

**T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Çetin Hakan KARADAĞ

**SIÇANLARDA MORRİS SU LABİRENTİ UZAYSAL
ÖĞRENME EĞİTİMLERİ SIRASINDA
HİPOKAMPÜSTE *PP1*, *BDNF* VE *REELİN*
GENLERİNİN EKSPRESYONLARINDA MEYDANA
GELEN DEĞİŞİKLİKLERİN BELİRLENMESİ**

(Yüksek Lisans Tezi)

Fatma Ceyda KORUCU

EDİRNE-2015

**T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Çetin Hakan KARADAĞ

**SIÇANLARDA MORRİS SU LABİRENTİ UZAYSAL
ÖĞRENME EĞİTİMLERİ SIRASINDA
HİPOKAMPÜSTE *PP1*, *BDNF* VE *REELİN*
GENLERİNİN EKSPRESYONLARINDA MEYDANA
GELEN DEĞİŞİKLİKLERİN BELİRLENMESİ**

(Yüksek Lisans Tezi)

Fatma Ceyda KORUCU

Destekleyen Kurum: TÜBAP- 2014/51


Tez No:

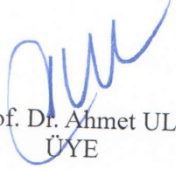
EDİRNE-2015


T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğü

ONAY


Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde ve Prof. Dr. Hakan KARADAĞ'ın danışmanlığında Yüksek Lisans öğrencisi Fatma Ceyda KORUCU'ya ait tarafından tez başlığı "Sıçanlarda Morris Su Labirenti Uzaysal Öğrenme Eğitimleri sırasında Hipokampüste PP1, BDNF ve REELİN Genlerinin Ekspresyonlarında Meydana Gelen Değişikliklerin Belirlenmesi" olarak teslim edilen bu tezin tez savunma sınavı 08.01.2016 tarihinde yapılarak aşağıdaki jüri üyeleri tarafından "Yüksek Lisans Tezi" olarak kabul edilmiştir.


Prof. Dr. Hakan KARADAĞ
JÜRİ BAŞKANI


Prof. Dr. Ahmet ULUGÖL
ÜYE


Prof. Dr. Aydın BARLAS
ÜYE

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.


Doç. Dr. Tammam SİPAHİ
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimin ve tez çalışmam boyunca yardımını ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen danışmanım Prof. Dr. Çetin Hakan KARADAĞ'a, bilgi ve tecrübelerinden her zaman yararlandığım Prof. Dr. Ahmet ULUGÖL, Prof. Dr. Dikmen DÖKMECİ ve Yrd. Doç. Dr. Özgür GÜNDÜZ'e, bana daima güvenen Prof Dr. İrfan ÇİÇİN'e, arkadaşlarım Ruhan Deniz TOPUZ, Kübra AYDEMİR, Özlem ÜREK ve Gürkan KILIÇCIGİL'e, çalışma arkadaşlarıma, yardım ve desteklerinden dolayı nişanlım Hakan NAZLI'ya, bugünlere gelmemde en büyük emeğe sahip olan aileme, desteklerinden dolayı TÜBAP birimine teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	3
ÖĞRENME VE BELLEK	3
HİPOKAMPÜS VE BELLEK	8
MORRİS SU LABİRENTİ	10
BEYİN KÖKENLİ NÖROTROFİK FAKTÖR	11
REELİN	14
PROTEİN FOSFATAZ 1	16
GEREÇ VE YÖNTEMLER	19
BULGULAR	24
TARTIŞMA	30
SONUÇLAR	35
ÖZET	36
SUMMARY	37
KAYNAKLAR	38
ŞEKİLLER LİSTESİ	44
ÖZGEÇMİŞ	45
EKLER	

