bellek süreçleri ile ilişkili diğer bir nöromedyatörü de glutamattır. Glutamat, bilişsel işlevler üzerindeki etkilerini özellikle NMDA reseptörleri aracılığı ile gösterir (Rezvani, 2006, s.38). Dolayısıyla, NMDA reseptörlerini bloke eden dizosilpin (MK-801), ketamin, fensiklidin ve 2-amino-5-fosfonopentanoat gibi ajanlar, deney hayvanlarında bilişsel işlev bozukluğu indüklemek için kullanılabilmektedir. NMDA-reseptör antagonistlerinin, özellikle hipokampus ya da amigdala ile ilişkili bilişsel performansı bozduğu gösterilmiştir (Rezvani, 2006, s.39).

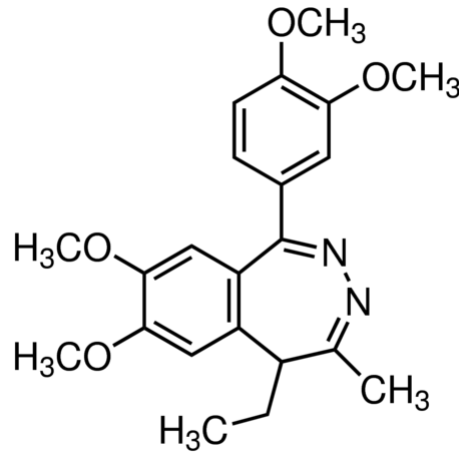
Literatürde kolinerjik ve glutaminerjik mekanizmaları hedef alan bilişsel bozukluk modellerinin yanı sıra; amnezi indüksiyonu amacıyla midazolam (Hirshmana vd., 2002, s. 499; Quevedo vd., 2002, s. 319), diazepam (Prabhakar vd., 2008, s. 27; Costa vd., 2010, s. 1756), klordiazepoksit (Nabeshima vd., 1990, s. 233) gibi benzodiazepinlerin ve

etanolün (Raghavendra ve Kulkarni, 2001, s. 595; Singh vd., 2003, s. 1245; Rezayof vd., 2010, s. 260) kullanıldığı çalışmalara da rastlamak mümkündür.

## 2.6. Tofisopam

1960 yıllarının ortalarında, klasik 1,4-benzodiazepin halka sistemindeki nitrojen atomlarının pozisyonlarının değiştirilmesi ile bir seri yeni kimyasal sentezlenmiştir. Bu kimyasallar benzodiazepin halka yapısında bulunan azot atomlarının pozisyonlarından dolayı 2,3-benzodiazepinler (homofitalazinler) olarak adlandırılmıştır (Szénási ve Hársing, 2004, s. 69; Hamed vd., 2007, s. 109). TOF, bu gruba ait ilk ilaçtır (**Şekil 2.10.**).

Farmakokinetik profili açısından TOF'un absorpsiyonunun ve dağılımının (sıçanlarda  $t_{max}=0,5-1$  saat, insanlarda  $t_{max}=1-1,5$  saat) oldukça hızlı olduğunu söylemek mümkündür. Ayrıca, plazma yarılanma ömrünün insanda 15-21 saat olduğu bilinmektedir (Klebovich ve Abermann, 1993, s. 83).



**Şekil 2.10.** Tofisopam'ın kimyasal yapısı [1-(3, 4-dimetoksifenil)-5-etil-7, 8 dimetoksi-4-metil-5H-2, 3-benzodiazepin]

Sedatif-hipnotik, kas gevşetici ve antikonvülzan etkiler göstermeksizin anksiyolitik, antiparkinson ve vejetatif modülatör etkilere sahip bir ilaç olan TOF, Grandaxin® adı ile ilk olarak 1976 yılında ruhsatlandırılmıştır (Pellow ve File, 1986, s. 212; Andrási vd., 1987, s. 1119; Szegó vd., 1993, s. 91; Kalashnikov vd., 2002, s. 59; Szénási ve Hársing, 2004, s. 69; Hamed vd., 2007, s. 109). TOF, günümüzde Çek Cumhuriyeti, Macaristan, Rusya ve Japonya dahil olmak üzere 15'den fazla ülkede anksiyete bozukluklarının tedavisi için reçete edilmektedir (Srivastava vd., 2014, s. 154; Rx Media Pharma®, 2017;).

TOF'un da üyesi olduğu homofitalazinin etki mekanizmaları halen kesinleşmemiş olmakla birlikte beyinde etkileştikleri bölgelerin 1,4-benzodiazepinlere göre farklılık gösterdiği bilinmektedir (Fekete vd., 1997, s. 175). Homofitalazinin farmakolojik etki mekanizmalarının GABA<sub>A</sub>erjik, dopaminerjik ve opioidlerjik sistemler ile ilişkili olabileceğini ileri süren çalışmalar bulunmaktadır.

GABA<sub>A</sub>erjik sistem ile ilişkili olarak, homofitalazinin GABA<sub>A</sub>-benzodiazepin reseptör kompleksine afinite göstermedikleri; ancak 1,4-benzodiazepinlerin bu reseptörün benzodiazepin bağlanma bölgesine olan afinitelerini artırdıkları bildirilmiştir. Homofitalazinin GABA<sub>A</sub> reseptörlerine musimol bağlanmasını da artırdıkları gösterilmiştir (Saano, 1986, s. 201; Andrási vd., 1987, s. 1119; Hamed vd., 2007, s. 109).

TOF'un dopaminerjik sistem ile ilişkisinin araştırıldığı klinik bir çalışmada, günde iki kez 100 mg dozunda TOF uygulamasının, hastaların serebrospinal sıvılarında homovanilikasit konsantrasyonunu belirgin bir şekilde azalttığı tespit edilmiştir. TOF'un SSS'de dopamin agonisti benzeri davranış sergileyebileceği öne sürülmüştür. TOF'un dopaminerjik agonist bir ilaç olan apomorfin ile ya da indirekt agonistler olan amfetamin ve amineptin ile birlikte uygulanmasının, bu ilaçların davranış üzerindeki etkilerini potansiyelize ettiği gösterilmiştir (Hovi-viander vd., 1985, s. 492). Diğer yandan, lityum ile kronik tedavinin, dopaminerjik ilaçların etkinliğinde TOF aracılıklı potansiyelizasyonu engellediği gösterilmiştir. Bu bulgu TOF'un, santral dopaminerjik reseptör duyarlılığında, lityum ile engellenebilen bir artışa neden olduğuna işaret etmiştir (Chopin vd., 1985, s. 917). Dopaminerjik sinyal transdüksiyonu ile ilişkili olarak yapılan diğer bazı çalışmalar, homofitalazinin dopaminerjik reseptörler üzerine karışık tip agonist/antagonist benzeri etkiler gösterdiklerini ortaya koymuştur (Pellow ve File, 1986, s. 221). Diğer yandan, bu maddelerin etkilerini beyinde nigrostriatal sistemde kendilerine özgü bağlanma bölgelerinde, özel bir sinyal transdüksiyonu aracılığı ile gösteriyor olmaları da mümkündür (Fekete vd., 1997, s.175; Horváth vd., 2000, s. 309; Hamed vd., 2007, s.110).

Homofitalazinin farmakolojik etkilerinin opioid sinyal transdüksiyonu ile ilişkili olabileceğini düşündüren çalışmalar da bulunmaktadır. Bu maddelerin opioid agonistlerinin etkinliğini selektif olarak artırdıkları hem *in vivo* hem de *in vitro* çalışmalar ile gösterilmiştir (Fekete vd., 1997, s. 175; Horváth vd., 2000, s. 309; Hamed vd., 2007, s. 110). Örneğin, TOF ve benzeri bileşiklerin opioidlerin antinosiseptif etkilerini potansiyelize edebildiği bildirilmiştir (Horváth vd., 2000, s.309). Homofitalazinin

farmakolojik etkinliklerinin morfin toleransı olan hayvanlarda ortadan kalkması, bu bileşiklerin etki mekanizmalarının opioid nörotransmisyonu ile ilişkili olabileceğine işaret eden diğer bir bulgudur (Fekete, 1997, s. 175). Diğer yandan bu ilaçların, opioidlerden ve benzodiazepinlerden farklı olarak bağımlılık yapıcı özelliklerinin olmadığı ileri sürülmüştür (Srivastava vd., 2014, s. 154).

TOF'un R-enantiomeri olan dekstofisopam'ın ise klasik reseptörlere veya iyon kanallarına belirgin bir afinite göstermediği; ancak SSS'de özel bir bağlanma bölgesine sahip olduğu ileri sürülmüştür. Söz konusu bağlanma bölgesinin klasik 1,4- veya 1,5-benzodiazepin reseptörlerinden farklı olduğu ve 2,3-benzodiazepin reseptörü olarak karakterize edilebileceği bildirilmiştir (Leventer vd., 2008, s. 198). Bazı araştırma grupları, bu reseptörleri "girisopam bağlanma bölgesi" olarak adlandırmıştır (Rundfeldt vd., 2010, s. 1319). Kortikal bölgelerde yoğunlaşan klasik benzodiazepin reseptörlerinin aksine; 2,3-benzodiazepin reseptörlerinin subkortikal ganglia, *substantia nigra* ve hipotalamus'ta lokalize olduğu bildirilmiştir (Leventer vd., 2008, s. 198).

Homofitalazinlerin etki mekanizmalarına ilişkin bir başka yaklaşım ise hedef proteinin bir reseptör molekülü değil; sinyal iletim süreçlerinde rol oynayan proteinlerin fosforilasyonunda rol alan düzenleyici bir molekül olabileceğine ilişkin varsayımdır (Horváth vd., 2000, s. 309).

TOF'un PDE 1, 2, 3, 4, 5 ve 10 izoenzimlerine yüksek afinite ile bağlandığı ve bu enzimleri inhibe ettiği bilinmektedir (Bernard vd., 2008, s. 3196; Rundfeldt vd., 2010, s. 1323). Bu ilacın PDE-2, PDE-4 ve PDE-10 izoenzimlerine gösterdiği afinitenin, rolipram'ın PDE-4 enzimine olan afinitesinden daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Bernard vd., 2008, s. 3196; Rundfeldt vd., 2010, s. 1323). PDE enzim inhibitörlerinin beyindeki sinyal yollarında sAMP ve/veya sGMP düzeylerini yükselttikleri; bu ikinci habercilerin de bellek konsolidasyonu için gerekli olan CREB miktarlarını artırarak öğrenme ve bellek süreçlerini güçlendirdikleri bilinmektedir (Heckman vd., 2015, s.108). Nitekim, rolipram ve zaprinast gibi PDE enzim inhibitörlerinin bilişsel performansı artırdıkları bilinmektedir (Kanes vd. 2007, s. 239; Akar, 2014, s. 105; Akar vd., 2015, s. 86). TOF'un selektif PDE inhibisyonu yaparak psikozun adjuvant tedavisinde özellikle negatif ve kognitif semptomlarının giderilmesinde yararlı olabileceği bildirilmiştir (Rundfeldt vd., 2010, s. 1323).

Anksiyete tedavisi için kullanılan klasik 1,4-benzodiazepinlerin bilişsel işlevlerde neden olduğu aksaklıklar göz önünde bulundurulduğunda (Chapouthier ve Venault, 2002,

s. 841; Inamura vd., 2015, s. 171), anksiyolitik bir ilaç olan TOF'un PDE enzim inhibitörü etkinliği ile ilişkili olarak sahip olduğu nootropik etki potansiyelinin terapötik açıdan oldukça değerli olabileceği açıktır. Bununla birlikte, literatürde TOF'un bilişsel işlevler üzerine etkisine ilişkin çalışmalar son derece sınırlı sayıdadır. Bunlardan biri, Szegó ve arkadaşları tarafından 1993 yılında yapılmıştır. Söz konusu çalışmada TOF'un psikomotor ve entelektüel performansı bozmadığı; hatta aksine hafif stimüle edici etkisi olduğu ileri sürülmüştür (Szegó vd., 1993, s. 91). Arushanian ve arkadaşları tarafından yapılan diğer bir çalışmada ise, TOF'un tekrarlı uygulanmalarının genç erişkinlerde görsel ve sözel kısa süreli belleği iyileştirdiği bildirilmiştir (Arushanian vd., 2004, s. 23). Dikkat üzerinde olumsuz etkiler göstermemesi, bağımlılık ve tolerans gelişimi gibi sorunlara neden olmaması da bu ilacın üstün yönleri olarak bildirilmiştir (Srivastava vd., 2014, s. 154).

Bu bilgilerin ışığında, bu tez çalışmasında, bilişsel performansı artırıcı potansiyele sahip bir ilaç olan TOF'un bellek bozuklukları üzerine olası teapötik etkilerinin araştırılması planlanmıştır.



### 3. GEREÇLER

#### 3.1. DeneY Hayvanları

DeneYler için 200-250 g ağırlığında, aynı yaşta, erkek Wistar sıçanlar kullanılmıştır. DeneYlerde kullanılan hayvanlar 12 saat karanlık 12 saat aydınlık döngüsünde (ışıklar 8<sup>00</sup>-20<sup>00</sup> arasında açılmaktadır), 24 ± 1°C sıcaklıktaki iyi havalandırılan odalarda bulundurulmuş ve standart hayvan yemi ile beslenmişlerdir.

#### 3.2. Kullanılan Kimyasal Madde ve İlaçlar

Tofisopam (Grandaxin®)	(Egis PLC, Budapest, Macaristan)
Pirasetam (Nootropil®)	(UCB Pharma, İstanbul, Türkiye)
Skopolamin hidrobromür	(Sigma, St. Louis, MO, ABD)
GFAP (glial fibriler asidik protein) Ab-6	(Thermo Scientific, MA, ABD)
Sinaptofizin Ab-2 (Clone SYP02)	(Thermo Scientific, MA, ABD)
Ki-67 tavşan poliklonal antikoru	(Thermo Scientific, MA, ABD)
Halotan	(Sigma, St. Louis, MO, ABD)
UltrAB diluent (antijen seyreltici)	(Thermo Scientific, MA, ABD)
UltraVision quanto detection system HRP	(Thermo Scientific, MA, ABD)
Sitrik asit	(Merck, Darmstadt, Almanya)
Trisodyum sitrat	(Merck, Darmstadt, Almanya)
Monobazik potasyum fosfat	(Sigma, St. Louis, MO, ABD)
Dibazik sodyum fosfat	(Sigma, St. Louis, MO, ABD)
Parafin	(Sigma, St. Louis, MO, ABD)
Paraformaldehit	(Sigma, St. Louis, MO, ABD)

Hidrojen peroksit	(Sigma, St. Louis, MO, ABD)
Ksilen	(Sigma, St. Louis, MO, ABD)
Sodyum karboksimetil selüloz	(Sigma, St. Louis, MO, ABD)
Tween® 80	(Sigma, St. Louis, MO, ABD)
Etanol	(Sigma, St. Louis, MO, ABD)
Serum fizyolojik	(Adeka, Samsun, Türkiye)

### 3.3. Kullanılan Cihazlar

Pasif sakınma cihazı	(Ugo Basile, 7551, Verase, İtalya)
Morris su labirenti test cihazı	(Ugo Basile, 40185, Verase, İtalya)
Aktivite kafesi cihazı	(Ugo Basile, 7420, Verase, İtalya)
Rota-rod cihazı	(Ugo Basile, 47700, Verase, İtalya)
Perfüzyon cihazı	(Cole-Parmer Instrument Co., Vera Manostat® pump, IL, ABD)
Mikrotom cihazı	(Thermo Scientific, Shandon AS325, MA, ABD)
StereoInvestigator görüntüleme sistemi	(MicroBrightField Inc., VT, ABD)
Işık mikroskobu	(Leica, DM3000, Wetzlar, Almanya)
Hassas terazi	(Ohaus, E 12140, Greifensee, İsviçre)
Kronometre	

## 4. YÖNTEMLER

### 4.1. İlaç Uygulamaları

TOF, sıçanlara 50, 100 ya da 200 mg/kg dozlarda gastrik gavaj (per oral, *p.o.*) ile uygulanmıştır (Ozawa ve ark., 1994, s. 181). Pozitif kontrol olarak tercih edilen pirasetam (PRS)'in dozu ise 200 mg/kg (*p.o.*) olarak belirlenmiştir (Alikatte vd., 2012, s.844). Kontrol çözeltisi olarak TOF'u çözmekte kullanılan %5 karboksimetilselüloz - Na / % 0,04'lük Tween 80 (w/w) çözeltisi kullanılmıştır.

TOF, PRS ve kontrol çözeltisi 7 gün süre ile her gün birer kez uygulanmıştır.

### 4.2. Deneysel Amnezi Modelinin Oluşturulması

Öğrenme ve bellek parametrelerinin değerlendirildiği testlerde SCP ile indüklenmiş amnezi modeli oluşturmak amacıyla ilişkili deney gruplarına edinim denemelerinden 30 dakika önce 0,5 mg/kg (*i.p.*) dozunda SCP uygulanmıştır (Guan ve ark., 2010, s. 222).

Deney grupları aşağıdaki biçimde oluşturulmuştur;

Motor aktivite deneyleri için,

Kontrol grubu : 7 gün süre ile her gün düzenli olarak %5 karboksimetilselüloz - Na / % 0,04'lük Tween 80 (w/w) solüsyonu uygulanan grup.

TOF (50 mg/kg) : 7 gün süre ile her gün düzenli olarak 50 mg/kg dozda TOF uygulanan grup.

TOF (100 mg/kg) : 7 gün süre ile her gün düzenli olarak 100 mg/kg dozda TOF uygulanan grup.

TOF (200 mg/kg) : 7 gün süre ile her gün düzenli olarak 200 mg/kg dozda TOF uygulanan grup.

Morris su labirenti, pasif sakınma ve motor aktivite testleri (aktivite kafesi ve Rota-rod) için, her biri 8'er sıçandan oluşan ayrı ayrı gruplar oluşturulmuştur.

Öğrenme deneyleri için,

Kontrol grubu : 7 gün süre ile her gün düzenli olarak %5 karboksimetilselüloz - Na / % 0,04'lük Tween 80 (w/w) solüsyonu ve edinim denemelerinin 30 dakika öncesinde serum fizyolojik uygulanan grup.

SCP grubu : 7 gün süre ile her gün düzenli olarak %5 karboksimetilselüloz - Na / % 0,04'lük Tween 80 (w/w) solüsyonu ve edinim denemelerinin 30 dakika öncesinde 0,5 mg/kg SCP uygulanan grup.

SCP + PRS (200 mg/kg) grubu : 7 gün süre ile 200 mg/kg dozunda PRS ve edinim denemelerinin 30 dakika öncesinde 0,5 mg/kg SCP uygulanan grup.

SCP + TOF (50 mg/kg) grubu : 7 gün süre ile her gün düzenli olarak 50 mg/kg dozunda TOF ve edinim denemelerinin 30 dakika öncesinde 0,5 mg/kg SCP uygulanan grup.

İmmünohistokimyasal incelemeler ilgili deney gruplarındaki sıçanların davranış deneylerinin bitimini takiben gerçekleştirilmiştir.

### **4.3. Motor Aktivitenin Değerlendirilmesi**

#### **4.3.1. Aktivite kafesi testi**

Davranış deneylerinin gerçekleştirildiği tüm gruplardaki hayvanların dikey ve yatay lokomotor aktivite sayıları, aktivite kafesi cihazı ile 10 dakika boyunca kaydedilmiştir (Can vd., 2011, s. 1971).

#### **4.3.2. Rota-rod testi**

Motor koordinasyon parametrelerindeki olası değişikliklerin değerlendirilmesi amacıyla Rota-rod cihazı (Ugo Basile, 47700, Varese, Italya) kullanılmıştır. Deneye alınacak hayvanlara, uygulamalardan önce üç gün süre ile alıştırma (training) yapılmış; test günü cihaz 8 rpm sabit hıza ayarlanmış ve sıçanların dönen milin üzerinden düşme süreleri kaydedilmiştir (Spolidório vd., 2007, s. 185).

## **4.4. Öğrenme ve Bellek Parametrelerinin Değerlendirilmesi**

### **4.4.1. Pasif sakinme testi**

Pasif sakinme testi, korku ile koşullandırılmış duygusal belleğin değerlendirilmesi için kullanılmıştır (Gacar ve ark., 2011, s.317). Cihaz 22x21x22 cm ölçülerinde iki farklı bölmeden oluşmaktadır. Aydınlatılmış beyaz bölme, elektrik akımı uygulayabilen (0,5 mA) ızgara zemine sahip karanlık bir bölmeye bağlıdır. Kaçınılması olanaksız elektrik akımı, bir şok jeneratörü aracılığı ile deney hayvanının ayaklarına uygulanmaktadır. Bölmeler, zemininde otomatik işleyen sürgülü bir kapı bulunduran düz bir kesit ile ayrılmaktadır.

Hayvanlara deneyin başlangıcında bir deneme eğitimi uygulanmıştır. Bu amaçla aydınlık bölmeye bırakılmış olan sıçanların; bölmeler arasındaki kapının 30 saniye sonra açılması ile karanlık alana serbestçe geçmeleri sağlanmıştır. 15 dakika sonra da edinim denemesi uygulanmıştır. Deney hayvanları tekrar aydınlık bölmeye yerleştirilmiş ve 30 saniyelik bir alışma periyodu sonrasında bölmeler arası kapı açılarak, deney hayvanının karanlık alana ilk geçiş süresi (İGS) olarak kaydedilmiştir. Deney hayvanının aydınlık bölmeden karanlık alana geçişi 300 saniye içerisinde gerçekleşmezse, deney hayvanı deneyden elimine edilmiştir. Deney hayvanı karanlık alana tamamen girdiğinde, bölmeler arasındaki kapı otomatik olarak kapanmış ve ızgara zemin aracılığı ile 3 saniye süren 0,5 mA'lık elektrik şoku deney hayvanının ayaklarına uygulanmıştır. Daha sonra deney hayvanı cihazdan uzaklaştırılarak kafesine konulmuştur. Edinim denemeleri arasında her bir bölme, olası koku ipuçlarını ortadan kaldırmak amacıyla temizlenmiştir.

Edinim denemesinden 24 saat sonra bellek denemesi uygulanmıştır. Ağrılı uyaran ile edinilen bellek, deney hayvanlarının karanlık alana ikinci giriş sürelerindeki (İkGS) gecikmenin kaydedilmesi ile değerlendirilmiştir. Bu deneme süresince elektrik şoku verilmemiştir. Deney hayvanının karanlık alana girmesi için maksimum 300 saniye beklenmiştir.

### **4.4.2. Morris su labirenti testi**

Morris su labirenti testi, deney hayvanlarında uzamsal öğrenme ve bellek işlevlerini değerlendirmek amacıyla gerçekleştirilmiştir.

Test cihazı, 60 cm yükseklikte ve 150 cm çapında dairesel bir tanktır. Tank,  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  su ile 50 cm yüksekliğe kadar doldurulmuş ve silindirik kaçış platformu, su seviyesinin 2 cm altında kalacak şekilde deney süresince hep aynı bölmeye yerleştirmiştir

(Grünblatt vd., 2007, s.761-762). Tankın içerisindeki su, kaçış platformunu gizleyecek şekilde süt tozu ile opak hale getirilmiştir.

Sıçanlar 4 gün boyunca her gün 5 dakikalık aralarla birbirini takip eden dört denemeye tabi tutulmuştur. Deneye alınan sıçan yüzü tank duvarına bakacak şekilde, tankın hipotetik olarak bölünmüş dört eşit kadransından birine nazikçe yerleştirilmiştir. Sıçanlar, her yeni denemede takip eden bölmeden olmak üzere suya bırakılmış ve platformu keşfetmelerine kadar geçen süre “kaçış süresi” (escape latency) olarak kaydedilmiştir. Suyu bırakılan sıçanın kaçış platformunu keşfetmesi için 120 saniye zaman tanınmış (cut-off) ve platformu bulan hayvanın platform üzerinde 20 saniye kalmasına izin verilmiştir. Platformun 120 saniyelik sürede keşfedilememesi durumunda hayvan manuel olarak platforma yönlendirilmiştir. Deneye alınan hayvan, edinim denemelerinin bitiminde bir havlu ile kurularak tekrar barındırıldığı kafese yerleştirilmiştir.

Edinim denemelerinin sonunda (5. gün) platform tank içinden alınmış ve hayvanların tank içerisinde 120 saniye süre ile serbestçe yüzmelerine izin verilmiştir. Bu denemelerde hayvanların hedef kadranda geçirdikleri süre kaydedilmiştir (Sharma ve Singh, 2011, s. 679).

#### **4.5. Doku İşleme ve İmmünohistokimyasal Boyama Protokolü**

İmmünohistokimyasal incelemelere alınan tüm sıçan gruplarına davranış deneyleri sonrasında halotan ile anestezi uygulanmıştır. Sıçanlar transkardiyal olarak önce 0,1 M fosfat tamponlu serum fizyolojik (pH 7,4) ile ardından fosfat tamponu içindeki % 4'lük paraformaldehit ile perfüze edilmiştir. Beyin, serebellum ve olfaktör bulbus da dâhil olmak üzere, disekte edildikten sonra gece boyunca % 4'lük paraformaldehit içerisinde post-fiksasyona tabi tutulmuştur. Tespit edilen dokular, artan konsantrasyonda etanol serisinden geçirilip dehidrate edildikten sonra ksilen ile saydamlaştırılma ve parafin ile sertleştirme işlemleri uygulanmıştır. Sertleştirilen beyin dokuları parafin bloklara gömülmüştür.

Daha sonra, mikrotom ile koronal planda 3 µm kalınlığında alınan doku kesitleri arasından, hipokampusu ayırt etmek amacıyla, bregma referans noktasına göre -2,52 mm (Paxinos ve Watson, 2007, s. 54), -3,00 mm (Paxinos ve Watson, 2007, s. 58) ve -3,48 mm (Paxinos ve Watson, 2007, s. 62) koordinatları ile uyumlu kesitler seçilmiştir.

Seçilen kesitler, bir fırça yardımıyla 45°C'lik su banyosuna alındıktan sonra pozitif şarjlı lamlara monte edilmiştir. Daha sonra, 70°C'deki etüvde 30 dakika bekletilmiş ve üç ayrı ksilen kabında 10'ar dakikalık deparafinizasyon işlemi tamamlanmıştır. Örnekler bu işlemi takiben, önce azalan konsantrasyonda etanol serisi, sonra musluk suyu ve sonra da distile su ile 1'er dakika muamele edilerek hidrate edilmiştir.

İmmünohistokimyasal boyama öncesinde kesitlerde oluşabilecek antijen maskelenmesini elimine etmek amacıyla; kesitler 10 mM, pH 6,0 sitrat tamponu içerisinde yüksek basınçta kaynama noktasına kadar ısıtılarak antijen retrieval protokolü uygulanmıştır. Oda sıcaklığında soğutulan preparatlar boyama işlemine alınmıştır.

Hipokampal formasyonda astrositleri tespit etmek için anti-GFAP, sinaptik yoğunluğun incelenmesi amacıyla anti-sinaptofizin ve hücre proliferasyonu düzeylerinin tayini amacıyla da anti-Ki67 antikörleri kullanılarak immünohistokimyasal olarak boyanmıştır.

Boyama işleminin tamamı, kapalı bir kutu içerisinde nemli bir ortamda gerçekleştirilmiştir. Lamlara monte edilmiş dokuların etrafı doku sınırlama kalem ile sınırlandırılmıştır. Kesitlerde endojen peroksidaz aktivitesinin önlenmesi için %3'lük hidrojen peroksit çözeltisi ve non-spesifik zemin boyanmasını önlemek için 20 dakika süreyle blokaj solüsyonu uygulanmıştır. Bu işlemleri takiben, primer antikör uygulaması gerçekleştirilmiş ve dokular 8 saat oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Ardından primer antikör amplifiye edici solüsyonda 30 dakika ve Horseradish peroksidaz (yabanturbu peroksidaz enzimi) polimer solüsyonunda da 20 dakika inkübe edilmiştir. Boyama işlemi süresince blokaj solüsyonu uygulanması basamağı dışındaki tüm işlemlerden sonra kesitler nötral pH'lı fosfat tamponu ile yıkanmıştır.

Kesitlerin görünür hale getirilmesi amacıyla, 3 dakika süre ile 3,3'-diaminobenzidin uygulanmış ve sonra akan musluk suyu ile yıkama yapılmıştır. Zıt boyama için tüm preparatlara 1 dakika Harris hematoksilen boyası uygulanmış ve sonra yine akan musluk suyu ile yıkama yapılmıştır. Zıt boyama işleminin ardından, lamlar artan konsantrasyonda etanol serisi ve ksilen ile çalkalanmış ve sonra ksilen bazlı kapama maddesi kullanılarak kapatılmıştır.

#### 4.6. Işık Mikroskopisi ve İmmünoaktivitenin Değerlendirilmesi

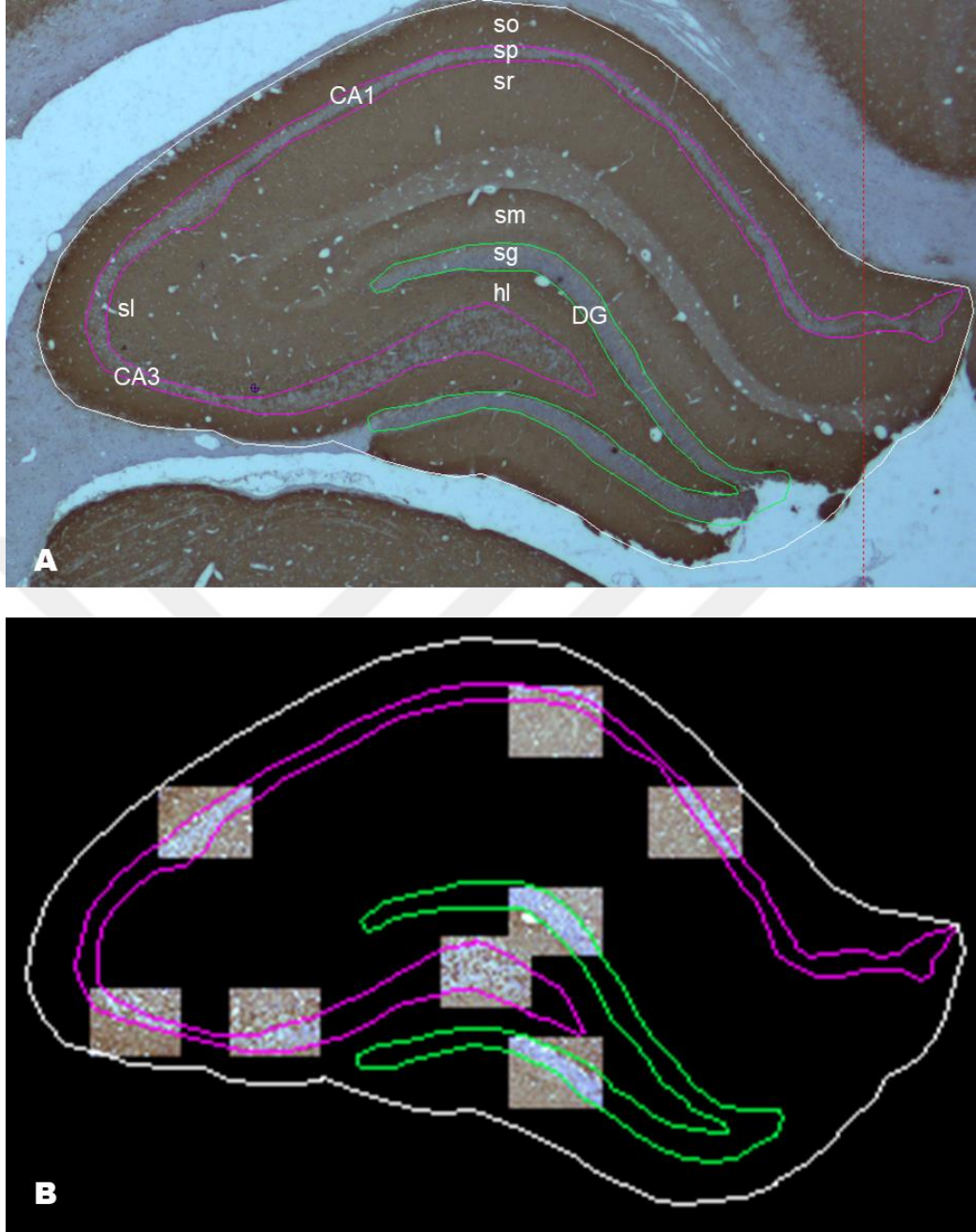
İmmünohistokimyasal incelemeler için hazırlanan tüm kesitler 2,5X objektif lensli ışık mikroskobu ve bilgisayar destekli görüntüleme sistemi StereoInvestigator (Version 9.0) ile görselleştirilmiştir.

Görselleştirilen preparatlarda, öncelikle küçük büyütme objektifinde dorsal hipokampusu ait alanların konturları çizilerek hipokampusun temel nöron katmanları belirlenmiştir. Sayımlar ve dansimetrik ölçümler için tarafsızlığın sağlanabilmesi amacıyla her bir kesitten alınan fotomikrograflar sistematik randomize örnekleme metodu kullanılarak seçilmiştir. Hesaplamalarda mikroskobik kalibrasyon skalası aracılığıyla büyütme faktörüne göre hesaplanan gerçek uzunluk birimleri kullanılmıştır.

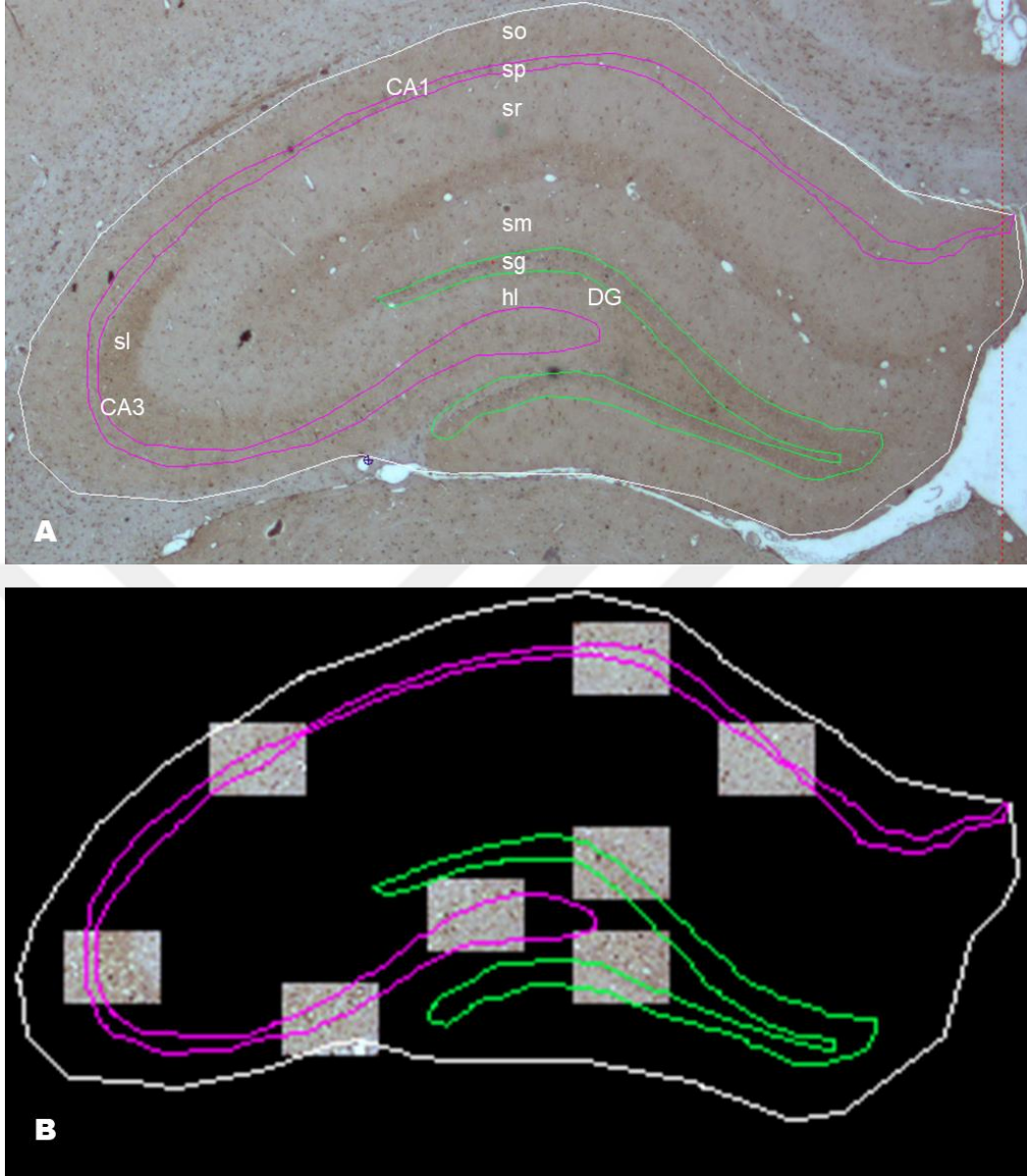
Fotomikrografların immünoaktiviteleri, ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, ABD) görüntü işleme ve analiz programı aracılığıyla değerlendirilmiştir.

Sinaptofizin (**Şekil 4.1.**) ve GFAP (**Şekil 4.2.**) immünoaktiviteleri CA1-2, CA3 ve DG alanlarında immünohistokimyasal olarak boyalı bölgelerin dansitelerine göre seçilen alanlara karşılık gelen piksel sayısı baz alınarak, eşit ölçekli fotomikrograflar üzerinden hesaplanmıştır.



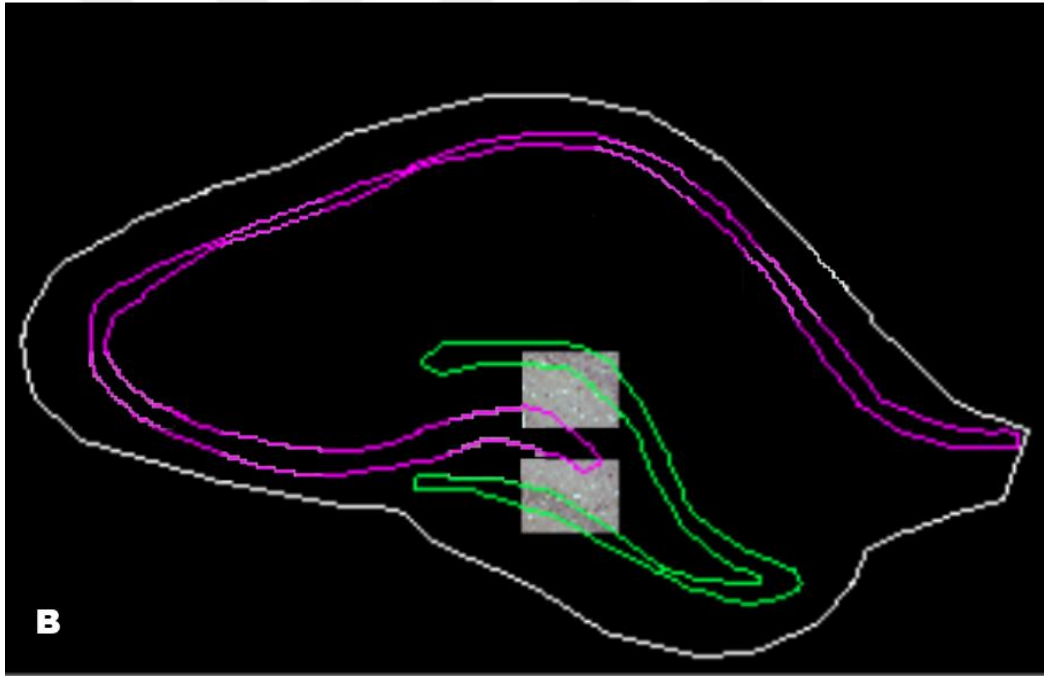
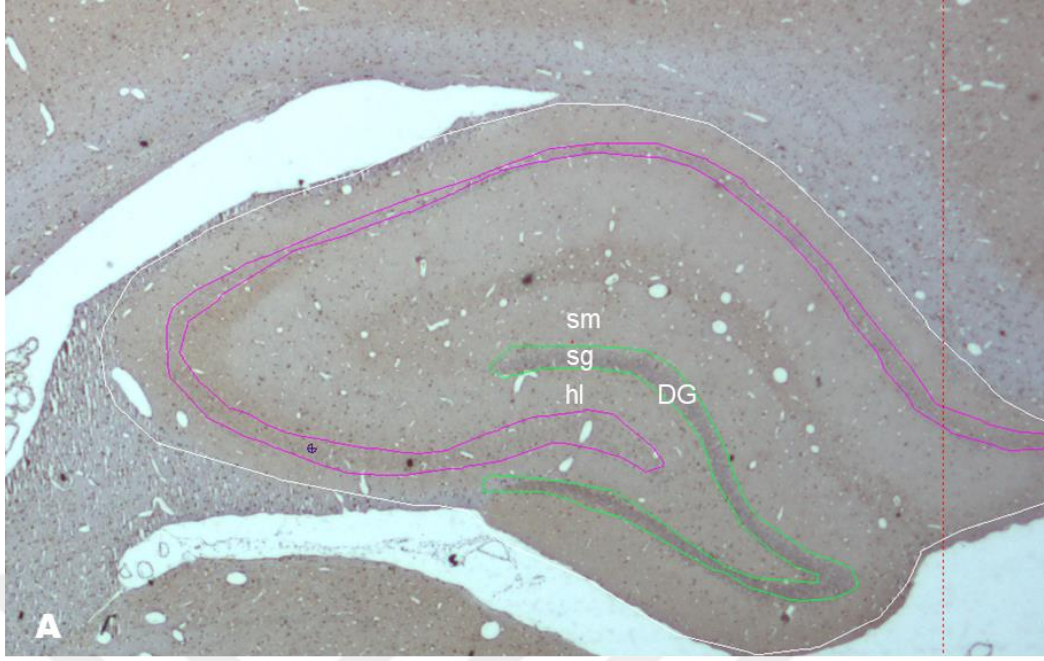


**Şekil 4.1.** Anti-sinaptofizin antikoruna ile immünohistokimyasal boyama işlemi gerçekleştirilmiş sıçan hipokampusunun temsili fotomikrografı, optik büyütme: 4X (A). CA1-2, CA3 ve DG bölgelerinde birim alana düşen sinaptofizin dansitelerini belirlemek amacıyla sistematik rastgele örnekleme metodu ile fotomikrografları alınan bölgeleri gösteren diyagram (B). Stratum oriens (so), stratum pyramidale (sp), stratum radiatum (sr), stratum moleculare, (sm), stratum granulosum (sg), hilus (hl), stratum lucidum (sl).



**Şekil 4.2.** Anti-GFAP antikoruna ile immünohistokimyasal boyama işlemi gerçekleştirilmiş sıçan hipokampusunun temsili fotomikrografi, optik büyütme: 4X (A). CA1-2, CA3 ve DG bölgelerinde birim alana düşen GFAP dansitelerini belirlemek amacıyla sistematik rastgele örnekleme metodu ile fotomikrografları alınan bölgeleri gösteren diyagram (B).

Ki-67 dansitesi ise DG'nin granüler hücre tabakası ve subgranüler bölge alanlarından (Şekil 4.3.) eşit ölçekli alınan fotomikrograflarda birim alana düşen Ki-67 immünopozitif hücre sayısından yola çıkılarak hesaplanmıştır.



**Şekil 4.3.** Anti-Ki-67 antikoruna ile immünohistokimyasal boyama işlemi gerçekleştirilmiş sıçan hipokampusunun temsili fotomikrografi, optik büyütme: 4X (A). DG bölgelerinde birim alanda bulunan Ki-67 immüno pozitif hücre sayısını belirlemek amacıyla sistematik rastgele örnekleme metodu ile fotomikrografları alınan bölgeleri gösteren diyagram (B).

Ayrıca, CA1-2, CA3 ve DG bölgeleri için birim alana düşen hücre sayıları da zıt boyama ile görselleştirilen nükleuslar sayılarak hesaplanmıştır.

#### 4.7. İstatistiksel Değerlendirme

İstatistiksel hesaplamalar ve grafik çizimleri için GraphPad Prism 6.01 (GraphPad Software, San Diego, CA, ABD) paket programı kullanılmıştır.

Gruplar arasında çoklu karşılaştırma yapmayı gerektiren veriler tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve ardından Tukey HSD çoklu karşılaştırma testi uygulanarak; Morris su labirentinde ölçülen kaçış sürelerine ilişkin veriler ise çift yönlü ANOVA-tekrarlı ölçüm testi ve ardından Bonferroni çoklu karşılaştırma testi uygulanarak değerlendirilmiştir. Sonuçlar, ortalama  $\pm$  ortalamanın standart hatası olarak verilmiştir.  $p < 0,05$  değeri anlamlı kabul edilmiştir.



## 5. BULGULAR ve TARTIŞMA

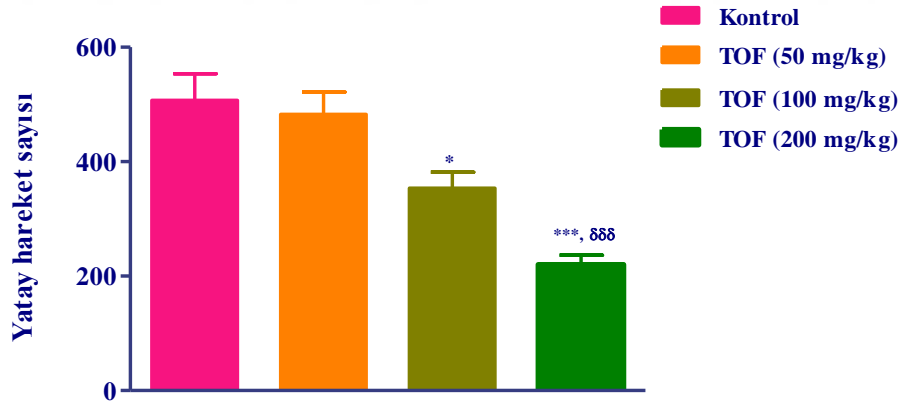
### 5.1. Sağlıklı Sıçanlarda Motor Aktivitenin Değerlendirilmesi

Deney hayvanlarının lokomotor aktivitelerinde ve motor koordinasyonlarında herhangi bir nedenle oluşabilecek değişikliklerin, eş zamanlı olarak yürütülen diğer davranış deneylerinin sonuçlarını etkileyebildiği, araştırmacının elde ettiği veriyi “yanlış pozitif” ya da “yanlış negatif” olarak yorumlamasına neden olabildiği bilinmektedir (Savić ve ark., 2009, s.1186; Gacar ve ark., 2011, s.319).

Bu nedenle, bu tez çalışmasında TOF’un olası anti-amnezik etkisi araştırılmadan önce, bu ilacın motor aktivite üzerine olası etkinliği araştırılmıştır. Bu amaçla, deneylere alınan sıçanların spontan lokomotor aktiviteleri “aktivite kafesi” testleri ile ve motor koordinasyon parametreleri ise “Rota-rod” deneyleri ile değerlendirilmiştir.

#### 5.1.1. Aktivite kafesi testine ilişkin bulgular

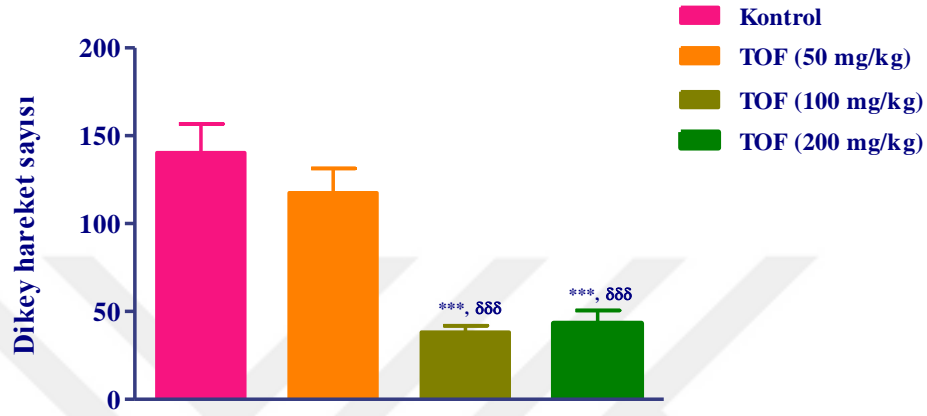
7 gün boyunca her gün düzenli olarak 50 mg/kg, 100 mg/kg ve 200 mg/kg (*p.o.*) dozlarda TOF uygulamasının, sıçanların aktivite kafesi testinde ölçülen “yatay hareket sayıları” üzerine etkileri Şekil 5.1.’de sunulmuştur.



Şekil 5.1. 50 mg/kg, 100 mg/kg ve 200 mg/kg dozlarda TOF uygulamalarının sıçanların aktivite kafesi testinde ölçülen “yatay hareket sayıları” üzerine etkileri. Kontrol grubuna göre anlamlı farklılık \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; 50 mg/kg TOF grubuna göre anlamlı farklılık  $\delta\delta\delta p < 0,001$ ; Tek yönlü varyans analizi, takiben Tukey HSD çoklu karşılaştırma testi,  $n=8$ .

Elde edilen veriler, TOF’un 50 mg/kg dozda 7 gün uygulanmasının sıçanların “yatay hareket sayıları” üzerinde anlamlı bir değişikliğe neden olmadığını ortaya koymuştur. Diğer yandan, bu ilacın 100 mg/kg ve 200 mg/kg dozlarda uygulanması sıçanların toplam “yatay hareket sayılarını” anlamlı biçimde azaltmıştır.

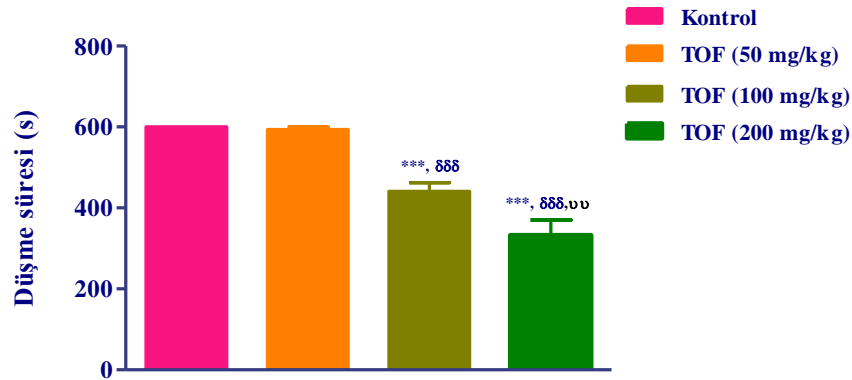
**Şekil 5.2.**, 7 gün boyunca her gün düzenli olarak 50 mg/kg, 100 mg/kg ve 200 mg/kg (*p.o.*) dozlarda TOF uygulamalarının, sıçanların “dikey hareket sayıları” üzerine etkilerini göstermektedir. Elde edilen veriler, TOF’un 50 mg/kg dozda 7 gün uygulanmasının, sıçanların “dikey hareket sayılarını” değiştirmediğine; ancak 100 mg/kg ve 200 mg/kg dozların bu sayıyı anlamlı biçimde azalttığına işaret etmiştir.



**Şekil 5.2.** 50 mg/kg, 100 mg/kg ve 200 mg/kg dozlarda TOF uygulamalarının sıçanların aktivite kafesi testinde ölçülen “dikey hareket sayıları” üzerine etkileri. Kontrol grubuna göre anlamlı farklılık \*\*\* $p < 0,001$ ; 50 mg/kg TOF grubuna göre anlamlı farklılık  $\delta\delta\delta p < 0,001$ ; Tek yönlü varyans analizi, takiben Tukey çoklu karşılaştırma testi,  $n=8$ .

### 5.1.2 Rota-rod testine ilişkin bulgular

7 gün boyunca her gün düzenli olarak 50 mg/kg, 100 mg/kg ve 200 mg/kg (*p.o.*) dozlarda TOF uygulamasının, sıçanların Rota-rod testinde ölçülen “dönen milin üzerinden düşme süreleri” üzerine etkileri **Şekil 5.3.**’de sunulmuştur.



**Şekil 5.3.** 50 mg/kg, 100 mg/kg ve 200 mg/kg dozlarda TOF uygulamalarının sıçanların Rota-rod testinde ölçülen “düşme süreleri” üzerine etkileri. Kontrol grubuna göre anlamlı farklılık \*\*\* $p < 0,001$ ; 50 mg/kg grubuna göre anlamlı farklılık  $\delta\delta\delta p < 0,001$ ; 100 mg/kg grubuna göre anlamlı farklılık  $\delta\delta\delta p < 0,01$ ; Tek yönlü varyans analizi, takiben Tukey çoklu karşılaştırma testi,  $n=8$ .

Elde edilen veriler, TOF'un 50 mg/kg dozda 7 gün uygulanmasının, sıçanların "düşme süreleri" üzerinde anlamlı bir değişikliğe neden olmadığını orataya koymuştur. Diğer yandan, bu ilacın 100 mg/kg ve 200 mg/kg dozlarda uygulanması "düşme sürelerini" anlamlı biçimde kısaltmıştır.

Aktivite kafesi ve Rota-rod deneylerinden elde edilen veriler, TOF'un 100 mg/kg ve 200 mg/kg dozlarda sıçanların yatay ve dikey yönlerdeki lokomotor aktivite sayılarını azalttığına ve motor koordinasyonlarını zayıflattığına işaret etmiştir. Diğer yandan, TOF'un 50 mg/kg dozu hayvanların motor aktiviteleri üzerine herhangi bir olumsuz etkiye neden olmamıştır.

Deney hayvanlarında motor aktivitenin bozulduğu dozlar ile çalışmanın davranış deneyleri üzerindeki olumsuz etki potansiyeli (Savić ve ark., 2009, s.1186; Rundfelt vd., 2010, s. 1319; Gacar ve ark., 2011, s.319) nedeniyle, bu çalışmada 100 mg/kg ve 200 mg/kg dozlar elenmiştir. Dolayısıyla, TOF'un deneysel amnezi modeli oluşturulmuş sıçanlarda öğrenme ve bellek parametreleri üzerine etkinliği yalnızca 50 mg/kg'lık doz kullanılarak araştırılmıştır.

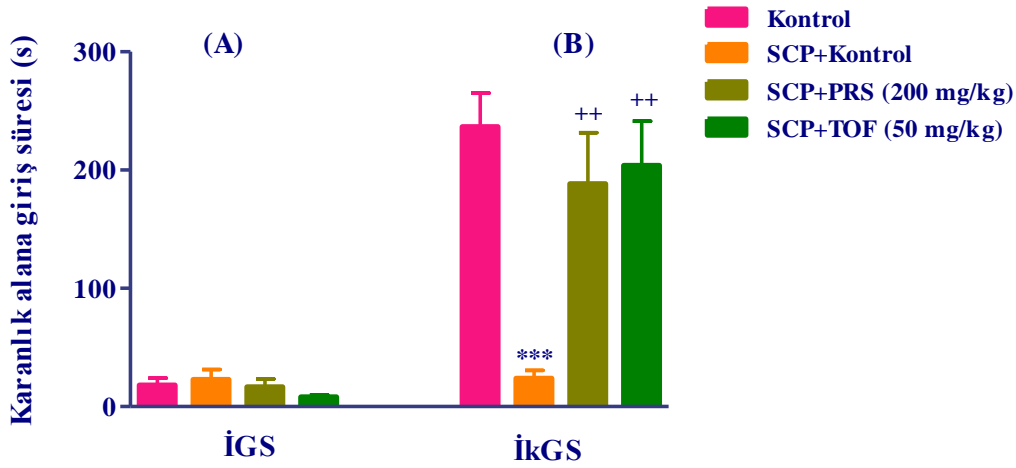
## **5.2. Öğrenme ve Bellek Parametrelerinin Değerlendirilmesi**

Bu tez çalışmasında TOF'un anti-amnezik etki potansiyeli "Pasif Sakınma" ve "Morris Su Labirenti" testleri ile değerlendirilmiştir.

### **5.2.1. Pasif sakınma testine ilişkin bulgular**

7 gün süreyle her gün düzenli olarak kontrol solüsyonu uygulanan sağlıklı (Kontrol) ve kontrol solüsyonu (SCP+Kontrol), 200 mg/kg PRS (SCP+PRS) veya 50 mg/kg TOF (SCP+TOF) uygulanan amnezik sıçanların pasif sakınma testinde ölçülen "karanlık alana geçiş süreleri" ne ilişkin bulgular **Şekil 5.4.**'de sunulmuştur.

Pasif sakınma testinin 1. gününde, edinim denemelerinden elde edilen bulgular **Şekil 5.4A**'da gösterilmiştir [ $F(3,31)=0,94; p>0,05$ ]. Tukey HSD çoklu karşılaştırma testi sonuçları, sıçanların edinim denemeleri sırasında ölçülen karanlık alana İGS'leri değerlerinin gruplar arasında anlamlı bir farklılık göstermediğini ortaya koymuştur.



**Şekil 5.4.** 7 gün süreyle her gün düzenli olarak kontrol solüsyonu uygulanan sağlıklı (Kontrol) ve kontrol solüsyonu (SCP+Kontrol), 200 mg/kg PRS (SCP+PRS) veya 50 mg/kg TOF (SCP+TOF) uygulanan amnezik sıçanların pasif sakınma testinde ölçülen karanlık alana geçiş süreleri. Kontrol grubuna göre anlamlı farklılık \*\*\* $p<0,001$ ; SCP+Kontrol grubuna göre anlamlı farklılık \*\* $p<0,01$ ; Tek yönlü varyans analizi, takiben Tukey HSD çoklu karşılaştırma testi,  $n=8$ .

Pasif sakınma testinin 2. gününde, bellek denemelerinden elde edilen bulgular ise **Şekil 5.4B**'de gösterilmiştir [ $F(3,31)=8,69$ ;  $p<0,001$ ]. Bu verilere ilişkin Tukey HSD çoklu karşılaştırma testi sonuçları, SCP uygulanan sıçanların karanlık alana İkGS'lerinin, kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde kısa olduğunu ortaya koymuştur ( $p<0,001$ ). SCP uygulanan sıçanların karanlık alana giriş sürelerindeki kısalma, bu hayvanların karanlık bölgede uygulanan elektrik şokunu öğrenemediklerine ve hatırlayamadıklarına işaret etmiştir.