SİMGE VE KISALTMALAR

AMPA	:	α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropionik asit
BDNF	:	Brain-derived neurotrophic factor
CA1	:	Cornu Ammonis 1
CA2	:	Cornu Ammonis 2
CA3	:	Cornu Ammonis 3
CA4	:	Cornu Ammonis 4
cAMP	:	Cyclic adenosine monophosphate
CREB	:	cAMP response element binding protein
DNA	:	Deoksiribonükleik asit
GABA	:	Gama-aminobütirik asit
GAPDH	:	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
LTD	:	Long term depression
LTP	:	Long term potentiation
NGF	:	Nerve growth factor
NMDA	:	N-metil-D-aspartik asit
PCR	:	Polymerase chain reaction
PP1	:	Protein phosphatase 1
RQ	:	Relative quantitation
RNA	:	Ribonükleik asit
RT-PCR	:	Real time-PCR

GİRİŞ VE AMAÇ

Öğrenme ve uzun süreli bellek, saatler, haftalar hatta ömür boyu süren ve oluşumunun altında gen ekspresyonu, protein sentezi, sinaptik güçlenme gibi birçok farklı moleküler ve hücrel değişiklik yatan karmaşık bir süreçtir (1).

Hipokampüsün uzaysal öğrenme ve bellek oluşumuyla ilgili bir yapı olduğu daha önce birçok çalışmada gösterilmiştir (2). Henüz tam olarak açıklanamayan öğrenme süreci ve bellek oluşumunun fizyolojik mekanizmaları ve düzenleyicileri hakkında çalışmalar devam etmektedir. Öğrenme sürecinde ve bellek yapılımasında hipokampüste birçok genetik değişikliğin de meydana geldiği farklı çalışmalarda gösterilmiştir. Gerek doğrudan DNA üzerinde, gerekse histonlar gibi DNA ile ilişkili proteinler üzerinde meydana gelen değişiklikler, hem öğrenme sürecini hem de bellek oluşumunu etkilemektedir (3). Çeşitli genlerin sinaptik plastisite ve bellek oluşumunu indüklediği ya da inhibe ettiği düşünülmektedir (3,4). Hipokampüste oldukça fazla bulunan beyin kökenli nörotrofik faktör (*brain-derived neurotrophic factor, BDNF*)'ün uzun süreli potansiyalizasyon (*long term potentiation, LTP*), bellek oluşumu ve depolanması için gerekli olan sinaptik plastisite ve nöronal farklılaşma gibi aktivite bağımlı nöronal modifikasyonlarda rol oynadığı gösterilmiştir (5-7). *Reelin* hipokampüste sinaptik gücü ve plastisiteyi etkileyerek işlev gösterir. Yapılan çalışmalar *reelin* sinyalinin sinaptik bütünlüğün sürdürülmesinde ve uzaysal öğrenme görevlerinde önemli rol oynadığını göstermiştir (2,8). Protein fosfataz 1 (*Protein phosphatase 1, PPI*) ise sinaptik plastisite, bellek oluşumu gibi hücrel süreçleri inhibe ederek etki gösterir (2,4).

Bu çalışmada uzaysal öğrenme ve bellek gelişiminde rol oynadığı bilinen, hipokampüste aktiviteleri değişen genlerin incelenmesi amaçlanmaktadır. Daha önce yapılan çalışmalarda amigdala, prefrontal korteks gibi beyin bölgeleri ile ilgili testlerde *BDNF*, *reelin*, *PPI* gibi genlerin ekspresyonlarında değişiklikler olduğu gösterilmiştir. Çalışmamızda hipokampüste ardışık eğitimlerden sonra günler içinde ilgili genlerin ekspresyonlarında meydana gelen değişimi incelemeyi amaçladık.

GENEL BİLGİLER

ÖĞRENME VE BELLEK

Öğrenme, çevre hakkında bilgi ve deneyim edinme sonucunda davranışta meydana gelen değişiklikler şeklinde tanımlanabilir. Bellek ise bu bilgi ve deneyimin kayıt edildiği, saklandığı ve geri çağrıldığı bir süreçtir (9-11).

Bellek bilginin saklanma süresine ve saklanan bilginin tipine göre iki alt tipte sınıflandırılabilir.