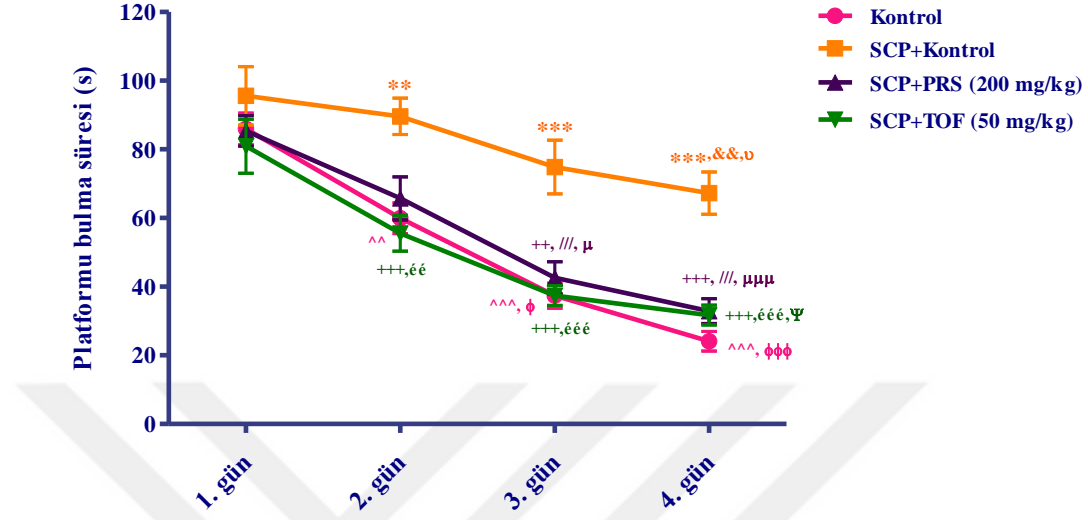
Diğer yandan, SCP ile amnezi oluşturulan grupların 7 gün süre ile PRS ( $p<0,01$ ) ya da TOF ( $p<0,01$ ) ile tedavi edilmiş olması, bu sıçanların İkGS değerlerini anlamlı ölçüde uzatmıştır. Diğer bir ifade ile SCP ile amnezi indüklenen sıçanların 7 gün süre ile 200 mg/kg PRS ya da 50 mg/kg TOF ile tedavi edilmesi, bu hayvanların bilişsel performanslarındaki bozulmayı düzeltici yönde etki göstermiştir. PRS ve TOF uygulanan amnezik sıçanların İkGS değerleri ile kontrol grubunun İkGS değerleri arasında anlamlı bir fark görülmemiştir (**Şekil 5.4B**).

## 5.2.2. Morris su labirenti testine ilişkin bulgular

**Şekil 5.5.**, 7 gün boyunca her gün düzenli olarak kontrol solüsyonu uygulanan sağlıklı (Kontrol) ve kontrol solüsyonu (SCP+Kontrol), 200 mg/kg PRS (SCP+PRS) veya



50 mg/kg TOF (SCP+TOF) uygulanan amnezik sıçanların Morris su labirenti testinde ölçülen "platformu bulma sürelerinin" değişimini göstermektedir.



**Şekil 5.5.** 7 gün süreyle her gün düzenli olarak kontrol solüsyonu uygulanan sağlıklı (Kontrol) ve kontrol solüsyonu (SCP+Kontrol), 200 mg/kg PRS (SCP+PRS) veya 50 mg/kg TOF (SCP+TOF) uygulanan amnezik sıçanların Morris su labirenti testinde ölçülen "platformu bulma süreleri". Kontrol grubunun karşılık gelen gününe göre anlamlı farklılık \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ ; SCP+Kontrol grubunun karşılık gelen gününe göre anlamlı farklılık ++ $p < 0,01$ , +++ $p < 0,001$ ; Kontrol grubu 1. gün değerine göre anlamlı farklılık ^ $p < 0,01$ , ^^ $p < 0,001$ ; Kontrol grubu 2. gün değerine göre anlamlı farklılık  $\phi p < 0,05$ ,  $\phi\phi\phi p < 0,001$ ; SCP+Kontrol grubu 1. gün değerine göre anlamlı farklılık & $p < 0,01$ ; SCP+Kontrol grubu 2. gün değerine göre anlamlı farklılık  $\nu p < 0,05$ ; SCP+PRS grubu 1. gün değerine göre anlamlı farklılık /// $p < 0,001$ ; SCP+PRS grubu 2. gün değerine göre anlamlı farklılık  $\mu p < 0,05$ ,  $\mu\mu\mu p < 0,001$ ; SCP+TOF grubu 1. gün değerine göre anlamlı farklılık éé $p < 0,01$ , ééé $p < 0,001$ ; SCP+TOF grubu 2. gün değerine göre anlamlı farklılık  $\psi p < 0,05$ ; Çift yönlü tekrarlı varyans analizi, takiben Bonferroni çoklu karşılaştırma testi,  $n=8$ .

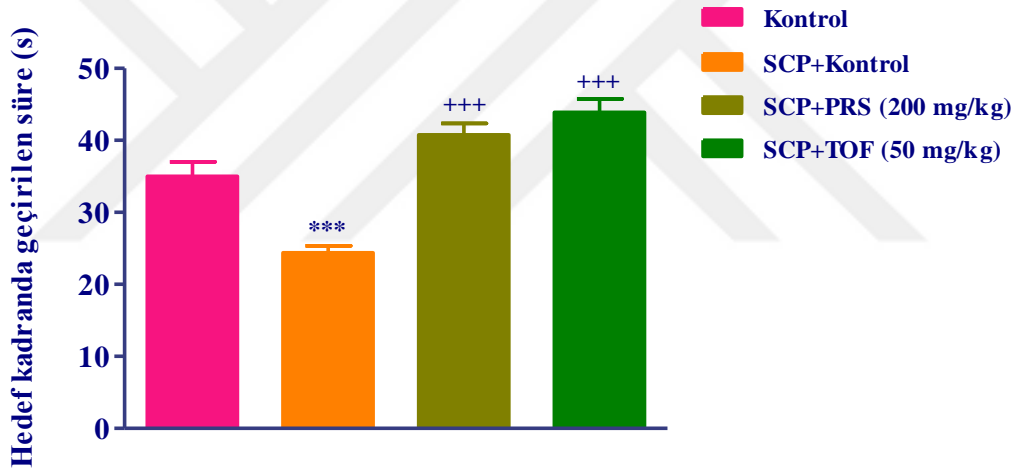
Çift yönlü tekrarlı varyans analizi sonuçları amnezik sıçanların platformu bulma süreleri üzerinde hem tedavi faktörünün [F (12,105)=21,07;  $p < 0,001$ ] hem de zaman faktörünün [F (12,105)=72,31;  $p < 0,001$ ] etkili olduğunu ortaya koymuştur. Tedavi ile zaman arasında anlamlı bir etkileşim bulunmamaktadır [F (12,105)=1,68,  $p > 0,05$ ].

Çoklu karşılaştırma için uygulanan Bonferroni testi, SCP uygulanan sıçanların Morris su labirenti testinin 2. ( $p < 0,01$ ), 3. ( $p < 0,001$ ) ve 4. ( $p < 0,001$ ) günlerinde ölçülen platformu bulma sürelerinin, kontrol grubundaki sıçanlara göre anlamlı biçimde yüksek olduğunu ortaya koymuştur. Bu bulgular, SCP uygulanan sıçanların platformu bulmalarının daha uzun sürdüğüne; diğer bir ifade ile bu hayvanların platformun yerini öğrenme performanslarının düşük olduğuna işaret etmiştir. Diğer yandan, 7 gün süresince her gün düzenli olarak 200 mg/kg PRS ya da 50 mg/kg TOF ile tedavi edilmiş olan amnezik sıçanların platformu bulma süreleri, tedavi edilmeyen amnezik hayvanlara göre,

her üç günde de (2., 3. ve 4. günler) kayda değer ölçüde kısalmıştır (Şekil 5.5.). Bu bulgu, 50 mg/kg dozunda 7 günlük TOF tedavisinin, sıçanların öğrenme performanslarında SCP ile indüklenen bozulmayı düzeltici yönde etki gösterdiğine işaret etmiştir.

Şekil 5.6., 7 gün boyunca her gün düzenli olarak kontrol solüsyonu uygulanan sağlıklı (Kontrol) ve kontrol solüsyonu (SCP+Kontrol), 200 mg/kg PRS (SCP+PRS) veya 50 mg/kg TOF (SCP+TOF) uygulanan amnezik sıçanların Morris su labirenti testinde ölçülen "hedef kadranda geçirilen süre" parametrelerinin değişimini göstermektedir [F(3,31)=26,32;  $p<0,001$ ].

Tukey HSD çoklu karşılaştırma testinin sonuçları, SCP uygulanmış amnezik sıçanların hedef kadranda geçirdikleri sürenin sağlıklı kontrol hayvanlarına göre anlamlı derecede kısa olduğunu ortaya koymuştur ( $p<0,001$ ). Bu bulgu, amnezik sıçanların saklı platformun bulunduğu hedef kadrana hatırlamakta güçlük çektiğine işaret etmiştir.



Şekil 5.6. 7 gün süreyle her gün düzenli olarak kontrol solüsyonu uygulanan sağlıklı (Kontrol) ve kontrol solüsyonu (SCP+Kontrol), 200 mg/kg PRS (SCP+PRS) veya 50 mg/kg TOF (SCP+TOF) uygulanan amnezik sıçanların Morris su labirenti testinde hedef kadranda geçirdikleri süreler. Kontrol grubuna göre anlamlı farklılık \*\*\* $p<0,001$ ; SCP+Kontrol grubuna göre anlamlı farklılık +++ $p<0,001$ ; Tek yönlü varyans analizi, takiben Tukey HSD çoklu karşılaştırma testi,  $n=8$ .

Diğer yandan, 7 gün süresince her gün düzenli olarak 200 mg/kg PRS ( $p<0,001$ ) ya da 50 mg/kg TOF ( $p<0,001$ ) uygulanan amnezik sıçanlar, hedef kadranda, tedavi edilmeyen amnezik hayvanlara göre daha uzun süre geçirmişlerdir (Şekil 5.6.). Bu bulgu, 50 mg/kg dozunda 7 günlük TOF tedavisinin sıçanların bellek performanslarında SCP ile indüklenen bozulmayı düzeltici yönde etki gösterdiğine işaret etmiştir.

SCP, beyinde kolinerjik aktiviteyi inhibe eden non-selektif muskarinik reseptör antagonisti bir ilaçtır. Bu maddenin, mitokondri kaynaklı reaktif oksijen türlerinin neden

olduğu oksidatif stres aracılığıyla beyinde asetilkolin seviyelerini azalttığı ve kolinerjik disregülyasyona neden olduğu bilinmektedir (Melo vd., 2003, s. 117). Preklinik çalışmalar öğrenmeyi ve kısa süreli belleği bozan bu ajanın; muskarinik reseptör sinyal yolları, apoptoz, hücre iskeletinin rekonstrüksiyonu, protein trafiği ve hücre farklılaşması ile ilişkili genler de dâhil olmak üzere geniş bir gen spektrumunun ekspresyonunu etkilediğini göstermiştir (Hsieh vd., 2003, s. 1007). Deney hayvanlarına uygulandığında, demans ve Alzheimer hastalığı gibi klinik durumlarda gözlenen bilişsel işlev bozukluklarını taklit eden bir tablo indükleyen SCP, kemirgenlerde deneysel amnezi modeli oluşturmak amacıyla sıklıkla kullanılmaktadır. Söz konusu amnezi modeli nootropik ilaç geliştirme çalışmaları için akla gelen ilk tarama yöntemleri arasındadır (Ebert, 1998, s. 944; Deiana vd., 2009, s. 53; Choi vd., 2011, s. 93).

Bu nedenle bu tez çalışmasında, bilişsel işlev bozukluğunu indüklemek amacıyla SCP kullanılmıştır. Yürütülen *in vivo* deneyler sonucunda, pasif sakınma ve Morris su labirenti testinden elde edilen bulgular, SCP uygulanmış sıçanların öğrenme ve bellek performanslarının bozulduğunu ortaya koymuştur. Dolayısıyla bu çalışmada deneysel amnezi modelinin başarı ile oluşturulduğu söylenebilir.

Modelin oluşturulmasını takiben, SCP ile indüklenen amnezi üzerine TOF'un olası terapötik etkileri araştırılmıştır. Elde edilen bulgular TOF'un 50 mg/kg dozunda 7 günlük uygulamasının, sıçanlarda SCP ile indüklenen öğrenme bellek bozukluklarını referans ilaç olan PRS ile karşılaştırılabilir düzeyde iyileştirdiğini ortaya koymuştur (**Şekil 5.4., 5.5. ve 5.6.**).

Literatürde TOF'un öğrenme ve bellek üzerindeki etkilerine dair çok az sayıda çalışma bulunmaktadır. Bunlarda biri olan ve Szegó ve arkadaşları tarafından 1993 yılında yapılan bir çalışmada, TOF'un, diğer benzodiazepinler gibi psikomotor ve entelektüel performansı bozmadığı; aksine hafif uyarıcı bir etki gösterdiği ileri sürülmüştür (Szegó vd., 1993, s. 91). Arushanian ve arkadaşları tarafından yapılan klinik bir çalışmada ise, TOF'un tekrarlı uygulanmalarının genç erişkinlerde görsel ve sözel kısa süreli belleği iyileştirdiği bildirilmiş; söz konusu nootropik etkinliğin, diüurnal ritim değişikliklerinden ve deneklerin cinsiyetinden etkilendiği ileri sürülmüştür (Arushanian vd., 2004, s. 23). Sözü edilen bu çalışmalar, bu araştırmada elde edilen bulguları destekler özelliindedir.

Diğer yandan, oldukça eski tarihli bir başka klinik çalışmada; 1. gün bölünmüş dozlar halinde toplam 200 mg, 2. gün ise tek doz 100 mg/kg TOF uygulanmış deneklerin

bellek performansları ölçülmüştür. Çalışma sonucunda, TOF'un diazepam ve alkolden farklı olarak, deneklerin bilişsel performanslarını bozmadığı bildirilmiştir. Ancak söz konusu çalışmada TOF uygulaması, deneklerin bilişsel performanslarını artırıcı yönde de bir etki göstermemiştir (Seppälä vd., 1980, s. 209). Bu sonuç, bu tez çalışmasında elde edilen bulgular ile örtüşmemekle birlikte; söz konusu çalışmada kullanılan denek sayısının azlığı (her grupta 6 denek), uygulanan doz şemasının farklılığı ve prelinik ve klinik çalışmalar arasındaki olası farklılıklar, böyle çelişkili bulgulara neden olmuş olabilir.

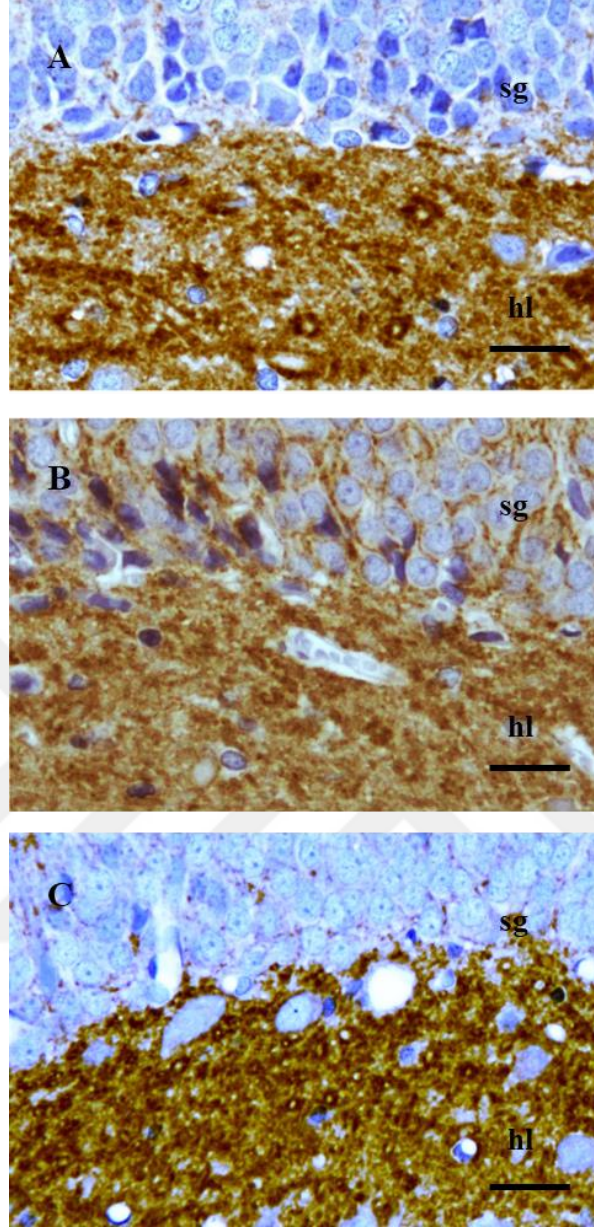
Yapılan literatür taramalarında, TOF'un bilişsel işlevler üzerindeki etkinliği ile ilişkili olarak yukarıda sözü edilen birkaç küçük kapsamlı klinik çalışmanın dışında herhangi bir rapora rastlanmamıştır. Dolayısıyla bu tez çalışması, TOF'un öğrenme ve bellek bozuklukları üzerindeki olası terapötik potansiyelinin deneysel bir amnezi modeli kullanılarak araştırıldığı ilk kapsamlı prelinik çalışma olma özelliği taşımaktadır.

Bu çalışmada, TOF'un anti-amnezik etkisinin ortaya konulmasının ardından, bu etkinin altında yatabilecek olası mekanizmaların araştırılması planlanmıştır. Bu bağlamda, beyinde öğrenme, bellek ve mantık yürütme gibi işlevlerin regülasyonunu yapan ana merkez olan hipokampus'a (Jarrard, 1993, s. 9; Goel vd. 2004, s. 654) odaklanılmış ve TOF uygulamasının amnezik sıçanların hipokampuslarında neden olduğu bazı morfolojik değişiklikler araştırılmıştır.

### **5.3. İmmünohistokimyasal İncelemelere İlişkin Bulgular**

#### **5.3.1. Hipokampal formasyona ait bölgelerde sinaptofizin immünoaktivitelerine ilişkin bulgular**

Sinapslarda nörotransmisyonunda rol oynayan proteinlerin ekspresyonlarında ve miktarlarında meydana gelen değişimlerin, sinaptogenez için önemli olduğu bilinmektedir (Hajjar vd., 2013, s. 1). Bu nedenle, bu tez çalışmasında, nöroplastisitedeki olası değişimlerin bir belirteci olarak, pre-sinaptik bir protein olan sinoptofizin'in immünoaktivitesi değerlendirilmiştir.



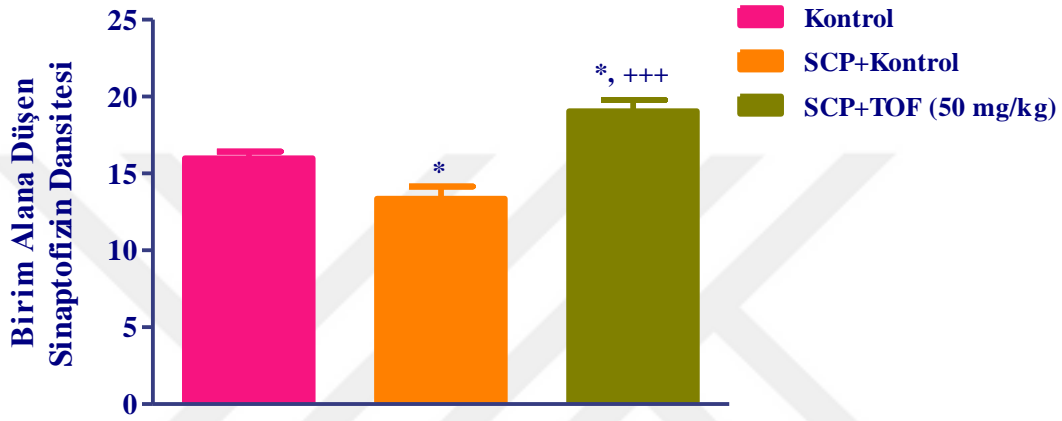
**Şekil 5.7.** 7 gün süreyle her gün düzenli olarak kontrol solüsyonu uygulanan sağlıklı (Kontrol, A) ve kontrol solüsyonu (SCP+Kontrol, B) veya 50 mg/kg TOF (SCP+TOF, C) uygulanan amnezik sıçanların hipokampal DG alanlarında sinaptofizin immünoreaktivitesinin temsili görüntüleri (Ölçek: 25  $\mu$ m)

7 gün boyunca her gün düzenli olarak kontrol solüsyonu uygulanan sağlıklı (Kontrol) ve kontrol solüsyonu (SCP+Kontrol) veya 50 mg/kg TOF (SCP+TOF) uygulanan amnezik sıçanların dokularından elde edilen koronal beyin kesitlerine anti-sinaptofizin antikoru ile yapılan immünohistokimyasal boyamalar sonucu DG alanından elde edilen fotomikrograflar **Şekil 5.7.**'de gösterilmektedir.

Söz konusu fotomikrograflarda, DG'nin üst kolundaki granüler hücre katmanı, hematoxilen Harris solüsyonu ile mavi-mor boyanmış olarak görülmektedir.

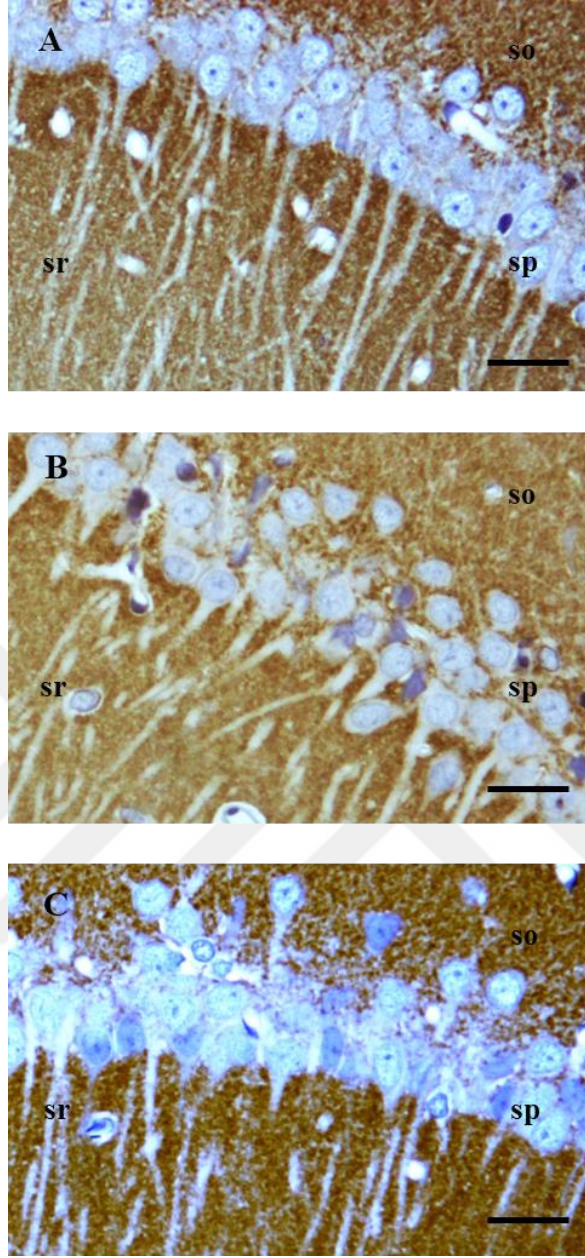
Fotomikrogramda kahverengi boyalı olarak görülen bazal sinaptofizin dansitesinin (Şekil 5.7A), SCP uygulanmasına bağlı olarak azaldığı (Şekil 5.7B), TOF tedavisinin ise azalmış sinaptofizin immünoreaktivitesini artırdığı (Şekil 5.7C) görülmektedir.

7 gün boyunca her gün düzenli olarak kontrol solüsyonu uygulanan sağlıklı (Kontrol) ve kontrol solüsyonu (SCP+Kontrol) veya 50 mg/kg TOF (SCP+TOF) uygulanan amnezik sıçanların DG alanlarından elde edilmiş fotomikrograflarda sinaptofizin dansitesindeki değişim Şekil 5.8.'de gösterilmiştir [ $F(2,17)=18,2$ ;  $p<0,001$ ].



Şekil 5.8. 7 gün süreyle her gün düzenli olarak kontrol solüsyonu uygulanan sağlıklı (Kontrol) ve kontrol solüsyonu (SCP+Kontrol) veya 50 mg/kg TOF (SCP+TOF) uygulanan amnezik sıçanların hipokampal DG bölgelerinde birim alana düşen sinaptofizin dansiteleri. Kontrol grubuna göre anlamlı farklılık \* $p<0,05$ ; SCP+Kontrol grubuna göre anlamlı farklılık +++ $p<0,001$ . Tek yönlü varyans analizi, Takiben Tukey HSD çoklu karşılaştırma testi,  $n=6$ .

7 gün boyunca her gün düzenli olarak kontrol solüsyonu uygulanan sağlıklı (Kontrol) ve kontrol solüsyonu (SCP+Kontrol) veya 50 mg/kg TOF (SCP+TOF) uygulanan amnezik sıçanların dokularından elde edilen koronal beyin kesitlerine anti-sinaptofizin antikoru ile yapılan immünohistokimyasal boyamalar sonucu hipokampal CA1 alt-alanlarından elde edilen fotomikrograflar Şekil 5.9.'da gösterilmektedir.

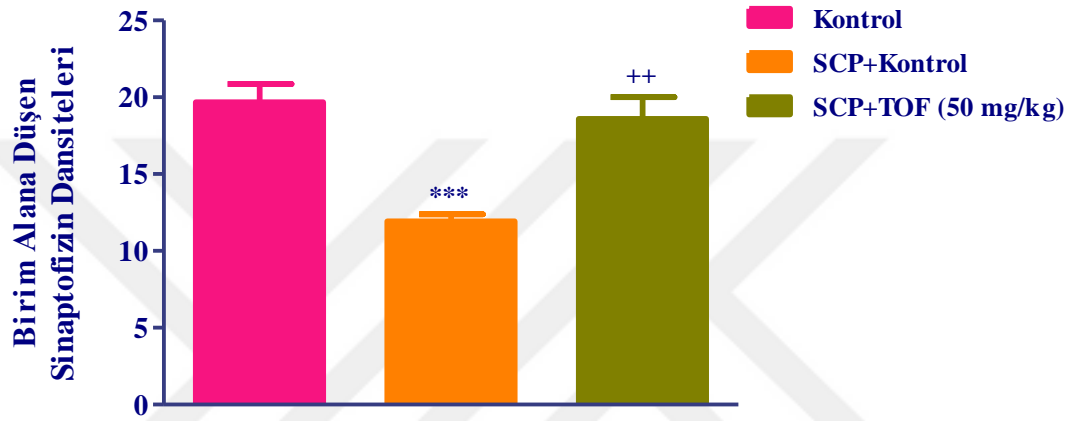


**Şekil 5.9.** 7 gün süreyle her gün düzenli olarak kontrol solüsyonu uygulanan sağlıklı (Kontrol, A) ve kontrol solüsyonu (SCP+Kontrol, B) veya 50 mg/kg TOF (SCP+TOF, C) uygulanan amnezik sıçanların hipokampal CA1 alt-alanlarında sinaptofizin immünoaktivitelerinin temsili görüntüleri (Ölçek: 25 µm)

Söz konusu fotomikrograflarda, CA1 alanındaki piramidal hücre tabakası hematoksilin Harris solüsyonu ile mavi-mor boyanmış olarak görülmektedir. Piramidal nöronların sr doğrultusunda uzanan dendritik arborizasyonları, immünoaktivitenin gözlenmediği boyanmamış alanlar olarak görülmektedir. Sr ve so alanlarında görülen kahverengi boyalı bölgeler ise sinaptofizin pozitif akson terminallerini göstermektedir. Fotomikrografta görülen immünoaktif alanlar incelendiğinde, kontrol grubuna ait bazal sinaptofizin düzeyinin (Şekil 5.9A), SCP uygulanmasına bağlı olarak azaldığı (Şekil

**5.9B)** ve TOF tedavisinin azalmış sinaptofizin immünoreaktivitesini artırdığı (**Şekil 5.9C)** görülmektedir.

7 gün boyunca her gün düzenli olarak kontrol solüsyonu uygulanan sağlıklı (Kontrol) ve kontrol solüsyonu (SCP+Kontrol) veya 50 mg/kg TOF (SCP+TOF) uygulanan amnezik sıçanların hipokampal CA1-2 alanlarından elde edilmiş fotomikrograflarda sinaptofizin dansitesindeki değişim **Şekil 5.10.**'da gösterilmektedir [F(2,17)= 14,48;  $p<0,001$ ].

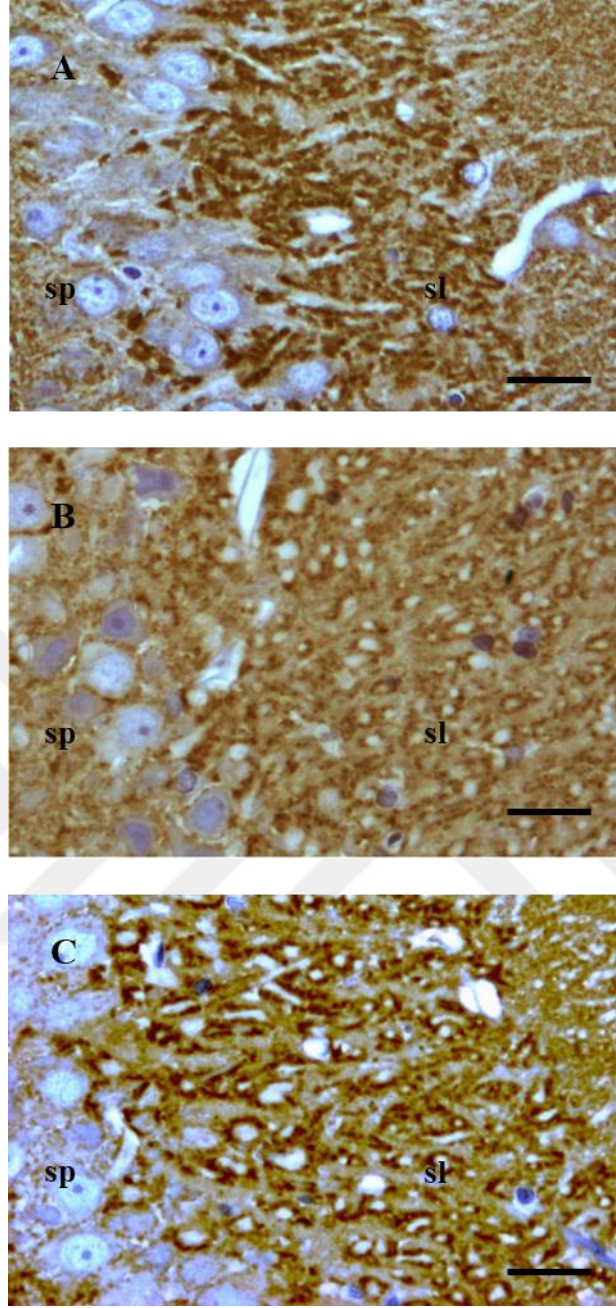


**Şekil 5.10.** 7 gün süreyle her gün düzenli olarak kontrol solüsyonu uygulanan sağlıklı (Kontrol) ve kontrol solüsyonu (SCP+Kontrol) veya 50 mg/kg TOF (SCP+TOF) uygulanan amnezik sıçanların hipokampal CA1-2 alt-alanlarında birim alana düşen sinaptofizin dansiteleri. Kontrol grubuna göre anlamlı farklılık \*\*\* $p<0,001$ ; SCP+Kontrol grubuna göre anlamlı farklılık ++ $p<0,01$ ; Tek yönlü varyans analizi, takiben Tukey HSD çoklu karşılaştırma testi,  $n=6$ .