1. Saklanma süresine göre
 - a. Kısa süreli bellek
 - b. Uzun süreli bellek
2. Saklanan bilginin tipine göre
 - a. Deklaratif bellek (eksplisit bellek)
 - b. Deklaratif olmayan bellek (implisit bellek)

Saklanma Süresine Göre Bellek Tipleri

Saklanma sürelerine göre bellek ilk kez 19. yüzyıl sonlarında Hering, Ebbinghaus daha sonra ise Atkinson ve Shiffrin tarafından sınıflandırılmıştır (12). Kısa süreli bellek, birkaç saniye ya da en çok birkaç dakika ile sınırlıdır. Uzun süreli bellekte ise bilgi bir kez depolandıktan sonra aylar, yıllar hatta yaşam boyu saklanabilir (13).

Kısa süreli bellek

Çalışma belleği olarak da bilinen kısa süreli bellek bir bilginin birkaç saniye ile birkaç dakika boyunca hatırlanabilmesidir (11).

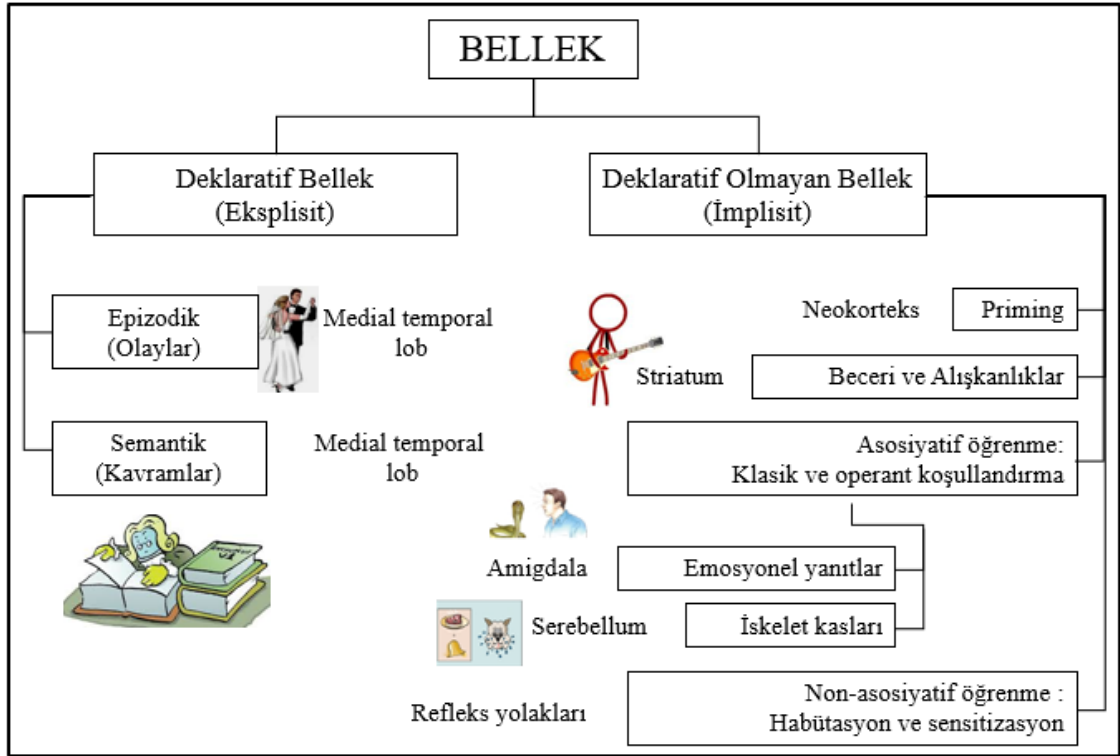
Kısa süreli belleğin açıklanmasında ileri sürülen birkaç teori vardır. Öne sürülen ilk teoriye göre kısa süreli bellek sinir sinyallerinin belirli bir devre içinde sürekli dolaşmasından kaynaklanır. Kısa süreli belleği açıklayan diğer bir mekanizma ise presinaptik uçlarda nörotransmitter salımı ile meydana gelen fasilitasyon (kolaylaştırma) ve inhibisyonudur. Fasilitasyonun moleküler mekanizmasında; duysal uç ile birlikte fasilatör uç da uyarılır ve fasilatör sinapstan serotonin salınır. Serotonin presinaptik uçta bulunan reseptörlere bağlanarak siklik adenzin mono fosfat (*cyclic adenosine monophosphate*, cAMP) oluşmasını sağlar. cAMP, presinaptik uç içinde yer alan protein kinaz A (PKA)'yı aktive eder ve potasyum (K^+) kanalları kapanır. Potasyum zar dışına çıkamadığı için aksiyon potansiyelinin süresi uzar. Uzayan aksiyon potansiyeli süresi kalsiyum (Ca^{+2}) kanallarının uzun süre aktive olmasına ve bu da sinaptik uca aşırı miktarda Ca^{+2} girmesine yol açar. Kalsiyum iyonları da transmitter salınmasını artırarak sinaptik iletiyi kolaylaştırır. Kısa süreli belleğin olası diğer bir açıklaması ise sinaptik potansiyalizasyondur. Sinaptik potansiyalizasyon, sinaptik iletide artış meydana getirir. Sinaptik potansiyalizasyon, presinaptik uçtan bir uyarı dizisi geçerken, presinaptik uç içine alınan Ca^{+2} miktarının her impuls ile biraz daha artmasından ve presinaptik uçlarda Ca^{+2} iyonu birikmesinden kaynaklanabilir. İçeri giren kalsiyum miktarı mitokondrilerin veya endoplazmik retikulumun alabileceği miktarı aştığında, bu aşırı miktardaki kalsiyum sinapsta nörotransmitter salgılanmasına neden olabilir (10,13).