7 gün boyunca her gün düzenli olarak kontrol solüsyonu uygulanan sağlıklı (Kontrol) ve kontrol solüsyonu (SCP+Kontrol) veya 50 mg/kg TOF (SCP+TOF) uygulanan amnezik sıçanların, dokularından elde edilen koronal beyin kesitlerine anti-sinaptofizin antikoru ile yapılan immünohistokimyasal boyamalar sonucu hipokampal CA3 alanlarından elde edilen fotomikrograflar **Şekil 5.11.**'de gösterilmektedir.

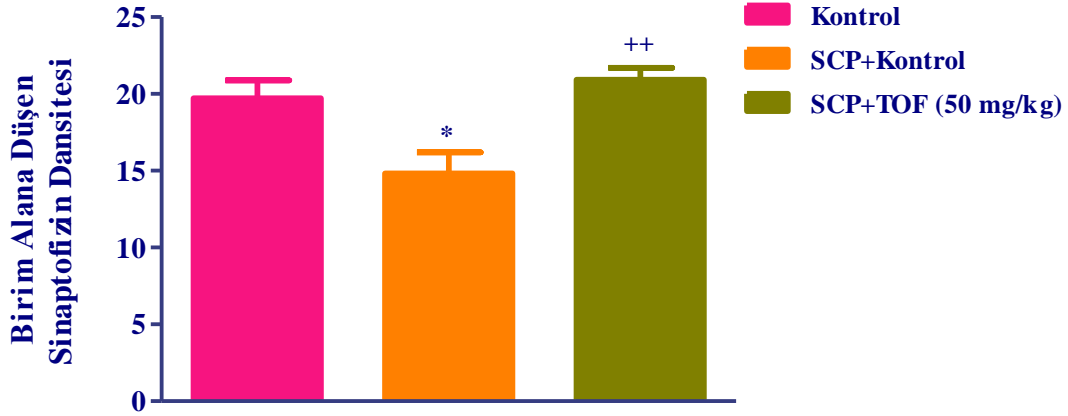
Söz konusu fotomikrografta, CA3 alanındaki piramidal hücre katmanı hematoksilin Harris solüsyonu ile mavi-mor boyanmış olarak görülmektedir. S1 alanında görülen kahverengi boyalı bölgeler sinaptofizin pozitif akson terminallerini göstermektedir. Fotomikrografta görülen immünoreaktif alanlar incelendiğinde, kontrol grubuna ait bazal sinaptofizin düzeyinin (**Şekil 5.11A**), SCP uygulanmasına bağlı olarak azaldığı (**Şekil 5.11B**), TOF tedavisinin ise azalmış sinaptofizin immünoreaktivitesini artırdığı (**Şekil 5.11C**) görülmektedir.





**Şekil 5.11.** 7 gün süreyle her gün düzenli olarak kontrol solüsyonu uygulanan sağlıklı (Kontrol, A) ve kontrol solüsyonu (SCP+Kontrol, B) veya 50 mg/kg TOF (SCP+TOF, C) uygulanan amnezik sıçanların hipokampal CA3 alt-alanlarında sinaptofizin immünoaktivitelerinin temsili görüntüleri (Ölçek: 25 µm)

7 gün boyunca her gün düzenli olarak kontrol solüsyonu uygulanan sağlıklı (Kontrol) ve kontrol solüsyonu (SCP+Kontrol) veya 50 mg/kg TOF (SCP+TOF) uygulanan amnezik sıçanların hipokampal CA3 alt-alanlarından elde edilmiş fotomikrograflarda birim alana düşen sinaptofizin dansitesindeki değişim **Şekil 5.12.**'de gösterilmiştir [F (2,17)= 8,19;  $p < 0,01$ ].



**Şekil 5.12.** 7 gün süreyle her gün düzenli olarak kontrol solüsyonu uygulanan sağlıklı (Kontrol) ve kontrol solüsyonu (SCP+Kontrol) veya 50 mg/kg TOF (SCP+TOF) uygulanan amnezik sıçanların hipokampal CA3 alt-alanlarında birim alana düşen sinaptofizin dansitesi. Kontrol grubuna göre anlamlı farklılık \* $p < 0,05$ ; SCP+Kontrol grubuna göre anlamlı farklılık \*\* $p < 0,01$ ; Tek yönlü varyans analizi, takiben Tukey HSD çoklu karşılaştırma testi,  $n=6$ .

Hipokampal sinaptofizin immünoreaktivite düzeylerinin araştırıldığı testlerden elde edilen verileri değerlendirmek için kullanılan Tukey HSD çoklu karşılaştırma testi sonuçları, deneysel amnezi modeli oluşturulan sıçanlarda DG (Şekil 5.8.), CA1-2 (Şekil 5.10.) ve CA3 (Şekil 5.12.) bölgelerinde birim alandaki sinaptofizin dansitelerinin kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde azaldığına işaret etmektedir.

Sinaptofizin, moleküler ağırlığı 38 kDa olan  $Ca^{+2}$  bağlayıcı bir integral membran glikoproteinidir. Nöronlarda küçük sinaptik veziküllerin ve bazı nöroendokrin hücrelerin küçük veziküllerinin ana bileşeni olan sinaptofizin'in sinaptik veziküllerin ekzositozunda rol oynadığı ve sinaptik vezikül döngüsünün etkinliğini modüle ettiği bildirilmiştir (Fletcher vd., 1991, s. 1617; Chen vd., 1998, s. 238; Schmitt vd., 2009, s. 234).

Sinaptofizin ekspresyonundaki artışın sinaptik işlevlerdeki artışa işaret ettiği kabul edilmektedir (Alder vd., 1995, s. 511; Edelman vd., 1995, s. 224; Hajjar vd., 2013, s. 5). Öğrenme ve bellek oluşumu, sinaptik plastisitenin son derece kritik olduğu fizyolojik işlevlerdir. Bu bağlamda, sinaptofizin'in bilişsel süreçler açısından önem taşıma potansiyeli açıktır. Nitekim sinaptofizin'in öğrenme ve bellek ile ilişkili süreçlerde rol oynadığına ilişkin çok sayıda kanıt bulunmaktadır. Bunlardan en çarpıcı olanı sinaptofizin gen delesyonu oluşturulmuş transgenik farelerin uzamsal öğrenme ve tanıma belleği parametrelerinin, yabanıl tipe kıyasla zayıfladığının gösterilmiş olmasıdır (Schmitt vd., 2009, s. 234). Diğer yandan, öğrenmenin ana merkezlerinden biri olan hipokampusta sinaptofizin seviyelerinin yaşlanma ile azalıyor olmasının (Chen vd., 1998, s.238) yanı sıra; çevresel zenginleştirme (Nilsson vd., 1999, s.569; Duffy vd., 2001, s.26)

ve fiziksel egzersiz (Anderson vd., 2000, s.425; Yaffe vd., 2001, s. 1703) gibi uygulamaların bilişsel süreçler üzerinde olumlu etkilerine, beyin sinaptofizin düzeylerinde artışın eşlik ediyor olması (Frick ve Fernandez, 2003, s. 615; Nithianantharajah vd., 2004, s. 200; Lambert vd., 2005, s. 206) da bu proteinin bilişsel işlevler üzerindeki olumlu rolünü doğrulamaktadır.

Literatürde hipokampal sinaptofizin miktarındaki azalmanın ya da işlevlerindeki zayıflamanın bilişsel işlev bozuklukları ile ilişkilendirildiği çalışmalar vardır. Örneğin, kronik serebral hipoperfüzyon ile bilişsel bozukluk oluşturulmuş sıçanlarda Moris su labirenti testi ile değerlendirilen uzamsal öğrenme ve bellek parametrelerinin bozulduğu ve hipokampusta sinaptofizin seviyelerinin azaldığı bildirilmiştir (Liu vd., 2005, s. 169). Bir başka bilişsel işlev bozukluğu modeli olan trimetiltin ile indüklenen amnezi modelinde de benzer sonuçlar elde edilmiş; farelerin bozulan uzamsal öğrenme parametrelerine hipokampal sinaptofizin ekspresyonunda azalmanın eşlik ettiği gösterilmiştir (Zhang vd., 2014, s. 222). Deneysel Alzheimer modeli oluşturmak için sıklıkla kullanılan bir ajan olan amiloid peptid beta (A $\beta$  25-35)'nin hipokampal doku kültürlerinde neden olduğu presinaptik değişikliklerin araştırıldığı diğer bir çalışmada ise A $\beta$  25-35 uygulamasının, sıçan hipokampusunda sinaptofizin'in hem ekspresyon düzeyinde hem de protein miktarında azalmaya yol açtığı gösterilmiştir (Suh vd., 2008, s. 691). Nitekim, Alzheimer hastalarında hipokampal sinaptofizin seviyelerinin sağlıklı kontrollere oranla ileri derecede azalmış olduğu; hastalığın erken evrelerinde düşük olan bu farkın ilerleyen evrelerde giderek arttığı gösterilmiştir (Sze vd., 1997, s. 933).

Sözü edilen çalışmaları destekler nitelikte olmak üzere, bu tez çalışmasında da SCP ile deneysel amnezi modeli oluşturulmuş sıçanlarda ortaya çıkan öğrenme ve bellek bozukluklarına, hipokampusun CA1-2, CA3 ve DG bölgelerinde birim alana düşen sinaptofizin dansitesinde azalma eşlik etmiştir (**Şekil 5.8.**, **5.10.** ve **5.12.**). Diğer yandan 7 günlük TOF tedavisi; amnezik sıçanlarda hipokampal formasyonun ilişkili bölgelerinde azalmış olan sinaptofizin dansitesini anlamlı ölçüde artırmıştır.

### **5.3.2. Gyrus dentatus bölgelerinde Ki-67 immünoreaktivitelerine ilişkin bulgular**

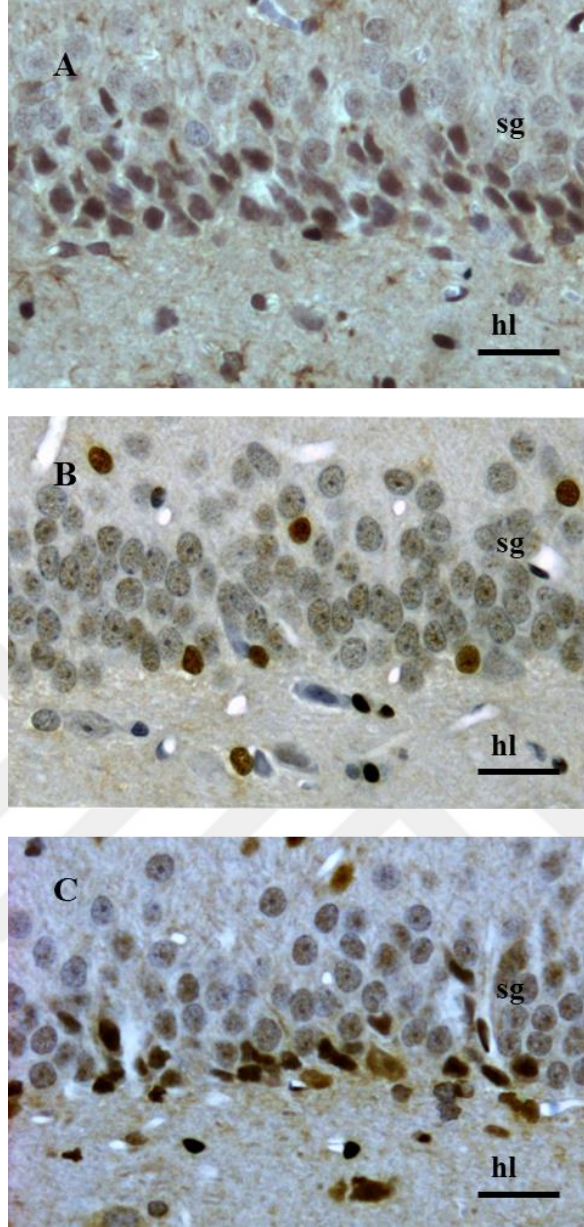
Hipokampus, erişkin nörogenezinin gerçekleştiği önemli bir bölgedir (Klempin ve Kempermann, 2007, s. 271). Yeni nöronlar, hl ile granüler hücre tabakası arasındaki sınırdan yerel olarak oluşur ve daha sonra olgun nöronların morfolojik ve fonksiyonel özelliklerini geliştirdikleri granüler hücre tabakasına göç ederler (Stanfield ve Trice,

1988, s. 399). Bu nöronlar sinapsları oluşturur ve nöronal devrelere entegre hale gelmek için hipokampal CA3 bölgesindeki hücrelere bağlanan aksonal çıkıntılarını uzatırlar (van Praag vd., 2002, s. 1030). Son araştırmalar; erişkin beyinde hipokampal nörogenezin öğrenme ve bellek ile yakından ilişkili olduğunu göstermiştir (Cameron ve McKay, 2001, s. 406). Yeni nöronların üretilmesi, bellek kapasitesinde artışa neden olur (Becker, 2005, s. 722) ve geri çağırma süreçlerinde olası aksaklıkları önler (Wiskott vd., 2006, s.329). Dolayısıyla, yetişkin DG'de nörogenez artışının, bellek performansını artırabileceği ileri sürülmüştür (Gould vd., 1999, s. 262; Shors vd., 2001, s.372; Dupret vd., 2008, s. 1; Deng vd. 2010, s. 339). Bu bağlamda, öğrenme ve bellek üzerine terapötik etki gösteren farmakolojik ajanların etki mekanizmalarının, nörogenez üzerindeki olumlu etkileri ile ilişkili olması son derece olasıdır. Bu nedenle bu çalışmada, TOF'un anti-amnezik etkisinin, nörogenez üzerindeki olası bir değişiklik ile ilişkili olup olmadığı mitotik bir belirteç olan Ki-67 (Wojtowicz ve Kee, 2006, s. 1399) kullanılarak araştırılmıştır.

Hipokampusta erişkin nörogenezinin köken aldığı prekürsör hücreler granüler hücre tabakası ile hl arasında bulunan ve subgranüler bölge olarak adlandırılan dar bir doku bandında bulunmaktadır (Kempermann vd., 2015, s. 2). Bu nedenle bu çalışmada, nörogenezde meydana gelen olası değişiklikler, hipokampusun söz konusu alanında değerlendirilmiştir.

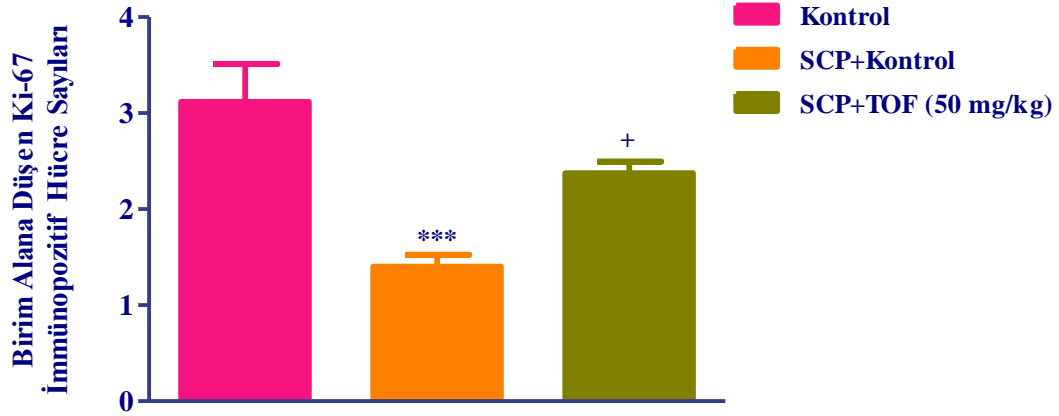
7 gün boyunca her gün düzenli olarak kontrol solüsyonu uygulanan sağlıklı (Kontrol) ve kontrol solüsyonu (SCP+Kontrol) veya 50 mg/kg TOF (SCP+TOF) uygulanan amnezik sıçanların dokularından elde edilen koronal beyin kesitlerine anti-Ki-67 antikoru ile yapılan immünohistokimyasal boyamalar sonucu hipokampal DG alanlarından elde edilmiş fotomikrograflar **Şekil 5.13.**'te gösterilmiştir.

Söz konusu fotomikrograflarda, DG'nin üst kolundaki granüler hücre tabakası, hematoksilen Harris solüsyonu ile mavi-mor boyanmış olarak görölmektedir. Kahverengi boyanmış alanlar, Ki-67 immünopozitif progenitör hücrelerin nükleuslarını temsil etmektedir. Fotomikrograflarda görölen immünoreaktif alanlar incelendiğinde, kontrol grubuna ait bazal proliferatif hücre sayısının (**Şekil 5.13A**), SCP uygulanmasına bağlı olarak azaldığı (**Şekil 5.13B**), TOF tedavisinin ise azalmış olan proliferatif hücre sayısını artırdığı (**Şekil 5.13C**) görölmektedir.



**Şekil 5.13.** 7 gün süreyle her gün düzenli olarak kontrol solüsyonu uygulanan sağlıklı (Kontrol, A) ve kontrol solüsyonu (SCP+Kontrol, B) veya 50 mg/kg TOF (SCP+TOF, C) uygulanan amnezik sıçanların hipokampal DG alanlarında Ki-67 immünoaktivitelerinin temsili görüntüleri (Ölçek: 25 µm)

7 gün boyunca her gün düzenli olarak kontrol solüsyonu uygulanan sağlıklı (Kontrol) ve kontrol solüsyonu (SCP+Kontrol) veya 50 mg/kg TOF (SCP+TOF) uygulanan amnezik sıçanların hipokampal DG alanlarından elde edilmiş fotomikrograflarda birim alanda bulunan Ki-67 immünopozitif hücre sayılarındaki değişim Şekil 5.14.'de gösterilmiştir [ $F(2,17)=11,87; p<0,001$ ].



**Şekil 5.14.** 7 gün süreyle her gün düzenli olarak kontrol solüsyonu uygulanan sağlıklı (Kontrol) ve kontrol solüsyonu (SCP+Kontrol) veya 50 mg/kg TOF (SCP+TOF) uygulanan amnezik sıçanların hipokampal DG bölgelerinde birim alana düşen Ki-67 immünopozitif hücre sayıları. Kontrol grubuna göre anlamlı farklılık \*\*\* $p < 0,001$ ; SCP+Kontrol grubuna göre anlamlı farklılık + $p < 0,05$ ; Tek yönlü varyans analizi, takiben Tukey HSD çoklu karşılaştırma testi,  $n=6$ .

Hipokampal Ki-67 immünoreaktivitesinin araştırıldığı testlerden elde edilen verileri değerlendirmek için kullanılan Tukey HSD çoklu karşılaştırma testi sonuçları, deneysel amnezi modeli oluşturan sıçanlarda DG (Şekil 5.14.) bölgelerinde Ki-67 immünoreaktivitesinin kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde azaldığına işaret etmiştir.

Ki-67 proteini, erişkin beyninde nörojenezi izlemek için sıklıkla tercih edilen endojen bir belirteçtir. Bu protein  $G_1$ , S,  $G_2$  ve mitoz dâhil hücre döngüsünün tüm aktif fazlarında bulunup,  $G_0$  fazında dinlenme durumundaki hücrelerde bulunmadığından proliferasyon olan hücreler için “mitotik bir belirteç” olarak kabul edilmektedir. Mitoz süresince eksprese edilmesi, kısa bir yarılanma ömrüne sahip olması ve immünohistokimyasal olarak kolaylıkla tespit edilebilmesi onu benzer amaçla kullanılan diğer belirteçlerden daha avantajlı hale getirmektedir (Scholzen ve Gerdes, 2000, s. 311; Kim vd., 2009; s.151).

Hipokampal proliferasyonun Ki-67 ile takip edildiği çok sayıda çalışma, DG’de hücre proliferasyonundaki artışın nootropik etkinlik ile ilişkili olduğunu göstermiştir (Moon vd. 2016; s.173; Kim ve Park, 2017, s.143). Benzer biçimde, DG’de proliferasyondaki azalma da öğrenme ve bellek süreçlerinde zayıflama ile ilişkili bulunmuştur. Örneğin, SCP ile indüklenmiş amnezi modeli oluşturulmuş farelerde öğrenme ve bellek parametrelerinin yanı sıra; hipokampal nörojenizin göstergesi olarak kabul edilen doublecortin (DCX) ve Ki-67 immünoreaktif hücre sayılarının azaldığı rapor edilmiştir (Lee vd., 2015, s. 1). Diğer bir çalışmada da erişkin erkek farelere kronik SCP

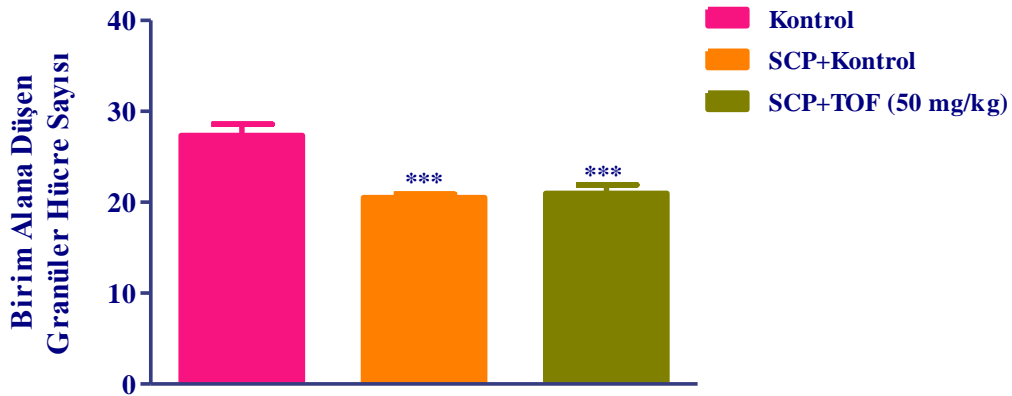
uygulanmasının Ki-67 immünoreaktif hücre sayısını zamana bağlı olarak azalttığı bildirilmiştir (Yan vd., 2014, s. 1731).

Sözü edilen çalışmaların sonuçları ile uyumlu olarak, bu tez çalışmasından elde edilen bulgular da SCP ile deneysel amnezi modeli oluşturulmuş sıçanlarda ortaya çıkan öğrenme ve bellek bozukluklarına Ki-67 immünoreaktivitesinde azalmanın eşlik ettiğini ortaya koymuştur. Diğer yandan 7 günlük TOF tedavisi amnezik sıçanlarda hipokampal formasyonun ilişkili bölgelerinde azalmış olan Ki-67 immünopozitif hücre nükleuslarının sayısını, tedavi edilmeyen amnezik sıçanlara göre anlamlı ölçüde artırmıştır (**Şekil 5.14.**). Elde edilen bu bulgular, TOF'un anti-amnezik etkisinin, bu ilacın nörojenezi artırma kapasitesi ile ilişkili olabileceğine işaret etmektedir.

### 5.3.3. Hipokampal formasyona ait bölgelerde birim alanda bulunan nöron sayılarına ilişkin bulgular

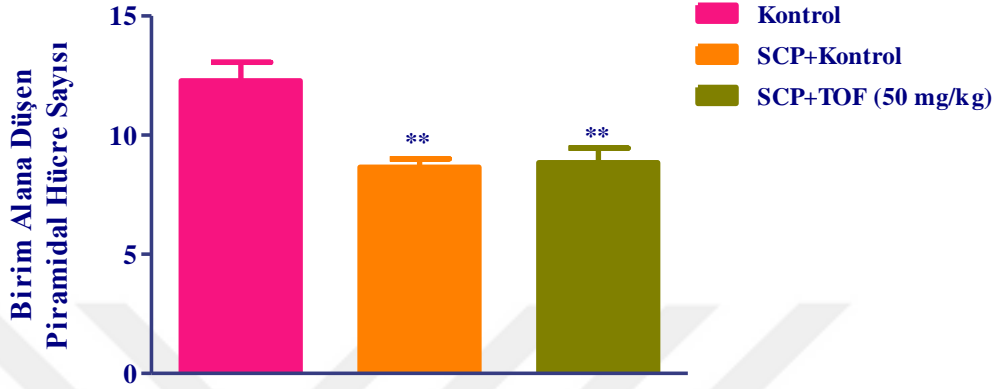
Bu çalışma kapsamında, TOF'un 50 mg/kg dozda 7 günlük uygulamasının DG'de nöronal proliferasyonu artırdığının ortaya konulmasından sonra, bu ilacın hipokampusun DG, CA 1-2 ve CA3 alanlarında nöron sayıları üzerine herhangi bir etki gösterip göstermediği araştırılmıştır.

**Şekil 5.15.**, 7 gün süreyle her gün düzenli olarak kontrol solüsyonu uygulanan sağlıklı (Kontrol) ve kontrol solüsyonu (SCP+Kontrol) veya 50 mg/kg TOF (SCP+TOF) uygulanan amnezik sıçanların DG bölgelerinde birim alana düşen granüler hücre sayılarını göstermektedir [ $F(2,15)= 17,15; p<0,001$ ].



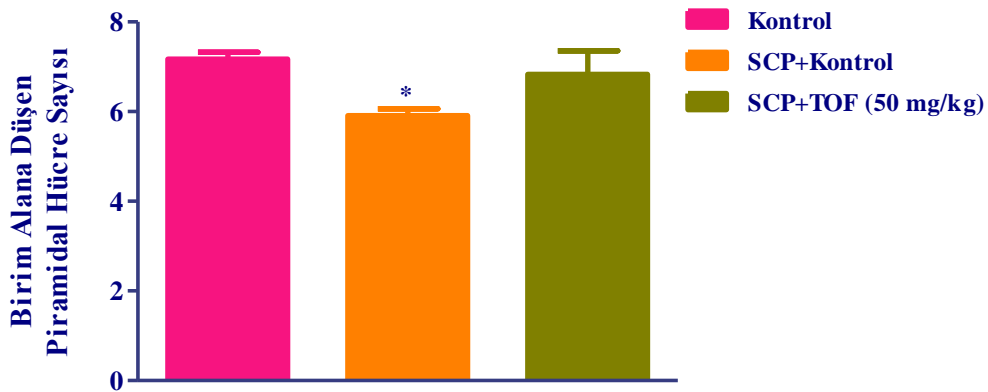
**Şekil 5.15.** 7 gün süreyle her gün düzenli olarak kontrol solüsyonu uygulanan sağlıklı (Kontrol) ve kontrol solüsyonu (SCP+Kontrol) veya 50 mg/kg TOF (SCP+TOF) uygulanan amnezik sıçanların DG bölgelerinde görüntülenen birim alana düşen granüler hücre sayıları. Kontrol grubuna göre anlamlı farklılık \*\*\* $p<0,001$ ; Tek yönlü varyans analizi, takiben Tukey HSD çoklu karşılaştırma testi,  $n=6$ .

**Şekil 5.16.**, 7 gün süreyle her gün düzenli olarak kontrol solüsyonu uygulanan sağlıklı (Kontrol) ve kontrol solüsyonu (SCP+Kontrol) veya 50 mg/kg TOF (SCP+TOF) uygulanan amnezik sıçanların hipokampal CA1-2 alt bölgelerinde birim alana düşen piramidal hücre sayılarını göstermektedir [F(2,15)= 17,15;  $p<0,001$ ].



**Şekil 5.16.** 7 gün süreyle her gün düzenli olarak kontrol solüsyonu uygulanan sağlıklı (Kontrol) ve kontrol solüsyonu (SCP+Kontrol) veya 50 mg/kg TOF (SCP+TOF) uygulanan amnezik sıçanların CA1-2 bölgelerinde birim alana düşen piramidal hücre sayıları. Kontrol grubuna göre anlamlı farklılık \*\*\* $p<0,01$ ; Tek yönlü varyans analizi, takiben Tukey HSD çoklu karşılaştırma testi,  $n=6$ .

**Şekil 5.17.**, 7 gün süreyle her gün düzenli olarak kontrol solüsyonu uygulanan sağlıklı (Kontrol) ve kontrol solüsyonu (SCP+Kontrol) veya 50 mg/kg TOF (SCP+TOF) uygulanan amnezik sıçanların hipokampal CA3 alt bölgelerinde birim alana düşen piramidal hücre sayılarını göstermektedir [F(2,15)= 3,91;  $p<0,05$ ].