Uzun süreli bellek

Uzun süreli bellek, bilgilerin yıllarca ve bazen yaşam boyu depolanmasıdır. Uzun süreli bellek, sinapslardaki yapısal değişikliklerin sonucunda oluşur (14). Nörotransmitter salgılanmasında vezikül boşaltma bölgelerinin sayısındaki artış, nörotransmitter salgılayan veziküllerin sayısında artış, presinaptik uç sayısında artış, dentritlerde oluşan yapısal değişiklikler sinapslarda meydana gelen en önemli yapısal değişikliklerdir (13).

Saklanan Bilginin İçeriğine Göre Bellek Tipleri

Psikolog Peter Graf ve Daniel Schacter uzun süreli belleğin iki tipi olduğunu buldular (Şekil 1). Bu bellek tiplerinden deklaratif bellek, bilinçli ve açık olarak ifade edilebilen daha önceki deneyimleri de dikkate alan ve birçok parçanın birleştirilmesini gerektiren bellektir.



Şekil 1. Uzun süreli bellek oluşumu ve ilişkili olduğu bölgeler (Sweatt JD (15)'den uyarlanmıştır).

Deklaratif olmayan bellek ise bilinçsiz yapılan, motor ve algısal becerileri içeren, rijit ve bilginin kazanıldığı orijinal koşulların geri çağırma için yeterli olduğu bellek tipidir (16).

Deklaratif bellek

Eksplisit ya da bilinçli bellek olarak da isimlendirilen deklaratif bellek epizodik ve semantik bellek olarak sınıflandırılabilir. Epizodik bellek olaylar ve kişisel deneyimler ile ilgili bellek alt tipi iken semantik bellek gerçekler ve kavramlarla ilgili bellek alt tipidir (17). Deklaratif bellek oldukça esnektir ve pek çok parçanın birleştirilmesini gerektirir.

Deklaratif belleğin uzun süreli saklanması medial temporal lob ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Medial temporal lob ayrıca belleğe aktarılabilecek bilginin öğrenilmesinde ve bu bilginin uzun süreli belleğe yerleştirilmesinde de rol oynar (10).