**Şekil 5.17.** 7 gün süreyle her gün düzenli olarak kontrol solüsyonu uygulanan sağlıklı (Kontrol) ve kontrol solüsyonu (SCP+Kontrol) veya 50 mg/kg TOF (SCP+TOF) uygulanan amnezik sıçanların hipokampal CA3 bölgelerinde birim alana düşen piramidal hücre sayıları. Kontrol grubuna göre anlamlı farklılık \* $p<0,05$ ; Tek yönlü varyans analizi, takiben Tukey HSD çoklu karşılaştırma testi,  $n=6$ .



Hipokampal bölgelerde nöron sayılarının araştırıldığı testlerden elde edilen verileri değerlendirmek için kullanılan Tukey HSD çoklu karşılaştırma testi sonuçları, deneysel amnezi modeli oluşturan sıçanlarda hipokampal DG (**Şekil 5.15.**), CA1-2 (**Şekil 5.16.**) ve CA3 (**Şekil 5.17.**) alanlarında nöron sayılarının kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde azaldığına işaret etmektedir. Diğer yandan 7 günlük TOF tedavisi amnezik sıçanlarda hipokampal formasyonun söz konusu bölgelerinde azalmış olan nöron sayılarını anlamlı ölçüde değiştirmemiştir.

SCP uygulanmasının hipokampusta piramidal ve granüler hücre tabakalarında birim alanda görüntülenen hücre sayılarını azaltmış olması beklenen bir sonuçtur. Çünkü SCP ile indüklenmiş bellek bozukluğunun artmış  $Ca^{+2}$  influksusu, oksidatif stres ve apoptoz ile karakterize olduğu ve ayrıca hücre viyabilitesini azalttığı bilinmektedir (Fan vd., 2005, s. 222; Konar vd., 2011, s. 5; Jahanshahi vd., 2013, s. 217; Balaban vd., 2017, s. 2866). Ayrıca, SCP'nin sinaptik plastisite ve bellek oluşumunda kritik rol oynayan bir NT olan BDNF ve BDNF seviyesini düzenleyen CREB ekspresyonunu da azalttığı bilinmektedir (Yamada ve Nabeshima, 2003, s. 267; Shi, vd., 2013, s. 245).

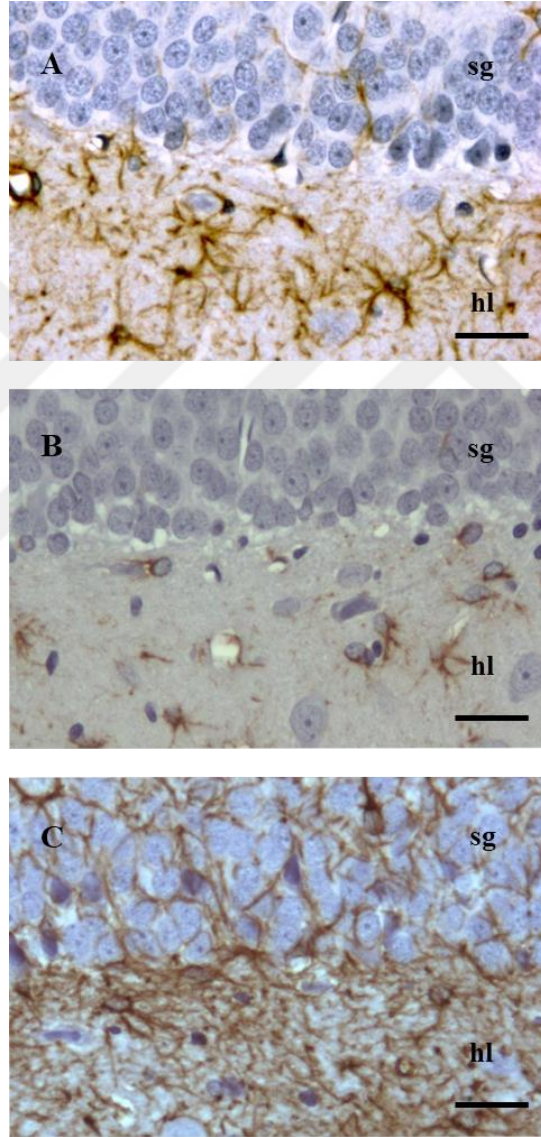
Diğer yandan, TOF ile 7 günlük tedavi, SCP uygulanmasına bağlı olarak hipokampal alt-alanlarda meydana gelen nöron kayıplarını önleyememiştir. TOF'un nörogenез üzerindeki olumlu etkisine rağmen, hipokampal alanlarda nöron sayılarını değiştirmemiş olması ilginç bir bulgudur. Bunun olası bir nedeni ilacın dozlamı ya da uygulama süresi olabilir. Daha yüksek dozda ve/veya daha uzun süreli uygulamaların, nörogenезdeki artışın yanı sıra, olgun nöron sayılarında da artışa neden olması mümkündür. Nitekim CA3 alt-alanlarında birim alanda görüntülenen piramidal nöron sayısı, tedavisiz gruba göre artma eğilimi göstermiş olmakla birlikte, fark istatistiksel anlamlılığa ulaşamamıştır.

#### **5.3.4. Hipokampal formasyona ait bölgelerde GFAP immünoreaktivitelerine ilişkin bulgular**

SSS'de bilişsel işlevlerde, özellikle de belleğin kodlanması ve konsolidasyonu sürecinde, nöronlar ile birlikte önemli rol oynayan diğer bir hücre türü de astrositlerdir (Suzuki vd., 2011, s. 810; Navarrete vd., 2012, s. 1; Han vd., 2013, s.342). Astrositlerin, nöronlara besin desteğinin sağlanması başta olmak üzere; lokal perfüzyon, nörotransmitterlerin ve nöromodülatörlerin salıverilmesi ve geri-alımı, ekstrasellüler alan

geometrisinin ve hacminin kontrolü gibi olayları etkileyerek sinaptik iletimin düzenlenmesine katkıda buldukları bilinmektedir (Fields vd., 2014, s. 427).

Bu nedenle bu çalışmada, TOF'un sinaptik plastisite ve nörogenез üzerindeki olası etkilerinin araştırılmasını takiben, bu ilacın anti-amnezik etkisine astrositlerin olası katılımı da araştırılmıştır. Bu amaçla, SSS'de yoğun olarak olgun astrositlerde bulunan bir protein olan GFAP'ın immunoreaktivitesi değerlendirilmiştir (Middeldorp ve Hol, 2011, s. 421).



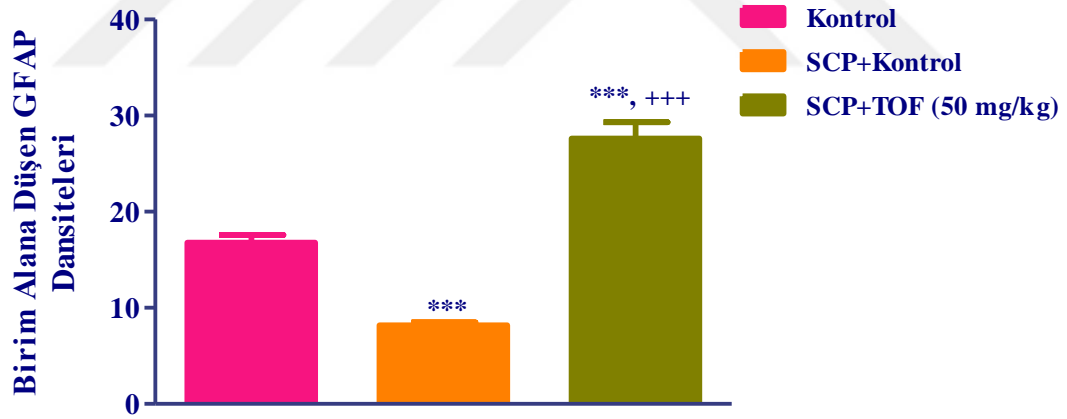
**Şekil 5.18.** 7 gün süreyle her gün düzenli olarak kontrol solüsyonu uygulanan sağlıklı (Kontrol, A) ve kontrol solüsyonu (SCP+Kontrol, B) veya 50 mg/kg TOF (SCP+TOF, C) uygulanan amnezik sıçanların hipokampal DG alanlarında GFAP immünoreaktivitelerinin temsili görüntüleri (Ölçek: 25 µm)

7 gün boyunca her gün düzenli olarak kontrol solüsyonu uygulanan sağlıklı (Kontrol) ve kontrol solüsyonu (SCP+Kontrol) veya 50 mg/kg TOF uygulanan

(SCP+TOF), amnezik sıçanların dokularından elde edilen koronal beyin kesitlerine anti-GFAP antikoru ile yapılan immünohistokimyasal boyamalar sonucu hipokampal DG alanlarından elde edilmiş fotomikrograflar **Şekil 5.18.**'de gösterilmektedir.

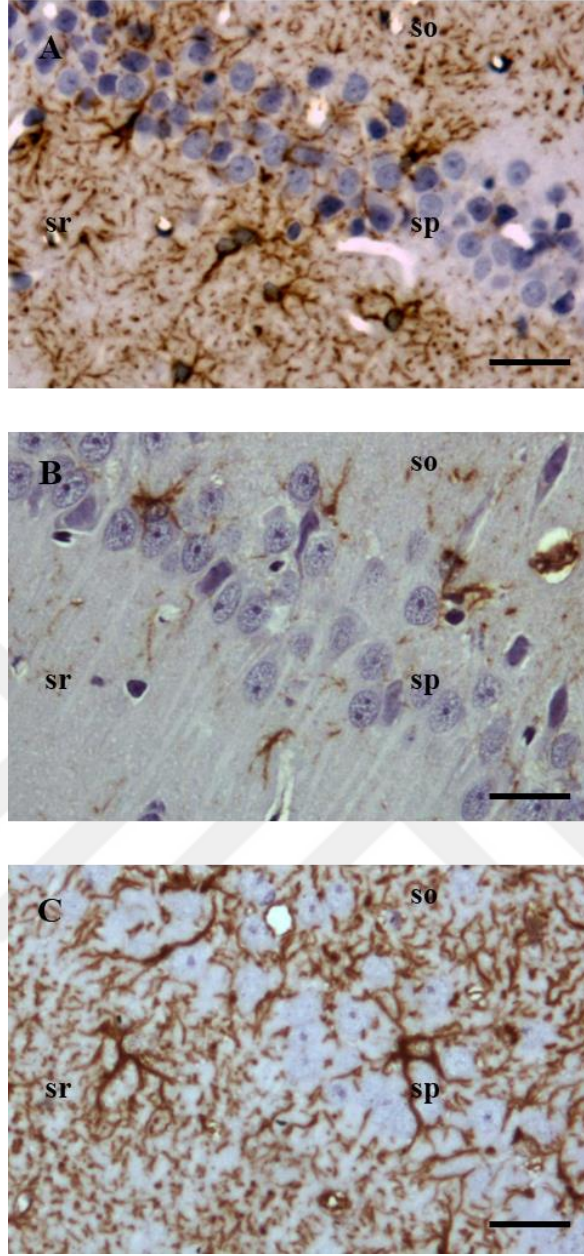
**Şekil 5.18.**'de sunulan fotomikrografta, DG'nin üst kolundaki granüler hücre tabakası hematoksilin Harris solüsyonu ile mavi-mor boyanmış olarak görülmektedir. Kahverengi boyanmış olarak gözlenen immünoreaktif alanlar ise GFAP immünopozitif hücrelerdir. Fotomikrograflarda görülen immünoreaktif alanlar incelendiğinde, kontrol grubuna ait bazal GFAP düzeyinin (**Şekil 5.18A**), SCP uygulanmasına bağlı olarak azaldığı (**Şekil 5.18B**), TOF tedavisinin ise azalmış olan GFAP immünoreaktivitesini artırdığı (**Şekil 5.18C**) görülmektedir.

7 gün boyunca her gün düzenli olarak kontrol solüsyonu uygulanan sağlıklı (Kontrol) ve kontrol solüsyonu (SCP+Kontrol) veya 50 mg/kg TOF uygulanan (SCP+TOF) amnezik sıçanların DG bölgelerinden elde edilmiş fotomikrograflarda birim alana düşen GFAP dansitelerindeki değişim ise **Şekil 5.19.**'da gösterilmiştir [F(2,17)=81,2;  $p<0,001$ ].



**Şekil 5.19.** 7 gün süreyle her gün düzenli olarak kontrol solüsyonu uygulanan sağlıklı (Kontrol) ve kontrol solüsyonu (SCP+Kontrol) veya 50 mg/kg TOF uygulanan (SCP+TOF) amnezik sıçanların DG alanlarında birim alana düşen GFAP dansiteleri. Kontrol grubuna göre anlamlı farklılık \*\*\* $p<0,001$ ; SCP+Kontrol grubuna göre anlamlı farklılık +++ $p<0,001$ ; Tek yönlü varyans analizi, takiben Tukey HSD çoklu karşılaştırma testi,  $n=6$ .

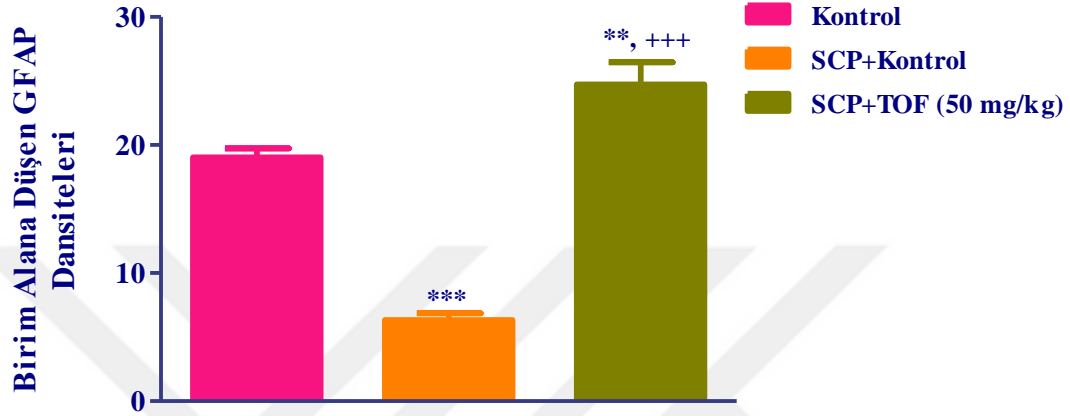
7 gün boyunca her gün düzenli olarak kontrol solüsyonu uygulanan sağlıklı (Kontrol) ve kontrol solüsyonu (SCP+Kontrol) veya 50 mg/kg TOF (SCP+TOF) uygulanan amnezik sıçanların dokularından elde edilen koronal beyin kesitlerine anti-GFAP antikoru ile yapılan immünohistokimyasal boyamalar sonucu hipokampal CA1 alt-alanlarında elde edilen fotomikrograflar **Şekil 5.20.**'de gösterilmektedir.



**Şekil 5.20.** 7 gün süreyle her gün düzenli olarak kontrol solüsyonu uygulanan sağlıklı (Kontrol, A) ve kontrol solüsyonu (SCP+Kontrol, B) veya 50 mg/kg TOF (SCP+TOF, C) uygulanan amnezik sıçanların hipokampal CA1 alt-alanlarında GFAP immünoaktivitelerinin temsili görüntüleri (Ölçek: 25 µm)

Fotomikrograflarda, CA1 alanındaki piramidal hücre tabakası hematoxilen Harris solüsyonu ile mavi-mor boyanmış olarak görülmektedir. CA1 bölgesinde görülen kahverengi boyalı alanlar GFAP immünopozitif astrositleri göstermektedir. Kontrol grubuna ait astrositlerde bazal GFAP düzeyinin (Şekil 5.20A), SCP uygulanmasına bağlı olarak azaldığı (Şekil 5.20B), TOF tedavisinin ise astrositlerde azalmış GFAP immünoaktivitesini artırdığı (Şekil 5.20C) görülmektedir.

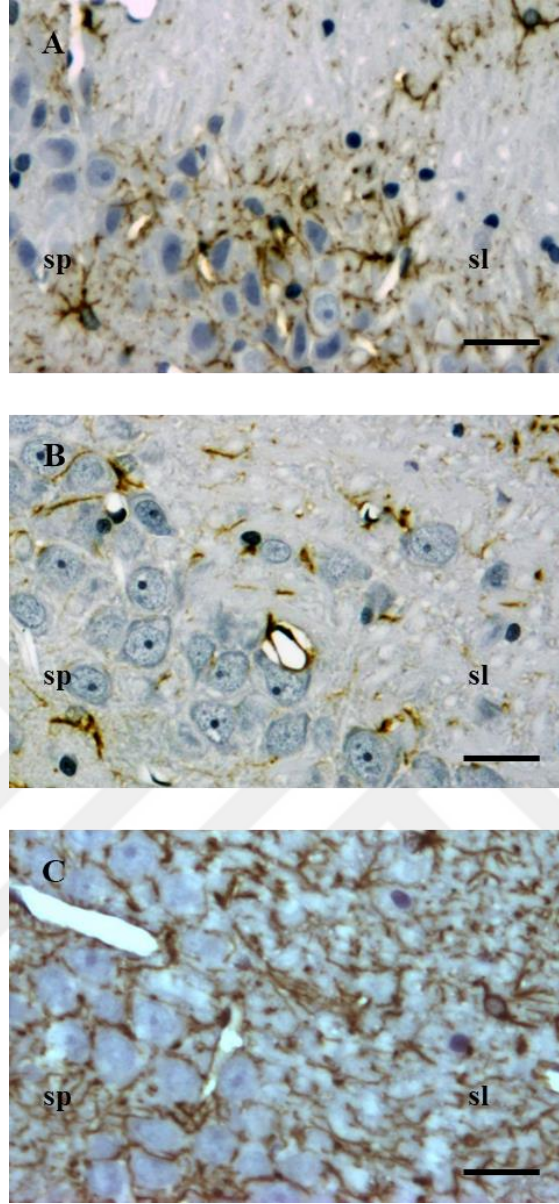
7 gün boyunca her gün düzenli olarak kontrol solüsyonu uygulanan sağlıklı (Kontrol) ve kontrol solüsyonu (SCP+Kontrol) veya 50 mg/kg TOF (SCP+TOF) uygulanan amnezik sıçanların hipokampal CA1-2 alt-alanlarından elde edilmiş fotomikrograflarda birim alana düşen GFAP dansitelerindeki değişim ise Şekil 5.21.'de gösterilmiştir [F (2,17)=70,84;  $p<0,001$ ].



**Şekil 5.21.** 7 gün süreyle her gün düzenli olarak kontrol solüsyonu uygulanan sağlıklı (Kontrol) ve kontrol solüsyonu (SCP+Kontrol) veya 50 mg/kg TOF (SCP+TOF) uygulanan amnezik sıçanların hipokampal CA1-2 alt-alanlarında birim alana düşen GFAP dansitesi. Kontrol grubuna göre anlamlı farklılık \*\* $p<0,01$ ; \*\*\* $p<0,001$ ; SCP+Kontrol grubuna göre anlamlı farklılık \*\*\* $p<0,001$ ; Tek yönlü varyans analizi, takiben Tukey HSD çoklu karşılaştırma testi,  $n=6$ .

7 gün boyunca her gün düzenli olarak kontrol solüsyonu uygulanan sağlıklı (Kontrol) ve kontrol solüsyonu (SCP+Kontrol) veya 50 mg/kg TOF (SCP+TOF) uygulanan amnezik sıçanların dokularından elde edilen koronal beyin kesitlerine anti-GFAP antikoruna ile yapılan immünohistokimyasal boyamalar sonucu hipokampal CA3 alt-alanlarından elde edilen fotomikrograflar Şekil 5.22.'de gösterilmektedir.

Söz konusu fotomikrograflarda, CA3 alanındaki piramidal hücre tabakası hematoksilin Harris solüsyonu ile mavi-mor boyanmış olarak görülmektedir. CA3 bölgelerinde görülen kahverengi boyalı alanlar GFAP immünopozitif astrositleri göstermektedir. Kontrol grubuna ait astrositlerde bazal GFAP düzeyinin (Şekil 5.22A), SCP uygulanmasına bağlı olarak azaldığı (Şekil 5.22B) ve TOF tedavisinin astrositlerdeki azalmış GFAP immünoreaktivitesini artırdığı (Şekil 5.22C) görülmektedir.

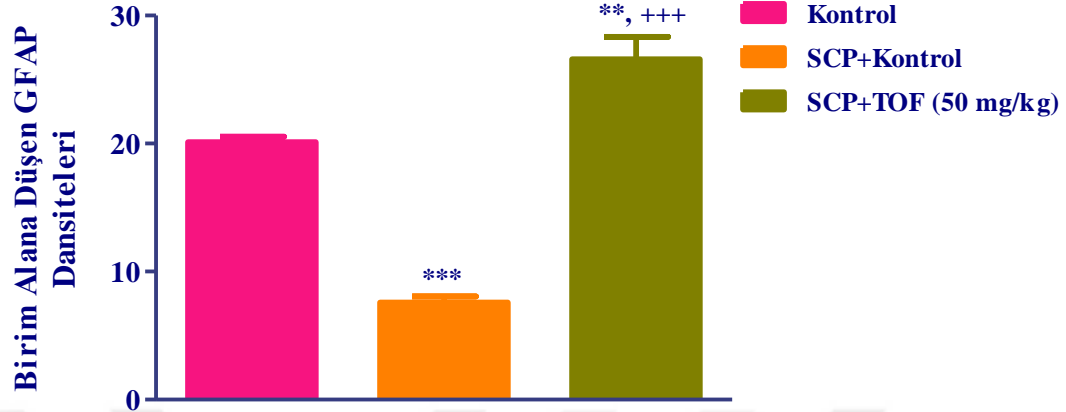


**Şekil 5.22.** 7 gün süreyle her gün düzenli olarak kontrol solüsyonu uygulanan sağlıklı (Kontrol, A) ve kontrol solüsyonu (SCP+Kontrol, B) veya 50 mg/kg TOF (SCP+TOF, C) uygulanan amnezik sıçanların hipokampal CA3 alanlarında GFAP immünoreaktivitelerinin temsili görüntüleri (Ölçek: 25 µm)

7 gün boyunca her gün düzenli olarak kontrol solüsyonu uygulanan sağlıklı (Kontrol) ve kontrol solüsyonu (SCP+Kontrol) veya 50 mg/kg TOF (SCP+TOF) uygulanan amnezik sıçanların hipokampal CA3 alt-alanlarından elde edilmiş fotomikrograflarda birim alana düşen GFAP dansitelerindeki değişim ise **Şekil 5.23.**'te gösterilmiştir [ $F(2,17)=81,32; p<0,001$ ].

Hipokampal GFAP immünoreaktivitesinin araştırıldığı testlerden elde edilen verileri değerlendirmek için kullanılan Tukey HSD çoklu karşılaştırma testi sonuçları, deneysel amnezi modeli oluşturan sıçanlarda DG (**Şekil 5.19.**), CA1-2 (**Şekil 5.21.**) ve

CA3 (Şekil 5.23.) bölgelerinde birim alana düşen GFAP dansitesinin, kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde azaldığına işaret etmektedir.



Şekil 5.23. 7 gün süreyle her gün düzenli olarak kontrol solüsyonu uygulanan sağlıklı (Kontrol) ve kontrol solüsyonu (SCP+Kontrol) veya 50 mg/kg TOF (SCP+TOF) uygulanan amnezik sıçanların hipokampal CA3 alt-alanlarında birim alana düşen GFAP dansiteleri. Kontrol grubuna göre anlamlı farklılık \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ ; SCP+Kontrol grubuna göre anlamlı farklılık +++ $p < 0,001$ ; Tek yönlü varyans analizi, takiben Tukey HSD çoklu karşılaştırma testi,  $n=6$ .

GFAP, SSS’de yoğun olarak olgun astrositlerde (Middeldorp ve Hol, 2011, s. 421) sentezlenen tip III ara filament proteinidir (Bodega vd., 1994, s. 113). GFAP, glial hücrelerin sitoskelet filamentlerinin oluşumuna ve miyelinizasyona, hücre adezyonuna, proliferasyona, nörit büyümesine ve sinaptogeneze katılan spesifik bir astrosit işaretleyicidir (Konar vd., 2015, s.2). Nöronlara yapısal destek sağlayan ve SSS’de morfogenez için gerekli bir protein olan GFAP (Drozdov ve Chorna, 2003, s.98) nöron-glia etkileşimlerini kontrol eden bir glial plastisite belirteci olarak kabul edilmektedir (Konar vd., 2011, s.2; Middeldorp ve Hol, 2011, s. 428-433).

Bu tez çalışmasında, SCP ile amnezi oluşturulmuş sıçanlarda hipokampusun tüm bölgelerinde GFAP miktarının azaldığı belirlenmiştir (Şekil 5.19., 5.21. ve 5.23.). SCP’nin nöroplastisite moleküllerinin down-regülasyonuna neden olduğu ve nöronların yanı sıra glial hücrelere de zarar verdiği göz önünde bulundurulduğunda (Konar vd., 2011, s.1), SCP ile indüklenen amnezi modelinde GFAP immunoreaktivitesindeki azalma açıklanabilir. Nitekim, SCP ile amnezi oluşturulmuş deney hayvanlarında GFAP immunoreaktivitesinin azaldığına ilişkin önceki çalışmalar, bu çalışmada elde edilen bulguları destekler niteliktedir. Örneğin, farelere *i.p.* SCP uygulamasının, BDNF ve GFAP ekspresyonlarında doza ve zamana bağımlı bir down-regülasyona neden olduğu gösterilmiştir (Konar vd., 2011, s.1). Aynı çalışma grubu tarafından yapılan bir başka

çalışmada da SCP ile amnezi oluşturulan farelerin beyinlerinde nöronal (BDNF ve Ark) ve glial (GFAP) plastisite belirteçlerinin ekspresyonlarının ve protein seviyelerinin sağlıklı kontrollere göre azaldığı bildirilmiştir (Konar vd., 2015, s.1). Jahanshahi ve arkadaşları tarafından yapılan diğer bir çalışmada ise, bir hafta süresince her gün SCP enjekte edilen (*i.p.*) sıçanlarda, hipokampal formasyonun tüm alanlarındaki astrosit sayılarının kontrol grubuna kıyasla anlamlı ölçüde azaldığı rapor edilmiştir (Jahanshahi vd., 2012b, s. 92). SCP ile amnezi oluşturulmuş deney hayvanlarında GFAP immunoreaktivitesinin azaldığına ilişkin önceki çalışmalar, bu çalışmada elde edilen bulguları destekler niteliktedir.

Literatürde, SCP uygulamasının beyinde astrosit sayısını artırdığına (Ghumatkar vd., 2015, s. 189; Xu vd., 2016, s. 211) ya da bazı alanlarda artırıp bazı alanlarda azalttığına (Azami vd., 2012, s. 36; Jahanshahi vd., 2012a, s. 392) ilişkin bir kaç çalışma bulunmakla beraber; kullanılan hayvanın türü, uygulama yolu/süresi ve deneysel/çevresel koşulların farklılığı çalışma sonuçları arasındaki farklılıklara neden olmuş olabilir.

Bu tez çalışmasında, 7 günlük TOF tedavisinin amnezik sıçanlarda hipokampal formasyonun alt-alanlarında azalmış olan GFAP immünoreaktivitesini, tedavi edilmeyen amnezik sıçanlara göre anlamlı ölçüde artırdığı saptanmıştır (**Şekil 5.19., 5.21. ve 5.23.**). Elde edilen bu bulgular, TOF uygulamasının, astrosit aktivasyonunu artırdığına ve SCP tarafından zayıflatılmış olan glial plastisiteyi güçlendirmiş olduğuna işaret etmektedir.

Glial hücrelerin ve GFAP'ın nöronal girdiyi entegre ettikleri, sinaptik aktiviteyi modüle ettikleri, sitoskeletal filamentlerin oluşumu yoluyla öğrenme ve bellek ile ilgili sinyalleri işledikleri ve bellek oluşum mekanizmalarını kontrol ettikleri bilinmektedir (Kurosinski ve Gotz, 2002, s. 1524; Konar vd., 2011, s. 2). Bu bilgiden hareketle, glial plastisitede TOF ile indüklenen artışın, bu ilacın bilişsel süreçler üzerindeki olumlu etkisine katkıda bulunmuş olması son derece olası görünmektedir.

Diğer yandan, TOF uygulamasının GFAP immunoreaktivitesini, SCP uygulanmamış sağlıklı hayvanların seviyesinden de yukarıya taşımış olması dikkat çekicidir. Astrositlerin beyin homeostazında merkezi rollerinin olduğu ve çeşitli nöroprotektif ve nörotrofik moleküllerin salıverilmesinde görev aldıkları bilinmektedir. Ayrıca, astrosit aktivitesindeki artışın nöronal dejenerasyona karşı koruyucu bir reaksiyon olarak ortaya çıktığı da vurgulanmaktadır (Yelkenli vd., 2016, s. 286). TOF'un hipokampal alanlarda nöron kaybını önleyemediğine dair bulgular göz önünde bulundurulduğunda, astrositlerin söz konusu alanlarda “nöronal hasarı tamir etmek”



amacıyla yığılmış olması olasıdır. Çünkü astrosit aktivasyonunun skar oluşumu için kritik olduğu; inflamatuvar hücrelerin yayılmasını ve kalıcılığını azalttığı, kan-beyin bariyerinin bütünlüğünü koruduğu, doku hasarını ve lezyon boyutunu azalttığı ve nöronal kayıp ve demiyelinizasyonu hafiflettiği bilinmektedir (Sofroniew, 2005, s. 400; Barres, 2008, s. 430). Bu bağlamda, 7 günlük TOF uygulamasının hipokampal nöron kaybını önleyemediği; ancak en azından astrosit aktivasyonu yolu ile nöronal hasarı tamir etmiş olabileceği ileri sürülebilir. Ancak, bu hipotezin geçerlilik kazanması için ek çalışmalara gereksinim duyulmaktadır.



## 6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında, 2,3-benzodiazepin türevi anksiyolitik etkili bir ilaç olan TOF'un bilişsel bozuklukların tedavisindeki olası terapötik potansiyeli, SCP ile deneysel amnezi modeli oluşturularak araştırılmıştır.

Bu tez çalışmasından elde edilen bulgular, TOF'un 50 mg/kg dozda 7 gün uygulanmasının, amnezik sıçanlarda Moris su labirenti testi ile değerlendirilen "uzamsal" ve pasif sakınma testi ile değerlendirilen "emosyonel" öğrenme ve bellek parametrelerini, referans ilaç PRS ile karşılaştırılabilir ölçüde düzelttiğine işaret etmiştir. Davranış deneylerini takiben, TOF'un bu çalışmada ilk kez gösterilen anti-amnezik etkisinin ilişkili olabileceği bazı olası hipokampal morfolojik değişimler de çeşitli immunohistokimyasal yöntemler ile araştırılmıştır.

Bu çalışmada, TOF'un anti-amnezik etkisine sinaptogenez üzerindeki olası bir değişikliğin aracılık edip etmediği, pre-sinaptik bir integral membran glikoproteini olan sinaptofizin'in immünoreaktivitesi üzerinden değerlendirilmiştir. Elde edilen bulgular, TOF tedavisinin SCP uygulaması ile hipokampal CA1-2, CA3 ve DG bölgelerinde azalmış olan sinaptofizin dansitesini artırdığını göstermiştir.

TOF'un anti-amnezik etkisine, nörogenez süreçlerindeki proliferatif bir değişikliğin katılıp katılmadığı ise mitotik bir belirteç olan Ki-67 kullanılarak araştırılmıştır. TOF tedavisi, SCP uygulaması ile hipokampal DG'de azalmış olan Ki-67 immünoreaktivitesini artırmıştır. Bununla birlikte, söz konusu anti-amnezik etkinin, hipokampal nöron sayısındaki olası bir değişim ile ilişkili olup olmadığı da incelenmiştir. Elde edilen veriler, SCP ile amnezi oluşturulan sıçanlarda hipokampusun CA1-2, CA3 ve DG bölgelerinde birim alana düşen nöron sayılarında önemli azalmalar olduğuna ve TOF tedavisinin söz konusu nöron kaybını düzeltmediğine işaret etmiştir.

Diğer yandan, TOF'un anti-amnezik etkisinin, glial plastise üzerindeki olası bir değişiklik ile ilişkili olup olmadığı da spesifik bir astrosit işaretleyicisi olan GFAP immünoreaktivitesi üzerinden değerlendirilmiştir. Elde edilen bulgular, TOF tedavisinin SCP uygulaması ile hipokampal CA1-2, CA3 ve DG bölgelerinde azalmış olan GFAP dansitesini artırdığını göstermiştir.

İmmunohistokimyasal bulgular birlikte değerlendirildiğinde, SCP uygulamasının hipokampusun CA1-2, CA3 ve DG bölgelerinde sinaptik transmisyonu zayıflattığı, ani nöron kayıplarına ve astroglial geri çekilmeye neden olduğu ve ayrıca DG'nin subgranüler bölgesinde proliferasyonun azalmasına yol açtığı sonucuna ulaşılmıştır.

Bununla birlikte, 50 mg/kg TOF ile yapılan 7 günlük tedavinin, sıçanlarda öğrenme ve bellek parametrelerindeki düzelmeye paralel bir şekilde hipokampusta sinaptik plastisiteyi, nörogenezi ve glial plastisiteyi güçlendirdiğine ilişkin bulgular elde edilmiştir. TOF, nörogenez üzerindeki olumlu etkisine rağmen; hipokampal alanlarda nöron kaybını düzeltmemiştir. Daha yüksek dozda ve/veya daha uzun süreli uygulamaların, nörogenezdeki artışın yanı sıra; olgun nöron sayılarında da artışa neden olması mümkündür. Nitekim CA3 alt-alanında birim alanda görüntülenen toplam piramidal nöron sayısı, tedavisiz gruba göre artma eğilimi göstermiş olmakla birlikte; fark istatistiksel anlamlılığa ulaşamamıştır.

Diğer yandan, TOF tedavisinin hipokampal morfoloji üzerine etkilerine ilişkin daha detaylı çalışmalar yapmak da mümkündür. Örneğin, TOF'un sinaptik plastisite üzerindeki etkinliği özellikle sinaps sayısını yansıtan presinaptik bir protein olan sinaptofizin'in yanı sıra; sinapslarda reseptörler ve sitoskeletal elementlerle ilişkili post sinaptik bir protein olan post sinaptik yoğunluk-95 (PSD-95) immunoreaktivitesi üzerinden de değerlendirilebilir (Choi vd., 2011, s. 93).

Benzer biçimde, erişkin DG'de proliferatif olayları incelemek üzere Ki-67'nin yanı sıra; 5-bromo-2'-deoksiuridin (BrdU), proliferatif hücre nükleer antijeni (PCNA), fosfohiston H<sub>3</sub> (PH<sub>3</sub>), MCM<sub>2</sub> (minikromozom bakım proteini 2) gibi işaretleyiciler ile de çalışılabilir (von Bohlen und Halbach O, 2011, s. 1). Ancak söz konusu işaretleyicilerden hiçbirinin Ki-67'ye işlevsel bir üstünlüğü yoktur.

Diğer yandan, glial plastisenin ve astrosit aktivasyonunun değerlendirilmesi için GFAP'ın yanı sıra Ca<sup>+2</sup> bağlayıcı bir protein olan S100β da kullanılabilir. S100β'nin astrositler için en spesifik ve güvenilir işaretleyicilerden biri olduğu düşünülmekle birlikte, bu belirtecin DG'de, radyal astrositleri değil; yalnızca yatay astrositleri boyayabildiği bilinmektedir (Savchenko vd., 2000, s.195; Seri vd., 2004, s.359). Astrositlerde gösterilebilen diğer belirteçler olan EAAT1 (glutamat-aspartat taşıyıcı, GLAST)'in ve EAAT2 (glutamat taşıyıcı, GLT1)'nin hipokampal kültürlerde nöronal alt popülasyonlar tarafından da eksprese edildiği bilinmektedir (Brooks-Kayal vd., 1998, s.95; Plachez vd., 2000, s. 587). Nitekim EAAT2'nin en azından hipokampal CA1-CA3 alt-alanlarında astrositlerin yanı sıra nöronları da işaretlediği gösterilmiştir (von Bohlen und Halbach, 2011, s.10). Bu bağlamda, sözü edilen işaretleyicilerden hiçbirinin bu çalışmada kullanılan belirteç olan GFAP'a üstünlüğü bulunmamaktadır.

Bu çalışmanın devamında, TOF'un nörogenez üzerindeki etkilerinin daha detaylı biçimde araştırılması planlanmaktadır. Bu amaçla, bu ilacın nörogenezin erken evrelerinde progenitor hücreler üzerinde neden olduğu değişiklikleri incelemek üzere nestin, Sox2, Musashi-1 ve Pax 6 gibi işaretleyicilerin kullanılması düşünülmektedir. Diğer yandan, bu ilacın glial lineage üzerine etkilerinin vimentin ve beyin lipid bağlayıcı proteini (brain lipid-binding protein, BLBP) gibi belirteçler kullanılarak (Bramanti vd., 2010, s. 558); nöronal lineage üzerine etkilerinin ise eomesodermin (Tbr2), nörojenik farklılaşma faktörü (NeuroD), polisialile-nöral hücre adezon molekülü (PSA-NCAM), TUC-4, DCX, nöron spesifik sınıf III beta-tübülin (Tuj-1) ve kalretinin kullanılarak incelenmesi mümkündür. TOF'un nörogenezin geç evreleri üzerine etkileri de DG'de olgun nöronları işaretleyen kalbindin, NeuN (nöronal nükleus) ve Prox-1 gibi belirteçler ile araştırılabilir (von Bohlen und Halbach, 2011, s. 1).

TOF'un hipokampus morfolojisi üzerindeki etkilerine ilişkin bulgular, bu ilacın anti-amnezik etki mekanizmasına bir ölçüde ışık tutmuş olmakla birlikte; söz konusu farmakolojik etkinin altında yatan diğer olası mekanizmalar hala aydınlatılmayı beklemektedir.

Bunlardan biri TOF'un PDE enzim inhibitörü etkisi ile ilişkili olabilir. PDE inhibitörlerinin beyindeki sinyal yollarında sAMP ve/veya sGMP gibi ikinci habercilerin düzeylerini yükseltip, bellek konsolidasyonu için gerekli olan CREB fosforilasyonunu artırarak öğrenme ve belleği güçlendirdikleri bilinmektedir (Domek-Łopacińska ve Strosznajder, 2008, s. 68; Rutten vd., 2008, s. 643; García-Barroso vd., 2014, s. S561; Redrobe ve ark., 2014, s. 3151). Bu bağlamda, TOF'un PDE enzim inhibitörü etkisinin (Nielsen vd., 2007; Bernard vd., 2008, s. 3196; Rundfelt vd., 2010, s. 1323), bu çalışmada ortaya konulan anti-amnezik etki potansiyeli ile ilişkili olması olası görünmektedir. Bu tez çalışmasından elde edilen immünohistokimyasal bulguları destekler nitelikte olmak üzere; PDE inhibitörlerinin sinaptik plastisiteyi güçlendirdiklerine (Boess vd., 2004, s. 1081; Barad vd., 1998, s. 15020; Kroker vd., 2012, s. 1964) ve DG'de proliferasyonu artırdıklarına (Nakagawa vd., 2002, s. 1373) ilişkin raporlar, TOF'un etki mekanizmasının PDE enzim inhibisyonu ile ilişkili olabileceği görüşünü desteklemektedir. Bununla birlikte, bu hipotezin doğruluğunun uygun deneysel yöntemler ile test edilmesi gereklidir.

Diğer yandan kolinerjik, glutamaterjik ve nitreerjik sistemler başta olmak üzere, SSS'de öğrenme ve bellek ile ilişkili olduğu bilinen çeşitli nörotransmitter/nöromodülatör

sistemlerin de, bu çalışmada ortaya konulan anti-amnezik etkiye katılmış olması mümkündür. Dolayısıyla, ilişkili olabilecek tüm nörotransmitter/nöromodülatör sistemlerin olası katılımlarının uygun mekanistik çalışmalar ile araştırılması gerekmektedir.

TOF'un bilişsel işlevler üzerine olumlu etkilerinin nöronal sağkalım, büyüme ve farklılaşmanın temel düzenleyicileri olan nörotrofik faktörler ile ilişkili olması da mümkündür. Başta BDNF olmak üzere NT'lerin nöronal plastisiteyi destekledikleri ve bilişsel süreçleri güçlendirdikleri bilinmektedir (Lim vd., 2014, s. 1058; Mitre vd., 2017, s.13). Bu bağlamda, TOF'un nörotrofik faktörlerin ekspresyonları, miktarları ve işlevleri üzerine olası etkileri de araştırılması gereken diğer konular arasındadır.

Sonuç olarak, TOF'un skopolamin ile indüklenen amnezi modeli üzerine terapötik etki potansiyeli ve hipokampal sinaptogenez, nörogenez ve glial plastise üzerindeki olumlu etkileri bu tez çalışması ile ilk kez ortaya konulmuştur. Anksiyete tedavisinde sıklıkla başvuru alan ilaçlar olan klasik 1,4-benzodiazepinlerin en önemli yan etkilerinden birinin amnezi olduğu (Chapouthier ve Venault, 2002, s.841; Inamura vd., 2015, s. 171) göz önünde bulundurulduğunda, anksiyolitik bir ilaç olan TOF'un, bilişsel işlevler üzerindeki olumlu etkilerinin klinik açıdan önemi daha iyi anlaşılabilir.

TOF'un farmakolojik etki profili göz önünde bulundurulduğunda, bu ilacın demans hastalarında ortaya çıkan anksiyetin (Kraus vd., 2008, s.186; Seignourel vd., 2008, s. 1071; Barton vd., 2017, baskıda;) tedavisi için iyi bir seçenek olabileceği düşünülebilir. Diğer yandan, TOF'un bu prelinik çalışma ile ortaya konulmuş olan anti-amnezik etki potansiyelinin, bilişsel işlev bozukluğu olan çeşitli hasta grupları üzerinde yapılacak iyi tasarlanmış klinik araştırmalar ile doğrulanması gerekmektedir.

## KAYNAKÇA

- Adamsky, A., Goshen, I. (2017) Astrocytes in memory function: Pioneering findings and future directions. *Neuroscience*. pii: S0306-4522(17)30367-6.
- Aimone, J.B., Wiles, J., Gage, F.H. (2006) Potential role for adult neurogenesis in the encoding of time in new memories. *Nat. Neurosci.* 9 (6), 723–727.
- Akar, F., Mutlu, O., Çelikyurt, I.K., Ulak, G., Erden, F., Bektaş, E., Tanyeri, P. (2015) Effects of rolipram and zaprinast on learning and memory in the morris water maze and radial arm maze tests in naive mice. *Drug Res. (Stuttg)*. 65 (2), 86-90.
- Akar, F., Mutlu, O., Komşuoğlu Çelikyurt, I., Ulak, G., Erden, F., Bektaş, E., Tanyeri, P. (2014) Zaprinast and rolipram enhances spatial and emotional memory in the elevated plus maze and passive avoidance tests and diminishes exploratory activity in naive mice. *Med. Sci. Monit. Basic Res.* 24 (20), 105-111.
- Albiston, A.L., Pederson, E.S., Burns, P., Purcell, B., Wright, J.W., Harding, J.W., Mendelsohn, F.A., Weisinger, R.S., Chai, S.Y. (2004) Attenuation of scopolamine-induced learning deficits by LVV-hemorphin-7 in rats in the passive avoidance and water maze paradigms. *Behav. Brain Res.* 154, 239-243.
- Alder, J., Kanki, H., Valtorta, F., Greengard, P., Poo, M.M. (1995) Overexpression of synaptophysin enhances neurotransmitter secretion at *Xenopus* neuromuscular synapses. *J. Neurosci.* 15 (1 Pt 2), 511-519.
- Alikatte, K.L., Akondi, B.R., Yerragunta, V.G., Veerareddy, P.R., Palle, S. (2012) Antiamnesic activity of *Syzygium cumini* against scopolamine induced spatial memory impairments in rats. *Brain Dev.* 34 (10), 844-851.
- Alonso, M., Vianna, M.R., Depino, A.M., Mello e Souza, T., Pereira, P., Szapiro, G., Viola, H., Pitossi, F., Izquierdo, I., Medina, J.H. (2002) BDNF-triggered events in the rat hippocampus are required for both short- and long-term memory formation. *Hippocampus*. 12 (4), 551-560.
- Altman, J. (1963) Autoradiographic investigation of cell proliferation in the brains of rats and cats. *Anat. Rec.* 145, 573–591.
- Altman, J. (1969) Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *J. Comp. Neurol.* 137, 433-457.
- Altman, J., Das, G.D. (1965) Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J. Comp. Neurol.* 124, 319–335.

- Anderson, B.J., Rapp, D.N., Baek, D.H., McCloskey, D.P., Coburn-Litvak, P.S., Robinson, J.K. (2000) Exercise influences spatial learning in the radial arm maze. *Physiol. Behav.* 70 (5), 425-429.
- Andrási, F., Horváth, K., Sineger, E., Berzsényi, P., Borsy, J., Kenessey, A., Tarr, M., Láng, T., Kőrösi, J., Hámori, T. (1987) Neuropharmacology of a new psychotropic 2,3-benzodiazepine. *Arzneimittelforschung.* 37 (10), 1119-1124.
- Araque, A., Carmignoto, G., Haydon, P.G., Oliet, S.H.R., Robitaille, R., Volterra, A. (2014) Gliotransmitters travel in time and space. *Neuron.* 81, 728-739.
- Arushanian, é.B., Mastiagina, O.A., Popova, A.P. (2004) [Peculiarities in the effect of tofisopam and valerian extract on short-term memory and anxiety states in healthy humans]. *Eksp. Klin. Farmakol.* 67 (6), 23-25.
- Atkinson, R.C., Shiffrin, R.M. (1968) Human memory: a proposed system and its control processes. *Psychol. Learn. Motiv.* 2, 89-195.
- Atri, A., Sherman, S., Norman, K.A., Kirchhoff, B.A., Nicolas, M.M., Greicius, M.D., Cramer, S.C., Breiter, H.C., Hasselmo, M.E., Stern, C.E. (2004) Blockade of central cholinergic receptors impairs new learning and increases proactive interference in a word paired-associate memory task. *Behav. Neurosci.* 118, 223–236.
- Azami, N., Heidari, M., Jahanshahi, M. (2012) The evaluation of amnesia induced by scopolamine on the astrocytes number in rats dentate gyrus. *JBUMS.* 14 (1), 36-44.
- Bailey, J.M. Oliveri, A.N., Levin, E.D. (2015) Pharmacological analyses of learning and memory in zebrafish (*Danio rerio*). *Pharmacol. Biochem. Behav.* 139, 103-111.
- Bakker, A., Kirwan, C.B., Miller, M., Stark, C.E. (2008) Pattern separation in the human hippocampal CA3 and dentate gyrus. *Science.* 319 (5870),1640-1642.
- Balaban, H., Nazıroğlu, M., Demirci, K., Övey, İ.S. (2017) The Protective role of selenium on scopolamine-induced memory impairment, oxidative stress, and apoptosis in aged rats: the involvement of TRPM2 and TRPV1 channels. *Mol. Neurobiol.* 54 (4), 2852-2868.
- Barad, M., Bourtchouladze, R., Winder, D.G., Golan, H., Kandel, E. (1998) Rolipram, a type IV-specific phosphodiesterase inhibitor, facilitates the establishment of long-lasting long-term potentiation and improves memory. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 95 (25), 15020-15025.
- Barres, B.A. (2008) The mystery and magic of glia: a perspective on their roles in health and disease. *Neuron.* 60 (3), 430-440.

- Barret K.E., Brooks, H., Boitano, S., Barman, S. (2010) Ganong's review of medical physiology (23th Edition). New York: Mac Graw Hill Medical.
- Barton, K., Johnson, I., Mountford, A. (2017) Development of a psychosocial group intervention for individuals with mild cognitive impairment (innovative practice). *Dementia (London)*. [Epub ahead of print].
- Başar-Eroglu, C., Strüber, D., Schürmann, M., Stadler, M., Başar, E. (1996) Gamma-band responses in the brain: a short review of psychophysiological correlates and functional significance. *Int. J. Psychophysiol.* 24, 101–112.
- Bayley, P.J., Gold, J.J., Hopkins, R.O., Squire, L.R. (2005) The neuroanatomy of remote memory. *Neuron.* 46 (5), 799–810.
- Bazargani, N., Attwell, D. (2016) Astrocyte calcium signaling: the third wave. *Nat. Neurosci.* 19, 182–189.
- Becker, S. (2005) A computational principle for hippocampal learning and neurogenesis. *Hippocampus.* 15 (6), 722–738.
- Bejar, C., Wang, R.H., Weinstock, M. (1999) Effect of rivastigmine on scopolamine-induced memory impairment in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 383 (3), 231-240.
- Bernard, P., Dufresne-Favetta, C., Favetta, P., Do, Q.T., Himbert, F., Zubrzycki, S., Scior, T., Lugnier, C. (2008) Application of drug repositioning strategy to TOFISOPAM. *Curr. Med. Chem.* 15 (30), 3196-3203.
- Berridge, C.W., Waterhouse, B.D. (2003) The locus coeruleus-noradrenergic system: modulation of behavioral state and state-dependent cognitive processes. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 42 (1), 33-84.
- Blake, M.G., Boccia, M.M. (2017) Basal forebrain cholinergic system and memory. *Curr. Top. Behav. Neurosci.* [Baskıda].
- Bliss, T.V., Collingridge, G.L. (1993) A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature.* 361 (6407), 31-39.
- Bliss, T.V., Gardner-Medwin, A.R. (1973) Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the unanaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J. Physiol.* 232 (2), 357-374.
- Bliss, T.V., Lomo, T. (1973) Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J. Physiol.* 232 (2), 331-356.



- Blokland, A. (1995) Acetylcholine: a neurotransmitter for learning and memory? *Brain Res. Brain Res. Rev.* 21 (3), 285-300.
- Blokland, A., Honig, W., Raaijmakers, W.G.M. (1992) Effects of intra-hippocampal scopolamine injections in a repeated spatial acquisition task in the rat. *Psychopharmacology (Berl)*. 109, 373–376.
- Bodega, G., Suárez, I., Rubio, M., Fernández, B. (1994) Ependyma: phylogenetic evolution of glial fibrillary acidic protein (GFAP) and vimentin expression in vertebrate spinal cord. *Histochemistry*. 102 (2), 113-122.
- Boess, F.G., Hendrix, M., van der Staay, F.J., Erb, C., Schreiber, R., van Staveren, W., de Vente, J., Prickaerts, J., Blokland, A., Koenig, G. (2004) Inhibition of phosphodiesterase 2 increases neuronal cGMP, synaptic plasticity and memory performance. *Neuropharmacology*. 47 (7), 1081-1092.
- Boury-Jamot, B., Carrard, A., Martin, J.L., Halfon, O., Magistretti, P.J., Boutrel, B. (2016a) Disrupting astrocyte-neuron lactate transfer persistently reduces conditioned responses to cocaine. *Mol. Psychiatry*. 21, 1070–1076.
- Boury-Jamot, B., Halfon, O., Magistretti, P.J., Boutrel, B. (2016b) Lactate release from astrocytes to neurons contributes to cocaine memory formation. *BioEssays*. 38, 1266-1273.
- Bramanti, V., Tomassoni, D., Avitabile, M., Amenta, F., Avola, R. (2010) Biomarkers of glial cell proliferation and differentiation in culture. *Front. Biosci. (Schol Ed)*. 2, 558-570.
- Brooks-Kayal, A.R., Munir, M., Jin, H., Robinson, M.B. (1998) The glutamate transporter, GLT-1, is expressed in cultured hippocampal neurons. *Neurochem. Int.* 33, 95-100.
- Bruel-Jungerman, E., Davis, S., Laroche, S. (2007b) Brain plasticity mechanisms and memory: a party of four. *Neuroscientist*. 13 (5), 492-505.
- Bruel-Jungerman, E., Rampon, C., Laroche, S. (2007a) Adult hippocampal neurogenesis, synaptic plasticity and memory: facts and hypotheses. *Rev. Neurosci*. 18 (2), 93-114.
- Buckton, G., Zibrowski, E.M., Vanderwolf, C.H. (2001) Effects of cyclazocine and scopolamine on swim-to-platform performance in rats. *Brain Res*. 922 (2), 229-233.
- Buhot, M.C., Martin, S., Segu, L. (2000) Role of serotonin in memory impairment. *Ann. Med.* 32 (3), 210-221.

- Bunce, J.G., Sabolek, H.R., Chrobak, J.J. (2004) Intraseptal infusion of the cholinergic agonist carbachol impairs delayed-non-match-to-sample radial arm maze performance in the rat. *Hippocampus*. 14, 450–459.
- Cameron, H.A., McKay, R.D. (2001) Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus. *J. Comp. Neurol.* 435 (4), 406-417.
- Can, Ö.D., Öztürk, Y., Özkay Ü.D. (2011) Effects of insulin and St. John's Wort treatments on anxiety, locomotory activity, depression, and active learning parameters of streptozotocin-diabetic rats. *Planta Med.* 77 (18), 1970-1976.
- Castellucci, V., Pinsker, H., Kupfermann, I., Kandel, E.R. (1970) Neuronal mechanisms of habituation and dishabituation of the gill-withdrawal reflex in *Aplysia*. *Science*. 167, 1745–1748.
- Castellucci, V.F., Kandel, E.R. (1974) A quantal analysis of the synaptic depression underlying habituation of the gill-withdrawal reflex in *Aplysia*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 71 (12), 5004–5008.
- Castellucci, V.F., Kandel, E.R. (1976) Presynaptic facilitation as a mechanism for behavioral sensitization in *Aplysia*. *Science*. 194, 1176–1178.
- Chapouthier, G., Venault, P. (2002) GABA-A receptor complex and memory processes. *Curr. Top. Med. Chem.* 2 (8), 841-851.
- Charpier, S., Deniau, J.M. (1997) In vivo activity-dependent plasticity at cortico-striatal connections: evidence for physiological long-term potentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 94 (13), 7036-7040.
- Chaudhuri, R., Fiete, I. (2016) Computational principles of memory. *Nat. Neurosci.* 19 (3), 394-403.
- Chen, Y.C., Chen, Q.S., Lei, J.L., Wang, S.L. (1998) Physical training modifies the age-related decrease of GAP-43 and synaptophysin in the hippocampal formation in C57BL/6J mouse. *Brain Res.* 806 (2), 238-245.
- Chever, O., Lee, C.Y., Rouach, N. (2014) Astroglial Connexin43 hemichannels tune basal excitatory synaptic transmission. *J. Neurosci.* 34 (34), 11228-11232.
- Choi, J.G., Yang, W.M., Kang, T.H., Oh, M.S. (2011) Effects of optimized-SopungSunkiwon on memory impairment and enhancement. *Neurosci. Lett.* 491 (2), 93-98.

- Chopin, P., Stenger, A., Couzinier, J.P., Briley, M. (1985) Indirect dopaminergic effects of tofisopam, a 2,3-benzodiazepine, and their inhibition by lithium. *J. Pharm. Pharmacol.* 37 (12), 917-919.
- Clark, R.E., Squire, L.R. (1998) Classical conditioning and brain systems: the role of awareness. *Science.* 280 (5360), 77-81.
- Conner, J.M., Franks, K.M., Titterness, A.K., Russell, K., Merrill, D.A., Christie, B.R., Sejnowski, T.J., Tuszynski, M.H. (2009) NGF is essential for hippocampal plasticity and learning. *J. Neurosci.* 29 (35), 10883-10889.
- Cooke, S.F., Bliss, T.V. (2006) Plasticity in the human central nervous system. *Brain.* 129 (Pt 7), 1659-1673.
- Costa, J.C., Costa, K.M., do Nascimento, J.L. (2010) Scopolamine- and diazepam-induced amnesia are blocked by systemic and intraseptal administration of substance P and choline chloride. *Peptides.* 31 (9), 1756-1760.
- Dawson, T.M., Dawson W.L. (1995) Nitric Oxide: Actions and Pathological Roles. *Neuroscientist.* 1, 7-18.
- Dayer, A.G., Ford, A.A., Cleaver, K.M., Yassaee, M., Cameron, H.A. (2003). Short-term and long-term survival of new neurons in the rat dentate gyrus. *J. Comp. Neurol.* 460 (4), 563–572.
- De Koninck, P., Schulman H. (1998) Sensitivity of CaM kinase II to the frequency of Ca<sup>2+</sup> oscillations. *Science.* 279 (5348), 227-230.
- Decker, M.W., Majchrzak, M.J., Arneric, S.P. (1993) Effects of lobeline, a nicotinic receptor agonist, on learning and memory. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 45, 571–576.
- Deiana, S., Harrington, C.R., Wischik, C.M., Riedel, G. (2009) Methylthionium chloride reverses cognitive deficits induced by scopolamine: comparison with rivastigmine. *Psychopharmacology (Berl).* 202 (1-3) 53–65.
- Deng, W., Aimone, J.B., Gage, F.H. (2010) New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? *Nat. Rev. Neurosci.* 11 (5), 339–350.
- Dennes, R.P., Barnes, J.C. (1993) Attenuation of scopolamine-induced spatial memory deficits in the rat by cholinomimetic and non-cholinomimetic drugs using a novel task in the 12-arm radial maze. *Psychopharmacology (Berl).* 111 (4), 435–441.

- Deutsch, J.A. (1971) The cholinergic synapse and the site of memory. *Science*. 174 (4011), 788-794.
- Domek-Łopacińska, K., Strosznajder, J.B. (2008) The effect of selective inhibition of cyclic GMP hydrolyzing phosphodiesterases 2 and 5 on learning and memory processes and nitric oxide synthase activity in brain during aging. *Brain Res*. 1216, 68-77.
- Doyon, J., Gaudreau, D., Laforce, R. Jr., Castonguay, M., Bédard, P.J., Bédard, F., Bouchard, J.P. (1997) Role of the striatum, cerebellum, and frontal lobes in the learning of a visuomotor sequence. *Brain Cogn*. 34 (2), 218-245.
- Drachman, D.A., Leavitt, J. (1974) Human memory and the cholinergic system: a relationship to aging? *Arch. Neurol*. 30 (2), 113-121.
- Drozdov, O.L., Chorna, V.I. (2003) Changes in the content of glial fibrillary acidic protein in the frontal cortex of rats during conditioned active avoidance training. *Neurophysiol*. 35 (2), 98-101.
- Duerr, J.S., Quinn, W.G. (1982) Three *Drosophila* mutations that block associative learning also affect habituation and sensitization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 79 (11), 3646-3650.
- Duffy, S.N., Craddock, K.J., Abel, T., Nguyen, P.V. (2001) Environmental enrichment modifies the PKA-dependence of hippocampal LTP and improves hippocampus-dependent memory. *Learn. Mem*. 8 (1), 26-34.
- Dupret, D., Revest, J.M., Koehl, M., Ichas, F., De Giorgi, F., Costet, P., Abrous, D.N., Piazza, P.V. (2008) Spatial relational memory requires hippocampal adult neurogenesis. *PLoS One*. 3 (4), e1959.
- Ebert, U. Kirch, W. (1998) Scopolamine model of dementia: electroencephalogram findings and cognitive performance. *Eur. J. Clin. Invest*. 28 (11), 944-999.
- Edelmann, L., Hanson, P.I., Chapman, E.R., Jahn, R. (1995) Synaptobrevin binding to synaptophysin: a potential mechanism for controlling the exocytotic fusion machine. *EMBO J*. 14 (2), 224-231.
- Ernst, A., Frisén, J. (2015) Adult neurogenesis in humans- common and unique traits in mammals. *PLoS Biol*. 13 (1), e1002045.
- Ernst, A., Alkass, K., Bernard, S., Salehpour, M., Perl, S., Tisdale, J., Possnert, G., Druid, H., Frisén, J. (2014) Neurogenesis in the striatum of the adult human brain. *Cell*. 156 (5), 1072-1083.

- Eroglu, C., Barres, B.A. (2010) Regulation of synaptic connectivity by glia. *Nature*. 468, 223-231.
- Fan, Y., Hu, J., Li, J., Yang, Z., Xin, X., Wang, J., Ding, J., Geng, M. (2005) Effect of acidic oligosaccharide sugar chain on scopolamine-induced memory impairment in rats and its related mechanisms. *Neurosci Lett*. 374 (3), 222-226.
- Fekete, M.I., Horváth, K., Kedves, R., Máté, I., Székely, J.I., Szentkúti, E. (1997) Selective interaction of homophthalazine derivatives with morphine. *Eur. J. Pharmacol*. 331 (2-3), 175-183.
- Fields, R.D., Araque, A., Johansen-Berg, H., Lim, S.S., Lynch, G., Nave, K.A., Nedergaard M., Perez, R., Sejnowski, T., Wake, H. (2014) Glial biology in learning and cognition. *Neuroscientist*. 20 (5), 426-431.
- Fletcher, T.L., Cameron, P., De Camilli, P., Banker, G. (1991) The distribution of synapsin I and synaptophysin in hippocampal neurons developing in culture. *J. Neurosci*. 11 (6), 1617-1626.
- Foerde, K., Shohamy, D. (2011) The role of the basal ganglia in learning and memory: insight from Parkinson's disease. *Neurobiol. Learn. Mem*. 96 (4), 624-636.
- Foley, A.G., Murphy, K.J., Hirst, W.D., Gallagher, H.C., Hagan, J.J., Upton, N., Walsh, F.S., Regan, C.M. (2004) The 5-HT(6) receptor antagonist SB-271046 reverses scopolamine- disrupted consolidation of a passive avoidance task and ameliorates spatial task deficits in aged rats. *Neuropsychopharmacology*. 29, 93-100.
- Fontana, D.J., Daniels, S.E., Wong, E.H., Clark, R.D., Eglen, R.M. (1997) The effects of novel, selective 5-hydroxytryptamine (5-HT)<sub>4</sub> receptor ligands in rat spatial navigation. *Neuropharmacology*. 36 (4-5), 689-696.
- Fornari, R.V., Moreira, K.M., Oliveira, M.G. (2000) Effects of the selective M1 muscarinic receptor antagonist dicyclomine on emotional memory. *Learn. Mem*. 7 (5), 287-292.
- Fox, K. (2002) Anatomical pathways and molecular mechanisms for plasticity in the barrel cortex. *Neuroscience*. 111 (4), 799-814.
- Frick, K.M., Fernandez, S.M. (2003) Enrichment enhances spatial memory and increases synaptophysin levels in aged female mice. *Neurobiol. Aging*. 24 (4), 615-626.
- Gacar, N., Mutlu, O., Utkan, T., Komsuoglu Celikyurt, I., Gocmez, S.S., Ulak, G. (2011) Beneficial effects of resveratrol on scopolamine but not mecamlamine induced

- memory impairment in the passive avoidance and Morris water maze tests in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 99 (3), 316-323.
- García-Barroso, C., Ugarte, A., Martínez, M., Rico, A.J., Lanciego, J.L., Franco, R., Oyarzabal, J., Cuadrado-Tejedor, M., García-Osta, A. (2014) Phosphodiesterase inhibition in cognitive decline. *J. Alzheimers. Dis.* 42 (Suppl 4), S561-S573
- Gazzaniga, M.S., Ivry, R. B., Mangun, G.R. (2014) Memory. M.S. Gazzaniga, R.B. Ivry and G.R. Mangun (Editörler.), *Cognitive Neuroscience The Biology of The Mind* içinde (s. 378-473). New York: W.W. Norton & Company, Inc.
- Genoud, C., Quairiaux, C., Steiner, P., Hirling, H., Welker, E., Knott, G.W. (2006) Plasticity of astrocytic coverage and glutamate transporter expression in adult mouse cortex. *PLoS Biol.* 4 (11), e343.
- Gerlai, R., Wojtowicz, J.M., Marks, A., Roder, J. (1995) Overexpression of a calcium-binding protein, S100 beta, in astrocytes alters synaptic plasticity and impairs spatial learning in transgenic mice. *Learn. Mem.* 2 (1), 26-39.
- Ghumatkar, P.J., Patil, S.P., Jain, P.D., Tambe, R.M., Sathaye, S. (2015) Nootropic, neuroprotective and neurotrophic effects of phloretin in scopolamine induced amnesia in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 135, 182-191.
- Goel, V., Makale, M., Grafman, J. (2004) The hippocampal system mediates logical reasoning about familiar spatial environments. *J. Cogn. Neurosci.* 16 (4), 654-664.
- Gold, P.E. (2003) Acetylcholine modulation of neural systems involved in learning and memory. *Neurobiol. Learn. Mem.* 80 (3), 194-210.
- Gould, E., Beylin, A., Tanapat, P., Reeves, A., Shors, T.J. (1999) Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation. *Nat. Neurosci.* 2 (3), 260-265.
- Graybiel, A.M. (1995) Building action repertoires: memory and learning functions of the basal ganglia. *Curr. Opin. Neurobiol.* 5 (6), 733-741.
- Grover, L.M., Teyler, T.J. (1990) Two components of long-term potentiation induced by different patterns of afferent activation. *Nature.* 347 (6292), 477-479.
- Grünblatt, E., Salkovic-Petrisic, M., Osmanovic, J., Riederer, P., Hoyer, S. (2007) Brain insulin system dysfunction in streptozotocin intracerebroventricularly treated rats generates hyperphosphorylated tau protein. *J. Neurochem.* 101 (3), 757-770.
- Guan, J., Zhang R, Dale-Gandar L, Hodgkinson S, Vickers M.H. (2010) NNZ-2591, a novel diketopiperazine, prevented scopolamine-induced acute memory impairment in the adult rat. *Behav Brain Res.* 210 (2), 221-228.

- Haider, S., Khaliq, S., Ahmed, S.P., Haleem, D.J. (2006) Long-term tryptophan administration enhances cognitive performance and increases 5HT metabolism in the hippocampus of female rats. *Amino Acids*. 31 (4), 421-425.
- Hajjar, T., Goh, Y.M., Rajion, M.A., Vidyadaran, S., Li, T.A., Ebrahimi, M. (2013) Alterations in neuronal morphology and synaptophysin expression in the rat brain as a result of changes in dietary n-6: n-3 fatty acid ratios. *Lipids Health Dis*. 12, 113.
- Haley, J.E., Wilcox, G.L., Chapman, P.F. (1992) The role of nitric oxide in hippocampal long-term potentiation. *Neuron*. 8 (2), 211-216.
- Hall, J.E. (2011) Guyton ve Hall tıbbi fizyoloji (12. basım)(Çev: Ö. Yılmaz). İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri.
- Hamed, A., Skórzewska, A., Lehner, M., Płaźnik, A. (2007) Tofizopam. W poszukiwaniu mechanizmów działania 2,3-benzodiazepin. *Farmakoter. Psychiat. Neurol*. 2, 109-117.
- Han, X., Chen, M., Wang, F., Windrem, M., Wang, S., Shanz, S., Xu, Q., Oberheim, N.A., Bekar, L., Betstadt, S., Silva, A.J., Takano, T., Goldman, S.A., Nedergaard, M. (2013) Forebrain engraftment by human glial progenitor cells enhances synaptic plasticity and learning in adult mice. *Cell Stem Cell*. 12 (3), 342–353.
- Hasselmo, M.E. (2006) The role of acetylcholine in learning and memory. *Curr Opin Neurobiol*. 16 (6), 710-715.
- Heckman, P.R., Blokland, A., Ramaekers, J., Prickaerts, J. (2015) PDE and cognitive processing: beyond the memory domain. *Neurobiol. Learn Mem*. 119, 108-122.
- Heindel, W.C., Salmon, D.P., Shults, C.W., Walicke, P.A., Butters, N. (1989) Neuropsychological evidence for multiple implicit memory systems: a comparison of Alzheimer's, Huntington's, and Parkinson's disease patients. *J. Neurosci*. 9 (2), 582-587.
- Hellweg, R., Jockers-Scherübl, M. (1994) Neurotrophic factors in memory disorders. *Life Sci*. 55 (25-26), 2165-2169.
- Hertz, L., Gibbs, M.E. (2009) What learning in day-old chickens can teach a neurochemist: focus on astrocyte metabolism. *J. Neurochem*. 109 (Suppl 1), 10-16.
- Hirano, T. (2013) Long-term depression and other synaptic plasticity in the cerebellum. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B. Phys. Biol. Sci*. 89 (5), 183-195.

- Hirshmana, E., Fishera, J., Henthorn, T., Arndt, J., Passannante A. (2002) Midazolam amnesia and dual-process models of the word-frequency mirror effect. *J. Mem. Lang.* 47 (4), 499-516.
- Horváth, E.J., Horváth, K., Hámori, T., Fekete, M.I., Sólyom, S., Palkovits, M. (2000) Anxiolytic 2,3-benzodiazepines, their specific binding to the basal ganglia. *Prog. Neurobiol.* 60 (4), 309-342.
- Horváth, E.J., Salamon, C., Bakonyi, A., Fekete, M.I., Palkovits, M. (1999) [(3)H]-girisopam, a novel selective benzodiazepine for the 2, 3-benzodiazepine binding site. *Brain Res. Brain Res. Protoc.* 4 (2), 230-235
- Houades, V., Koulakoff, A., Ezan, P., Seif, I., Giaume, C. (2008) Gap junction-mediated astrocytic networks in the mouse barrel cortex. *J. Neurosci.* 28, 5207-5217.
- Hovi-Viander, M., Kanto, J., Scheinin, H., Scheinin, M. (1985) Tofisopam and midazolam: differences in clinical effects and in changes of CSF monoamine metabolites. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 20 (5), 492-496.
- Hsieh, M.T., Hsieh, C.L., Lin, L.W., Wu, C.R., Huang, G.S. (2003) Differential gene expression of scopolamine-treated rat hippocampus-application of cDNA microarray technology. *Life Sci.* 73 (8), 1007-1016.
- Inamura, K., Tsuno, N., Shinagawa, S., Nagata, T., Tagai, K., Nakayama, K. (2015) Correlation between cognition and symptomatic severity in patients with late-life somatoform disorders. *Aging Ment. Health.* 19 (2), 169-174.
- Ito, M. (2000) Mechanisms of motor learning in the cerebellum. *Brain Res.* 886 (1-2), 237-245.
- Ito, M., Sakurai, M., Tongroach P. (1982) Climbing fibre induced depression of both mossy fibre responsiveness and glutamate sensitivity of cerebellar Purkinje cells. *J. Physiol.* 324, 113-134.
- Izquierdo, I. Medina, J.H. Vianna, M.R. Izquierdo, L.A., Barros, D.M. (1999). Separate mechanisms for short- and long-term memory. *Behav. Brain Res.* 103 (1), 1-11.
- Jahanshahi, M., Azami, N. S., Azami, N. S. (2012a) Effect of scopolamine-based amnesia on the number of astrocytes in the rat's hippocampus. *Int. J. Morphol.* 30 (2), 388-393.
- Jahanshahi, M., Nickmahzar, E.G., Babakordi, F. (2013) Effect of Gingko biloba extract on scopolamine-induced apoptosis in the hippocampus of rats. *Anat. Sci. Int.* 88 (4), 217-222.



- Jahanshahi, M., Nikmahzar, E., Yadollahi, N., Ramazani, K. (2012b) Protective effects of Ginkgo biloba extract (EGB 761) on astrocytes of rat hippocampus after exposure with scopolamine. *Anat. Cell. Biol.* 45 (2), 92-96.
- Jarrard, L.E. (1993) On the role of the hippocampus in learning and memory in the rat. *Behav. Neural Biol.* 60, 9-26.
- Jay, T.M. (2003) Dopamine: a potential substrate for synaptic plasticity and memory mechanisms. *Prog. Neurobiol.* 69 (6), 375-390.
- Jones, C.K., Shannon, H.E. (2000) Muscarinic cholinergic modulation of prepulse inhibition of the acoustic startle reflex. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 294, 1017–1023.
- Kalashnikov, S.V., Kalashnikova, E.A., Kokarovtseva, S.N. (2002) Immunomodulating effects of tofizopam (Grandaxin) and diazepam in vitro. *Mediators Inflamm.* 11 (1), 53-59.
- Kalueff, A., Nutt, D.J. (1996) Role of GABA in memory and anxiety. *Depress. Anxiety.* 4 (3), 100-110.
- Kandel, E.R. (2012) The molecular biology of memory: cAMP, PKA, CRE, CREB-1, CREB-2, and CPEB. *Mol. Brain.* 5 (14), 1-12.
- Kanes, S.J., Tokarczyk, J., Siegel, S.J., Bilker, W., Abel, T., Kelly, M.P. (2007) Rolipram: a specific phosphodiesterase 4 inhibitor with potential antipsychotic activity. *Neuroscience.* 144 (1), 239-246.
- Kaptan, Z., Üzümlü, G. (2016) Erişkin hipokampal nörogenezin öğrenme ve hafıza fonksiyonlarındaki rolü. *Turk. J. Neurol.* 22 (4), 149-155.
- Kempermann, G., Song, H., Gage, F.H. (2015) Neurogenesis in the Adult Hippocampus. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 7 (9), a018812.
- Kim, J.S., Jung, J., Lee, H.J., Kim, J.C., Wang, H., Kim, S.H., Shin, T., Moon, C. (2009) Differences in immunoreactivities of Ki-67 and doublecortin in the adult hippocampus in three strains of mice. *Acta Histochem.* 111 (2), 150-156.
- Kim, Y.H., Park, J.H. (2017) Vanillin and 4-hydroxybenzyl alcohol attenuate cognitive impairment and the reduction of cell proliferation and neuroblast differentiation in the dentate gyrus in a mouse model of scopolamine-induced amnesia. *Anat. Cell Biol.* 50 (2), 143-151.

- Kirkwood, A., Dudek, S.M., Gold, J.T., Aizenman, C.D., Bear, M.F. (1993) Common forms of synaptic plasticity in the hippocampus and neocortex in vitro. *Science*. 260 (5113), 1518-1521.
- Kirsch, I., Lynn, S.J., Vigorito, M., Miller, R.R. (2004) The role of cognition in classical and operant conditioning. *J. Clin. Psychol.* 60 (4), 369-392.
- Klebovich, I., Abermann, M. (1993) Pharmacokinetics and metabolism of tofizopam (Grandaxin) *Acta Pharm. Hung.* 63 (2), 83-90.
- Klempin, F., Kempermann, G. (2007) Adult hippocampal neurogenesis and aging. *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* 257 (5), 271-280.
- Knowles, W.D. (1992) Normal anatomy and neurophysiology of the hippocampal formation. *J. Clin. Neurophysiol.* 9 (2), 252-263.
- Kobayashi, K., Yasoshima, Y. (2001) The central noradrenaline system and memory consolidation. *Neuroscientist.* 7 (5), 371-376.
- Konar, A., Gautam, A., Thakur, M.K. (2015) Bacopa monniera (CDRI-08) upregulates the expression of neuronal and glial plasticity markers in the brain of scopolamine induced amnesic mice. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2015, 837012.
- Konar, A., Shah, N., Singh, R., Saxena, N., Kaul, S.C., Wadhwa, R., Thakur, M.K. (2011) Protective role of Ashwagandha leaf extract and its component withanone on scopolamine-induced changes in the brain and brain-derived cells. *PLoS One.* 6 (11), e27265.
- Kotan, Z., Sarandöl, A., Eker, S.S., Akkaya, C. (2009) Depresyon, Nöroplastisite ve Nörotrofik Faktörler. *Psikiyatride güncel yaklaşımlar.* 1 (1), 22-35
- Kraus, C.A., Seignourel, P., Balasubramanyam, V., Snow, A.L., Wilson, N.L., Kunik, M.E., Schulz, P.E., Stanley, M.A. (2008) Cognitive-behavioral treatment for anxiety in patients with dementia: two case studies. *J. Psychiatr. Pract.* 14 (3), 186-192.
- Kroker, K.S., Rast, G., Giovannini, R., Marti, A., Dorner-Ciossek, C., Rosenbrock, H. (2012) Inhibition of acetylcholinesterase and phosphodiesterase-9A has differential effects on hippocampal early and late LTP. *Neuropharmacology.* 62 (5-6), 1964-1974.
- Kumar, A. (2011) Long-term potentiation at CA3-CA1 hippocampal synapses with special emphasis on aging, disease, and stress. *Front. Aging Neurosci.* 3 (7), 1-20.

- Kurosinski, P., Gotz, J. (2002) Glial cells under physiologic and pathologic conditions. *Arch. Neurol.* 59, 1524-1528.
- Kwon, S.H., Lee, H.K., Kim, J.A., Hong, S.I., Kim, H.C., Jo, T.H., Park, Y.I., Lee, C.K., Kim, Y.B., Lee, S.Y., Jang, C.G. (2010) Neuroprotective effects of chlorogenic acid on scopolamine-induced amnesia via anti-acetylcholinesterase and anti-oxidative activities in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 649 (1-3), 210-217.
- Lambert, T.J., Fernandez, S.M., Frick, K.M. (2005) Different types of environmental enrichment have discrepant effects on spatial memory and synaptophysin levels in female mice. *Neurobiol. Learn. Mem.* 83 (3), 206-216.
- Lee, J.S., Kim, H.G., Lee, H.W., Han, J.M., Lee, S.K., Kim, D.W., Saravanakumar, A., Son, C.G. (2015) Hippocampal memory enhancing activity of pine needle extract against scopolamine-induced amnesia in a mouse model. *Sci. Rep.* 5, 9651.
- Lee, H.S., Ghetti, A., Pinto-Duarte, A., Wang, X., Dziewczapolski, G., Galimi, F., Huitron-Resendiz, S., Pina-Crespo, J.C., Roberts, A.J., Verma, I.M., Sejnowski, T.J., Heinemann, S.F. (2014) Astrocytes contribute to gamma oscillations and recognition memory. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 111 (32), E3343–E3352.
- Leventer, S.M., Raudibaugh, K., Frissora, C.L., Kassem, N., Keogh, J.C., Phillips, J., Mangel, A.W. (2008) Clinical trial: dextofisopam in the treatment of patients with diarrhoea-predominant or alternating irritable bowel syndrome. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 27 (2), 197-206.
- Levkovitz, Y., Ophir-Shaham, O., Bloch, Y., Treves, I., Fennig, S., Grauer, E. (2003) Effect of l-tryptophan on memory in patients with schizophrenia. *J. Nerv. Ment. Dis.* 191 (9), 568-573.
- Levin, E.D. (1992) Nicotinic systems and cognitive function. *Psychopharmacology (Berl.)*. 108 (4), 417-431.
- Levin, E.D. (1996) Nicotinic agonist and antagonist effects on memory. *Drug Dev. Res.* 38 (3-4), 188-195.
- Levin, E.D., Buccafusco, J.J. (2006). Introduction. E.D. Levin, J.J. Buccafusco (Eds.), *Animal models of cognitive impairment içinde* (s. 1-2). London: Taylor & Francis.
- Lim, S., Moon, M., Oh, H., Kim, H.G., Kim, S.Y., Oh, M.S. (2014) Ginger improves cognitive function via NGF-induced ERK/CREB activation in the hippocampus of the mouse. *J. Nutr. Biochem.* 25 (10), 1058-1065.

- Lisman, J. (1994) The CaM kinase II hypothesis for the storage of synaptic memory. *Trends Neurosci.* 17 (10), 406-412.
- Liu, H.X., Zhang, J.J., Zheng, P., Zhang, Y. (2005) Altered expression of MAP-2, GAP-43, and synaptophysin in the hippocampus of rats with chronic cerebral hypoperfusion correlates with cognitive impairment. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 139 (1), 169-177.
- Lynch, M.A. (2004) Long-term potentiation and memory. *Physiol. Rev.* 84 (1), 87-136.
- Madison D.V., Malenka, R.C., Nicoll, R.A. (1991) Mechanisms underlying long-term potentiation of synaptic transmission. *Annu. Rev. Neurosci.* 14, 379-397.
- Malenka R.C., Bear, M.F. (2004) LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron.* 44 (1), 5-21.
- Malenka, R.C. (2003) Synaptic plasticity and AMPA receptor trafficking. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1003, 1-11.
- Malenka, R.C., Nicoll, R.A. (1999) Long-term potentiation--a decade of progress? *Science.* 285 (5435), 1870-1874.
- Malleret, G., Alarcon, J.M., Martel, G., Takizawa, S., Vronskaya, S., Yin, D., Chen, I.Z., Kandel, E.R., Shumyatsky, G.P. (2010) Bidirectional regulation of hippocampal long-term synaptic plasticity and its influence on opposing forms of memory. *J. Neurosci.* 30 (10), 3813-3825.
- Massey, P.V., Bashir, Z.I. (2007) Long-term depression: multiple forms and implications for brain function. *Trends Neurosci.* 30 (4), 176-184.
- Martin, S.J., Grimwood, P.D., Morris, R.G. (2000) Synaptic plasticity and memory: an evaluation of the hypothesis. *Annu. Rev. Neurosci.* 23, 649-711.
- Mayford, M., Siegelbaum, S.A., Kandel, E.R. (2012) Synapses and Memory Storage. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 4 (6), a005751.
- McEntee, W.J., Crook, T.H. (1993) Glutamate: its role in learning, memory, and the aging brain. *Psychopharmacology (Berl).* 111 (4), 391-401.
- McGaugh, J.L. (2004) The amygdala modulates the consolidation of memories of emotionally arousing experiences. *Annu. Rev. Neurosci.* 27, 1-28.
- McKay, S.E., Purcell, A.L., Carew, T.J. (1999) Regulation of synaptic function by neurotrophic factors in vertebrates and invertebrates: implications for development and learning. *Learn. Mem.* 6 (3), 193-215.

- Meakin, S.O., Shooter, E.M. (1992) The nerve growth factor family of receptors. *Trends Neurosci.* 15 (9), 323-331.
- Melo, J.B., Agostinho, P., Oliveira C.R. (2003) Involvement of oxidative stress in the enhancement of acetylcholinesterase activity induced by amyloid beta-peptide. *Neurosci. Res.* 45 (1), 117-127.
- Meneses, A., Liy-Salmeron, G. (2012) Serotonin and emotion, learning and memory. *Rev. Neurosci.* 23 (5-6), 543-553.
- Middeldorp, J., Hol, E.M. (2011) GFAP in health and disease. *Prog. Neurobiol.* 93 (3), 421-443.
- Mitre, M., Mariga, A., Chao, M.V. (2017) Neurotrophin signalling: novel insights into mechanisms and pathophysiology. *Clin. Sci. (Lond).* 131 (1), 13-23.
- Moon, M., Jeong, H.U., Choi, J.G., Jeon, S.G., Song, E.J., Hong, S.P., Oh, M.S. (2016) Memory-enhancing effects of *Cuscuta japonica* Choisy via enhancement of adult hippocampal neurogenesis in mice. *Behav. Brain Res.* 311, 173-182.
- Moore, C.I., Cao, R. (2008) The hemo-neural hypothesis: on the role of blood flow in information processing. *J. Neurophysiol.* 99 (5), 2035-2047.
- Moscovitch, M., Rosenbaum, R.S., Gilboa, A., Addis, D.R., Westmacott, R., Grady, C., McAndrews, M.P., Levine, B., Black, S., Winocur, G., Nadel, L. (2005). Functional neuroanatomy of remote episodic, semantic and spatial memory: a unified account based on multiple trace theory. *J. Anat.* 207 (1), 35-66.
- Mu, J.S., Li, W.P., Yao, Z.B., Zhou, X.F. (1999) Deprivation of endogenous brain-derived neurotrophic factor results in impairment of spatial learning and memory in adult rats. *Brain Res.* 835 (2), 259-265.
- Muir, J.L. (1997) Acetylcholine, aging, and Alzheimer's disease. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 56 (4), 687-696.
- Nabeshima, T., Tohyama, K., Kameyama, T. (1990) Effects of DM-9384, a pyrrolidone derivative, on alcohol- and chlordiazepoxide-induced amnesia in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 36 (2), 233-236.
- Nakagawa, S., Kim, J.E., Lee, R., Malberg, J.E., Chen, J., Steffen, C., Zhang, Y.J., Nestler, E.J., Duman, R.S. (2002) Regulation of neurogenesis in adult mouse hippocampus by cAMP and the cAMP response element-binding protein. *J. Neurosci.* 22 (9), 3673-3682.

- Navarrete, M., Perea, G., Fernandez de Sevilla, D., Gómez-Gonzalo, M., Núñez, A., Martín, E.D., Araque, A. (2012) Astrocytes mediate in vivo cholinergic-induced synaptic plasticity. *PLoS Biol.* 10 (2), e1001259.
- Neves, G., Cooke, S.F., Bliss, T.V. (2008) Synaptic plasticity, memory and the hippocampus: A neural network approach to causality. *Nature Rev. Neurosci.* 9 (1), 65-75.
- Nicholls, R.E., Alarcon, J.M., Malleret, G., Carroll, R.C., Grody, M., Vronskaya, S., Kandel, E.R. (2008) Transgenic mice lacking NMDAR-dependent LTD exhibit deficits in behavioral flexibility. *Neuron.* 58 (1), 104-117.
- Nielsen, E.B., Kehler, J., Nielsen, J., Brøsen, P. (2007) Patent: use of tofisopam as a PDE10A inhibitor. WO 2007/082546 A1.
- Nilsson, M., Perfilieva, E., Johansson, U., Orwar, O., Eriksson, P.S. (1999) Enriched environment increases neurogenesis in the adult rat dentate gyrus and improves spatial memory. *J. Neurobiol.* 39 (4), 569-578.
- Nilsson, O.G., Gage, F.H. (1993) Anticholinergic sensitivity in the aging rat septohippocampal system as assessed in a spatial memory task. *Neurobiol. Aging.* 14 (5), 487-497.
- Nishiyama, H., Knöpfel, T., Endo, S., Itohara, S. (2002) Glial protein S100B modulates long-term neuronal synaptic plasticity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 99, 4037-4042.
- Nishizuka, Y. (1992) Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science.* 258 (5082), 607-614.
- Nithianantharajah, J., Levis, H., Murphy, M. (2004) Environmental enrichment results in cortical and subcortical changes in levels of synaptophysin and PSD-95 proteins. *Neurobiol. Learn. Mem.* 81 (3), 200-210.
- Oberheim, N.A., Takano, T., Han, X., He, W., Lin, J.H.C., Wang, F., Xu, Q., Wyatt, J.D., Pilcher, W., Ojemann, J.G., Ransom, B.R., Goldman, S.A., Nedergaard, M. (2009) Uniquely hominid features of adult human astrocytes. *J. Neurosci.* 29 (10), 3276-3287.
- Ogren, S.O., Eriksson, T.M., Elvander-Tottie, E., D'Addario, C., Ekström, J.C., Svenningsson, P., Meister, B., Kehr, J., Stiedl, O. (2008) The role of 5-HT(1A) receptors in learning and memory. *Behav. Brain. Res.* 195 (1), 54-77.
- Okano, H., Hirano, T., Balaban, E. (2000) Learning and memory. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 97 (23), 12403-12404.

- Ormerod, B.K., Beninger, R.J. (2002) Water maze versus radial maze: differential performance of rats in a spatial delayed match-to-position task and response to scopolamine. *Behav. Brain Res.* 128 (2), 139-152.
- Ozawa, M., Nakada, Y., Sugimachi, K., Yabuuchi, F., Akai, T., Mizuta, E., Kuno, S., Yamaguchi, M. (1994) Pharmacological characterization of the novel anxiolytic  $\beta$ -carboline abecarnil in rodents and primates. *Jpn. J. Pharmacol.* 64 (3), 179-187.
- Paul, V., Ekambaram, P. (2011) Involvement of nitric oxide in learning & memory processes. *Indian J. Med. Res.* 133 (5), 471-478.
- Paxinos, G., Watson C. (2007) Paxinos & Watson the rat brain in stereotaxic coordinates. (6<sup>th</sup> edition). China: Elsevier.
- Pellow, S., File S.E (1986) Is tofisopam an atypical anxiolytic? *Neurosci. Biobehav. Rev.* 10 (2), 221-227.
- Petőcz, L. (1993) [Pharmacologic effects of tofizopam (Grandaxin)]. *Acta Pharm. Hung.* 63 (2), 79-82.
- Plachez, C., Danbolt, N.C., Recasens, M. (2000) Transient expression of the glial glutamate transporters GLAST and GLT in hippocampal neurons in primary culture. *J. Neurosci. Res.* 59 (5), 587-593.
- Poldrack, R.A., Packard, M.G. (2003) Competition among multiple memory systems: converging evidence from animal and human brain studies. *Neuropsychologia.* 41 (3), 245-251.
- Porter, R.J., Lunn, R.S., O'Brien, J.T. (2003). Effects of acute tryptophan depletion on cognitive function in Alzheimer's disease and in the healthy elderly. *Psychol. Med.* 33 (1), 41-49.
- Potter, D.D., Pickles, C.D., Roberts, R.C., Rugg, M.D. (2000) Scopolamine impairs memory performance and reduces frontal but not parietal visual P3 amplitude. *Biol. Psychol.* 52 (1), 37-52.
- Prabhakar, S., Saraf, M.K., Pandhi, P., Anand, A. (2008) Bacopa monniera exerts anti-amnesic effect on diazepam-induced anterograde amnesia in mice. *Psychopharmacology (Berl).* 200 (1), 27-37.
- Prast, H., Philippu, A. (2001) Nitric oxide as modulator of neuronal function. *Prog. Neurobiol.* 64 (1), 51-68.
- Purves, D. (2008) Neuroscience (4th ed.). Sunderland, Mass: Sinauer. pp. 197–200.

- Quevedo, J., de-Paris, F., Vianna, M.R., Barichello, T., Roesler, R., Kapczinski, F. (2002) Interaction between midazolam-induced anterograde amnesia and memory enhancement by treatments given immediately after training on an inhibitory avoidance task in rats. *Behav. Pharmacol.* 13 (4), 319-322.
- Raghavendra, V., Kulkarni, S.K. (2001) Possible antioxidant mechanism in melatonin reversal of aging and chronic ethanol-induced amnesia in plus-maze and passive avoidance memory tasks. *Free Radic. Biol. Med.* 30 (6), 595-602.
- Redrobe, J.P., Jørgensen, M., Christoffersen, C.T., Montezinho, L.P., Bastlund, J.F., Carnerup, M., Bundgaard, C., Lerdrup, L., Plath, N. (2014) In vitro and in vivo characterisation of Lu AF64280, a novel, brain penetrant phosphodiesterase (PDE) 2A inhibitor: potential relevance to cognitive deficits in schizophrenia. *Psychopharmacology (Berl)*. 231 (16), 3151-3167.
- Rempel-Clower, N.L., Zola, S.M., Squire, L.R., Amaral, D.G. (1996) Three cases of enduring memory impairment after bilateral damage limited to the hippocampal formation. *J. Neurosci.* 16 (16), 5233-5255.
- Rezayof, A., Shirazi-Zand, Z., Zarrindast, M.R., Nayer-Nouri, T. (2010) Nicotine improves ethanol-induced memory impairment: the role of dorsal hippocampal NMDA receptors. *Life Sci.* 86 (7-8), 260-266.
- Rezvani, A.H. (2006) Involvement of the NMDA system in learning and memory. E.D. Levin, J.J. Buccafusco (Eds.), *Animal models of cognitive impairment içinde* (s. 37-48). London: Taylor & Francis.
- Riedel, G., Platt, B., Micheau, J. (2003) Glutamate receptor function in learning and memory. *Behav. Brain Res.* 140 (1-2), 1-47.
- Roegge C. S., Levin E.D. (2006) Nicotinic receptor antagonists in rats. E.D. Levin, J.J. Buccafusco (Eds.), *Animal models of cognitive impairment içinde* (s. 21-35). London: Taylor & Francis.
- Rogan, M.T., Stäubli, U.V., LeDoux, J.E. (1997) Fear conditioning induces associative long-term potentiation in the amygdala. *Nature.* 390 (6660), 604-607.
- Roldan, G., Bolanos-Badillo, E., Gonzalez-Sanchez, H., Quirarte, G.L., Prado-Alcala, R.A. (1997) Selective M1 muscarinic receptor antagonists disrupt memory consolidation of inhibitory avoidance in rats. *Neurosci. Lett.* 230 (2), 93-96.



- Rundfeldt, C., Socala, K., Wlaź, P. (2010) The atypical anxiolytic drug, tofisopam, selectively blocks phosphodiesterase isoenzymes and is active in the Mouse model of negative symptoms of psychosis. *J. Neural Transm. (Vienna)*. 117 (11), 1319-1325.
- Rutten, K., Basile, J.L., Prickaerts, J., Blokland, A., Vivian, J.A. (2008) Selective PDE inhibitors rolipram and sildenafil improve object retrieval performance in adult cynomolgus macaques. *Psychopharmacology (Berl)*. 196 (4), 643-648.
- Rx Media Pharma<sup>®</sup>, İnteraktif İlaç Bilgi Kaynağı, 2017.
- Saano, V. (1986) Tofizopam selectively increases the action of anticonvulsants. *Med. Biol.* 64 (4), 201-206.
- Sala, M., Braida, D., Calcaterra, P., Leone, M.P., Comotti, F.A., Gianola, S., Gori, E. (1991) Effect of centrally administered atropine and pirenzepine on radial arm maze performance in the rat. *Eur. J. Pharmacol.* 194 (1), 45-49.
- Salin, P.A., Malenka, R.C., Nicoll, R.A. (1996) Cyclic AMP mediates a presynaptic form of LTP at cerebellar parallel fiber synapses. *Neuron*. 16 (4), 797-803.
- Sarnthein, J., Petsche, H., Rappelsberger, P., Shaw G.L., von Stein, A. (1998) Synchronization between prefrontal and posterior association cortex during human working memory. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95 (12), 7092-7096.
- Savchenko, V.L., McKanna, J.A., Nikonenko, I.R., Skibo, G.G. (2000) Microglia and astrocytes in the adult rat brain: comparative immunocytochemical analysis demonstrates the efficacy of lipocortin 1 immunoreactivity. *Neuroscience*. 96 (1), 195-203.
- Savić, M. M., Milinković, M. M., Rallapalli, S., Clayton, T., Joksimović, S., Van Linn, M., Cook, J. M. (2009) The differential role of  $\alpha 1$ - and  $\alpha 5$ -containing GABAA receptors in mediating diazepam effects on spontaneous locomotor activity and water-maze learning and memory in rats. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 12 (9), 1179-1193.
- Schindowski, K., Belarbi, K., Buée, L. (2008) Neurotrophic factors in Alzheimer's disease: role of axonal transport. *Genes Brain Behav.* 7 (Suppl 1), 43-56.
- Schmitt, U., Tanimoto, N., Seeliger, M., Schaeffel, F., Leube, R.E. (2009) Detection of behavioral alterations and learning deficits in mice lacking synaptophysin. *Neuroscience*. 162 (2), 234-243.

- Scholzen, T., Gerdes, J. (2000) The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J. Cell Physiol.* 182 (3), 311-322.
- Schonewille, M., Gao, Z., Boele, H.J., Veloz, M.F., Amerika, W.E., Simek, A.A., De Jeu, M.T., Steinberg, J.P., Takamiya, K., Hoebeek, F.E., Linden, D.J., Huganir, R.L., De Zeeuw, C.I. (2011) Reevaluating the role of LTD in cerebellar motor learning. *Neuron.* 70 (1), 43-50.
- Schultz C., Engelhardt, M. (2014) Anatomy of the hippocampal formation. *Front. Neurol. Neurosci.* 34, 6-17.
- Scoville W.B., Milner B. (1957) Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.* 20 (1), 11-21.
- Seignourel, P.J., Kunik, M.E., Snow, L., Wilson, N., Stanley, M. (2008) Anxiety in dementia: a critical review. *Clin. Psychol. Rev.* 28 (7), 1071-1082.
- Seppälä, T., Palva, E., Mattila, M.J., Korttila, K., Shrotriya, R.C. (1980) Tofisopam, a novel 3,4-benzodiazepine: multiple-dose effects on psychomotor skills and memory. Comparison with diazepam and interactions with ethanol. *Psychopharmacology (Berl).* 69 (2), 209-218.
- Seri, B., Garcia-Verdugo, J.M., Collado-Morente, L., McEwen, B.S., Alvarez-Buylla, A. (2004) Cell types, lineage, and architecture of the germinal zone in the adult dentate gyrus. *J. Comp. Neurol.* 478 (4), 359–378.
- Sharma, B., Singh, N. (2011) Attenuation of vascular dementia by sodium butyrate in streptozotocin diabetic rats. *Psychopharmacology (Berl).* 215 (4), 677-687.
- Shi, Z., Chen, L., Li, S., Chen, S., Sun, X., Sun, L., Li, Y., Zeng, J., He, Y., Liu, X. (2013) Chronic scopolamine-injection-induced cognitive deficit on reward-directed instrumental learning in rat is associated with CREB signaling activity in the cerebral cortex and dorsal hippocampus. *Psychopharmacology (Berl).* 230 (2), 245-260.
- Shimazu, K., Zhao, M., Sakata, K., Akbarian, S., Bates, B., Jaenisch, R., Lu, B. (2006) NT-3 facilitates hippocampal plasticity and learning and memory by regulating neurogenesis. *Learn. Mem.* 13 (3), 307-315.
- Shors, T.J., Miesegaes, G., Beylin, A., Zhao, M., Rydel, T., Gould, E. (2001) Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories. *Nature.* 410 (6826), 372-376.

- Shors, T.J., Townsend, D.A., Zhao, M., Kozorovitskiy, Y., Gould, E. (2002) Neurogenesis may relate to some but not all types of hippocampal-dependent learning. *Hippocampus*. 12 (5), 578-584.
- Shu, S.Y., Wu, Y.M., Bao, X.M., Leonard, B. (2003) Interactions among memory-related centers in the brain. *J. Neurosci. Res.* 71 (5), 609-616.
- Singh, A., Naidu, P.S., Kulkarni, S.K. (2003) Reversal of aging and chronic ethanol-induced cognitive dysfunction by quercetin a bioflavonoid. *Free Radic. Res.* 37 (11), 1245-1252.
- Snyder, P.J., Bednar, M.M., Cromer, J.R., Maruff, P. (2005) Reversal of scopolamine-induced deficits with a single dose of donepezil, an acetylcholinesterase inhibitor. *Alzheimers Dement.* 1 (2), 126-135.
- Soderling, T.R., Derkach, V.A. (2000) Postsynaptic protein phosphorylation and LTP. *Trends Neurosci.* 23 (2), 75-80.
- Sofroniew, M.V. (2005) Reactive astrocytes in neural repair and protection. *Neuroscientist.* 11 (5), 400-407.
- Spalding, K.L., Bergmann, O., Alkass, K., Bernard, S., Salehpour, M., Huttner, H.B., Boström, E., Westerlund, I., Vial, C., Buchholz, B.A., Possnert, G., Mash, D.C., Druid, H., Frisén, J. (2013) Dynamics of hippocampal neurogenesis in adult humans. *Cell.* 153 (6), 1219-1227.
- Spangler, E.L., Rigby, P., Ingram, D.K. (1986) Scopolamine impairs learning performance of rats in a 14-unit T-maze. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 25, 673-679.
- Spolidório, P.C., Echeverry, M.B., Iyomasa, M., Guimarães, F.S., Del Bel, E.A. (2007) Anxiolytic effects induced by inhibition of the nitric oxide-cGMP pathway in the rat dorsal hippocampus. *Psychopharmacology (Berl).* 195 (2), 183-192.
- Squire, L., Darwin, B., Bloom, F., du Lac, S., Ghosh, A., Spitzer, N. (2008) *Fundamental neuroscience* (3rd edition). Canada: Elsevier.
- Squire, L.R. (1992) Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. *Psychol. Rev.* 99 (2), 195-231.
- Squire, L.R., Stark, C.E., Clark, R.E. (2004) The medial temporal lobe. *Annu. Rev. Neurosci.* 27, 279-306.
- Srivastava, S., Bhaita, M.S., Gupta, K., Rajdev K. (2014) Current update on evidence based literature of tofisopam. *Delhi Psychiatry Journal.* 17 (1), 154-159.

- Stanfield, B.B., Trice, J.E. (1988) Evidence that granule cells generated in the dentate gyrus of adult rats extend axonal projections. *Exp. Brain Res.* 72 (2), 399-406.
- Stefanacci, L., Buffalo, E.A., Schmolck, H., Squire, L.R. (2000) Profound amnesia following damage to the medial temporal lobe: a neuroanatomical and neuropsychological profile of patient E.P. *J. Neurosci.* 20 (18), 7024–7036.
- Stehberg, J., Moraga-Amaro, R., Salazar, C., Becerra, A., Echeverria, C., Orellana, J.A., Bultynck, G., Ponsaerts, R., Leybaert, L., Simon, F., Saez, J.C., Retamal, M.A. (2012) Release of gliotransmitters through astroglial connexin 43 hemichannels is necessary for fear memory consolidation in the basolateral amygdala. *FASEB J.* 26 (9), 3649-3657.
- Suh, E.C., Jung, Y.J., Kim, Y.A., Park, E.M., Lee, K.E. (2008) A beta 25-35 induces presynaptic changes in organotypic hippocampal slice cultures. *Neurotoxicology.* 29 (4), 691-699.
- Susswein, A.J., Katzoff, A., Miller, N., Hurwitz, I. (2004) Nitric oxide and memory. *Neuroscientist.* 10 (2), 153-162.
- Suzuki, A., Stern, S.A., Bozdagi, O., Huntley, G.W., Walker, R.H., Magistretti, P.J., Alberini, C.M. (2011) Astrocyte-neuron lactate transport is required for long-term memory formation. *Cell.* 144 (5), 810–823.
- Švob Štrac, D., Pivac, N., Mück-Šeler, D. (2016) The serotonergic system and cognitive function. *Transl. Neurosci.* 7 (1), 35-49.
- Sze, C.I., Troncoso, J.C., Kawas, C., Mouton, P., Price, D.L., Martin, L.J. (1997) Loss of the presynaptic vesicle protein synaptophysin in hippocampus correlates with cognitive decline in Alzheimer disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 56 (8), 933-944.
- Szegó, J., Somogyi, M., Papp, E. (1993) [Excerpts from the clinical-pharmacologic and clinical studies of Grandaxin®]. *Acta Pharm. Hung.* 63 (2), 91-98.
- Szénási, G., Hársing Jr, L.G. (2004) Pharmacology and prospective therapeutic usefulness of negative allosteric modulators of AMPA receptors, *Drug Discov. Today Ther. Strateg.* 1 (1), 69-76.
- Tang, Y., Mishkin, M., Aigner, T.G. (1997) Effects of muscarinic blockade in perirhinal cortex during visual recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 94 (23), 12667-12669.

- Terry, A.V. Jr. (2006) Muscarinic receptor antagonists in rats. E.D. Levin, J.J. Buccafusco (Eds.), *Animal models of cognitive impairment içinde* (s. 5-20). London: Taylor & Francis.
- Terry, A.V. Jr., Gattu, M., Buccafusco, J.J., Sowell, J.W., Kosh, J.W. (1999) Ranitidine analog, JWS-USC-75IX, enhances memory-related task performance in rats. *Drug Dev. Res.* 47 (2), 97-106.
- Toni, N., Laplagne, D.A., Zhao, C., Lombardi, G., Ribak, C.E., Gage, F.H., Schinder, A.F. (2008) Neurons born in the adult dentate gyrus form functional synapses with target cells. *Nat. Neurosci.* 11 (8), 901–907.
- Toni, N., Teng, E.M., Bushong, E.A., Aimone, J.B., Zhao, C., Consiglio, A., van Praag, H., Martone, M.E., Ellisman, M.H., Gage, F.H. (2007) Synapse formation on neurons born in the adult hippocampus. *Nat. Neurosci.* 10 (6), 727–734.
- Tranel, D., Damasio, A.R., Damasio, H., Brandt, J.P. (1994) Sensorimotor skill learning in amnesia: additional evidence for the neural basis of nondeclarative memory. *Learn. Mem.* 1 (3), 165-179.
- Tsumoto, T. (1990) Long-term potentiation and depression in the cerebral neocortex. *Jpn. J. Physiol.* 40 (5), 573-593.
- Tully, K., Bolshakov, V.Y. (2010) Emotional enhancement of memory: how norepinephrine enables synaptic plasticity. *Mol. Brain.* 3, 15.
- Vadodaria, K.C., Gage, F.H. (2014) SnapShot: adult hippocampal neurogenesis. *Cell.* 156 (5), 1114-1114.e1.
- van Praag, H., Schinder, A.F., Christie, B.R., Toni, N., Palmer, T.D., Gage, F.H. (2002) Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature.* 415 (6875), 1030-1034.
- van Stegeren, A.H. (2008) The role of the noradrenergic system in emotional memory. *Acta Psychol. (Amst).* 127 (3), 532-541.
- Vivar, C., Potter, M.C., Choi, J., Lee, J., Stringer, T.P., Callaway, E.M., Gage, F.H., Suh, H., van Praag, H. (2012) Monosynaptic inputs to new neurons in the dentate gyrus. *Nat. Commun.* 3 (1038), 1107.
- von Bohlen und Halbach, O. (2011) Immunohistological markers for proliferative events, gliogenesis, and neurogenesis within the adult hippocampus. *Cell Tissue Res.* 345 (1), 1-19.

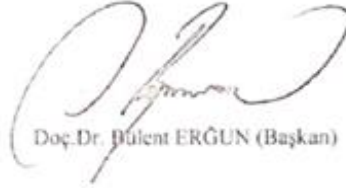
- Wallenstein, G.V., Vago, D.R. (2001) Intrahippocampal scopolamine impairs both acquisition and consolidation of contextual fear conditioning. *Neurobiol. Learn. Mem.* 75 (3), 245-252.
- Wiskott, L., Rasch, M.J., Kempermann, G. (2006) A functional hypothesis for adult hippocampal neurogenesis: avoidance of catastrophic interference in the dentate gyrus. *Hippocampus.* 16 (3), 329-343.
- Wojtowicz, J.M. (2012) Adult neurogenesis. From circuits to models. *Behav. Brain Res.* 227 (2), 490-496.
- Wojtowicz, J.M., Kee, N. (2006) BrdU assay for neurogenesis in rodents. *Nat. Protoc.* 1 (3), 1399-1405.
- Xu, T., Shen, X., Yu, H., Sun, L., Lin, W., Zhang, C. (2016) Water-soluble ginseng oligosaccharides protect against scopolamine-induced cognitive impairment by functioning as an antineuroinflammatory agent. *J. Ginseng Res.* 40 (3), 211-219.
- Yaffe, K., Barnes, D., Nevitt, M., Lui, L.Y., Covinsky, K. (2001) A prospective study of physical activity and cognitive decline in elderly women: women who walk. *Arch. Intern. Med.* 161 (14), 1703-1708.
- Yamada, K., Nabeshima, T. (2003) Brain-derived neurotrophic factor/TrkB signaling in memory processes. *J. Pharmacol. Sci.* 91 (4), 267-270.
- Yan, B.C., Park, J.H., Chen, B.H., Cho, J.H., Kim, I.H., Ahn, J.H., Lee, J.C., Hwang, I.K., Cho, J.H., Lee, Y.L., Kang, I.J., Won, M.H. (2014) Long-term administration of scopolamine interferes with nerve cell proliferation, differentiation and migration in adult mouse hippocampal dentate gyrus, but it does not induce cell death. *Neural Regen. Res.* 9 (19), 1731-1739.
- Yelkenli, İ.H., Ulupinar, E., Korkmaz, O.T., Şener, E., Kuş, G., Filiz, Z., Tunçel, N. (2016) Modulation of corpus striatal neurochemistry by astrocytes and vasoactive intestinal peptide (VIP) in parkinsonian rats. *J. Mol. Neurosci.* 59 (2), 280-289.
- Zhang, L., Zhao, Q., Chen, C.H., Qin, Q.Z., Zhou, Z., Yu, Z.P. (2014) Synaptophysin and the dopaminergic system in hippocampus are involved in the protective effect of rutin against trimethyltin-induced learning and memory impairment. *Nutr. Neurosci.* 17 (5), 222-229.
- Zhang, Y., Xue, Y., Meng, S., Luo, Y., Liang, J., Li, J., Ai, S., Sun, C., Shen, H., Zhu, W., Wu, P., Lu, L., Shi, J. (2016) Inhibition of lactate transport erases drug memory and prevents drug relapse. *Biol. Psychiatry.* 79 (11), 928-939.

## EK-1. ETİK KURUL ONAYI

T.C.  
**ANADOLU ÜNİVERSİTESİ**  
**HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURUL KARARI**

**TOPLANTI TARİHİ** : 01.10.2014  
**TOPLANTI SAYISI** : 45  
**DOSYA KAYIT NUMARASI** : 14-25  
**KARAR NUMARASI** : 2014-25  
**ARAŞTIRMACILAR** : Doç.Dr. Özgür Devrim CAN, Yard.Doç.Dr. Ümide Demir ÖZKAY  
Prof.Dr. Emel ULUPINAR, Umut İrfan ÜÇEL, Araş.Gör.Feyza ALYU  
**HAYVAN TÜRÜ VE SAYISI** : Wistar 300

Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı öğretim görevlilerinden Doç.Dr. Özgür Devrim CAN' ın araştırma yürütücüsü olduğu 14-25 kayıt numaralı ve "Tofisapam'ın sıçanların kognitif parametreleri ve hipokampal morfolojileri üzerine etkilerinin araştırılması " konulu çalışma; Deney Hayvanları Etik Kurulu Yönergesine uygun bulunarak onaylanmasına karar verilmiştir.

  
Doç.Dr. Bülent ERGÜN (Başkan)

Doç.Dr. Özgür Devrim CAN (Üye)

Prof.Dr. Hülya SIVAS (Üye)

Yard.Doç.Dr. Sinem İLGIN (Üye)

Vet.Hek.Erdem ERKÜŞ (Üye)

Zuhal ERYILMAZ (Üye)

Vet.Hek.Adem MUSLUK (Üye)

## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Umut İrfan ÜÇEL  
Yabancı Dil: İngilizce  
Doğum Yeri ve Yılı: Eskişehir/1983  
E-Posta: [uiucel@gmail.com](mailto:uiucel@gmail.com)

### Eğitim ve Mesleki Geçmişi:

- Anadolu Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 2007
- Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmakoloji A.B.D. Tezli Yüksek Lisans Programı, 2013

### Tezleri:

- 2013, Yüksek Lisans Tezi, Mianserin'in streptozotosin ile diyabet oluşturulmuş sıçanlarda gelişen nöropatik ağrı üzerine etkisinin araştırılması, Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.

### Ulusal ve Uluslararası Hakemli Dergilerde Yayımlanan Makaleleri:

- Can, Ö.D., Üçel, U.İ., Demir Özkay, Ü., Dikmen, M. (2017) Mianserin'in sıçanlarda streptozotosin ile indüklenen hiperglisemi ve metabolik değişiklikler üzerine etkisi, *Cukurova Med. J.* 42 (1), 103-119.
- Üçel, U.İ. (2016) Depresyon Etiyolojisi ve Sitokinlerin Rolü, *D.Ü. Sağlık Bil. Enst. Derg.* 6 (1), 41-45.
- Demir Özkay, Ü., Söztutar, E., Can, Ö.D., Üçel, U.İ., Öztürk, Y., Ulupinar E. (2015) Effects of long-term agomelatine treatment on the cognitive performance and hippocampal plasticity of adult rats. *Behav. Pharmacol.* 26 (5), 469-480.
- Ilgin, S., Can, O.D., Atli, O., Ucel, U.I., Sener, E., Guven, I. (2015) Ciprofloxacin-induced neurotoxicity: evaluation of possible underlying mechanisms, *Toxicol. Mech. Methods.* 25 (5), 374-381.
- Üçel, U.İ., Can, Ö.D., Özkay, Ü.D., Öztürk, Y. (2015) Antihyperalgesic and antiallodynic effects of mianserin on diabetic neuropathic pain: A study on mechanism of action. *Eur. J. Pharmacol.* 756, 92-106.



- Can, Ö.D., Demir Özkay, Ü., Üçel, U.İ. (2013) Anti-depressant-like effect of vitexin in BALB/c mice and evidence for the involvement of monoaminergic mechanisms *Eur. J. Pharmacol.* 699 (1-3), 250-257.
- Demir Özkay, Ü., Yurttaş, L., Özkay, Y., Üçel, U.İ., Can, Ö.D., Öztürk, Y. (2013) Synthesis of new 1-Phenyl-2-(4-substituted-piperazin-1-yl)-propanol derivatives and evaluation of their antidepressant-like effects. *Arch. Pharm. Res.* 36 (7), 802-811.
- Can, O.D., Altıntop, M.D., Ozkay, U.D., Uçel, U.I., Doğruer, B., Kaplancikli, Z.A. (2012) Synthesis of thiadiazole derivatives bearing hydrazone moieties and evaluation of their pharmacological effects on anxiety, depression, and nociception parameters in mice. *Arch. Pharm. Res.* 35 (4), 659-669.

#### Ulusal ve Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan Bildirileri:

- 2017, Poster bildiri, Ö.D. Can, U.İ. Üçel, Ü. Demir Özkay, E. Ulupınar, Effects of agomelatine treatment on the hippocampal morphology in diabetic rats. 9th International Congress on Psychopharmacology & 5th International Symposium on Child and Adolescent Psychopharmacology, Antalya, Türkiye.
- 2017, Poster bildiri, U.İ. Üçel, Ö.D. Can, Tofisopam'ın sıçanlarda skopolamin ile indüklenen amnezi üzerine etkileri. 3rd International Convention of Pharmaceuticals and Pharmacies, İstanbul, Türkiye.
- 2015, Poster bildiri, U.İ. Üçel, Ö.D. Can, Ü. Demir Özkay, Beneficial effects of agomelatine on diabetes induced depression and cognitive deficits in rats. 2 World Congress on NeuroTherapeutics (DDDn), Prag, Çek Cumhuriyeti.
- 2015, Poster bildiri, O.D. Can, U. Demir-Ozkay, M. Dikmen, U.I. Ucel, Beneficial Effect of Mianserin in Experimentally Induced Chronic Hyperglycemia: Evidence of Increased Ins 1 mRNA Expression. 7th International Congress on Psychopharmacology & 3rd International Symposium on Child and Adolescent Psychopharmacology, Antalya, Türkiye.
- 2015, Poster bildiri, U.I. Ucel, O.D. Can, U. Demir-Ozkay, Contribution of Adrenergic Receptors to Anti-allodynic Effect of Mianserin in Experimentally Induced Diabetic Neuropathy Model. 7th International Congress on Psychopharmacology & 3rd International Symposium on Child and Adolescent Psychopharmacology, Antalya, Türkiye.

- 2015, Poster bildiri, Ö.D. Can, Ü.D. Özkay, U.İ. Üçel, V.C. Yıldız, Kronik agomelatin uygulaması sıçanlarda gastrointestinal geçiş hızını azaltır. 13. Ulusal Sinirbilim Kongresi, Konya, Türkiye.
- 2014, Poster bildiri, E. Soztutar, Ö.D. Can, U. Demir Ozkay, U.I. Ucel, E. Ulupinar, Effects of chronic agomelatine treatment on dorsal hippocampal neuron numbers. 16. Ulusal Anatomi Kongresi, Malatya, Türkiye.
- 2014, Poster bildiri, E. Polat, E. Soztutar, U.I. Ucel, E. Ulupinar, Hippocampal volume changes observed in the diabetic rats treated with mianserin. 16. Ulusal Anatomi Kongresi, Malatya, Türkiye.
- 2014, Poster bildiri, N. Turan, F. Alyu, H. Aydın, U. I. Ucel, U. D. Ozkay, Y. Ozturk, Anxiolytic Activities of Some Pyrazole Derivatives. 4th International Meeting on Pharmacy and Pharmaceutical Science (IMPPS-4), İstanbul, Türkiye.
- 2014, Poster bildiri, H. Aydın, U. I. Ucel, U. D. Ozkay, O. D. Can, Centrally and Peripherally Mediated Antinociceptive Activities of Some 1,3,5-triaryl-4,5-dihydro-1H-pyrazole Derivatives. 4th International Meeting on Pharmacy and Pharmaceutical Science (IMPPS-4), İstanbul, Türkiye.
- 2014, Poster bildiri, U.I. Ucel, O. D. Can, U. D. Ozkay, Antihyperalgesic and Antiallodynic Effect of Mianserin on Diabetic Neuropathic Pain in Rats. 4th International Meeting on Pharmacy and Pharmaceutical Science (IMPPS-4), İstanbul, Türkiye.
- 2012, Poster bildiri, Ü. Demir Özkay, O.D. Can., U. Ucel, Y. Öztürk, Antihyperglycemic and behavioral effects of mianserin on streptozotocin diabetic rats. 6th Meeting of the Federation of the European Pharmacological Societies Granada, İspanya.
- 2012, Poster bildiri, Ö.D. Can, E. Ulupinar, Ü. Demir Özkay, U.İ. Üçel, The effect of simvastatin treatment on behavioral parameters of rats fed with standard or high fat diet. 10th International Symposium on Pharmaceutical Science, Ankara, Türkiye.
- 2012, Poster bildiri, Ü. Demir Özkay, Ö.D. Can, E. Ulupinar, U.İ. Üçel, The effect of maternal and post weaning high-fat diet exposure on behavioral and nociceptive parameters in Sprague-Dawley rats. 10th International Symposium on Pharmaceutical Science, Ankara, Türkiye.

- 2012, Poster bildiri, U.İ. Üçel, Ü. Demir Özkay, Ö.D. Can, M.D. Altıntop, Z.A. Kaplancıklı, Antinociceptive effects of some triazole derivatives. 10th International Symposium on Pharmaceutical Science, Ankara, Türkiye.
- 2011, Poster bildiri, U.İ. Üçel, B. Doğruer, O.D. Can, M.D. Altıntop, Bazı tiyadiazol türevi bileşiklerin farelerin anksiyete ve depresyon parametreleri üzerine etkilerinin araştırılması. Türk Farmakoloji Derneği 21. Ulusal Farmakoloji Kongresi, Eskişehir, Türkiye.
- 2011, Poster bildiri, B. Doğruer, U.İ. Üçel, Y. Öztürk, G. Turan-Zitouni, Bazı hidrazon türevi bileşiklerin antinosiseptif etkilerinin araştırılması. Türk Farmakoloji Derneği 21. Ulusal Farmakoloji Kongresi, Eskişehir, Türkiye.