Deklaratif bellek, görsel, işitsel ve somatik bilgilerin sentez edildiği temporal lob, hipokampus, subikulum, entorinal korteks gibi diensefalik yapıların bütünlüğüne bağlıdır. Deklaratif bellek için beyinde tek bir depolama alanı yoktur, bilgilerin depolanma yeri beyin farklı bölgelerine dağılmıştır ve görsel, işitsel, somatik ipuçları ile bu bilgilere bağımsız olarak erişilebilir.

Deklaratif bellekte bilgiler kodlanır, depolanır, pekiştirilir ve geri çağırılır.

1. Kodlama: Yeni bilgilerin duyu organları ile algılandığı ve bu bilgilerin bellekteki mevcut bilgilere eklendiği süreçtir.

2. Depolama: Belleğin uzun süre muhafaza edildiği mekanizma ve yerleri içeren süreçtir. Uzun süreli belleğin depolama kapasitesi sınırsız iken kısa süreli belleğin depolama kapasitesi çok sınırlıdır.

3. Pekiştirme: Geçici olarak saklanan ve kalıcı olmayan bilgilerin gen ekspresyonları ve protein sentezleri ile sinapslarda meydana gelen yapısal değişiklikler ile daha kalıcı hale getirildiği süreçtir.

4. Geri çağırma: Farklı yerlerde depolanmış bilgilerin hatırlandığı süreçtir (9, 10).

1950'li yılların ortasında Milner ve Scoville'nin, epilepsi hastası olan H.M.'nin tedavisi için her iki temporal lobun iç yüzeyini, hipokampus ve çevresindeki bazı yapıları çıkarmaları, medial temporal lobun ve hipokampusün deklaratif bellekte önemli rol oynadığını göstermiştir (9). Son birkaç yılda amnezik hastalarda yapılan çalışmalarda medial temporal lobta meydana gelen hasarın belleğin kodlama, depolama, pekiştirme ve geri çağırma basamaklarına zarar verdiği gösterilmiştir (10).

Wagner ve ark. (18) yaptığı bir çalışmada deneklerin uzun bir kelime serisini öğrendikleri sırada sol prefrontal bölgenin bazı yerlerinde aktivitenin artmış olduğu gösterilmiştir. Aynı yöntem kullanılarak yapılan başka bir çalışmada ise resimlerin kodlanması sırasında sağ prefrontal kortekste daha yüksek aktivite bulunmuştur (10).

Deklaratif olmayan bellek

İmplicit bellek olarak da bilinen deklaratif olmayan bellek, bir kez kazanıldıktan sonra bilinçsiz ve kendiliğinden gerçekleşen beceri ve hareketleri kapsar (13).

Deklaratif olmayan bellek, *priming* (hazırlama), beceri ve alışkanlıklar, asosiyatif öğrenme (klasik ve *operant* koşullandırma), asosiyatif olmayan öğrenme (habitüasyon ve sensitizasyon) şeklinde sınıflandırılır. *Priming* dışındaki bellek tipleri algısal ve bilişsel becerileri, koşullandırılmış yanıtların oluşumunu sağlar ve belleğin bu formları tekrar yolu ile öğrenilir, uygulama ile performans daha doğru ve hızlı hale gelir. Milner, H.M.'nin bir aynaya bakarak iç içe konulmuş iki yıldızın dış hatları arasında kalacak şekilde çizgi çizmeyi amnezik olmayan bireyler gibi öğrenebildiğini göstermiştir (10). Bu da deklaratif olmayan belleğin medial temporal lob sisteminden bağımsız olduğunu göstermektedir.

1- *Priming*: Herhangi bir öğe ile ilk karşılaştığımızda o öğe beynimize bir şekilde sunulur ve beyinde işlenir. Aynı öğeyle tekrar karşılaştığımızda daha hızlı hatırlarız. *Priming*,

medial temporal lob ile ilişkili değildir, bilinçsiz olarak yapılır ve uzun süre saklanabilir. *Priming*'den neokorteks sorumludur (10).

2- Beceri ve alışkanlıklar: Motor (tenis oynama vb.) ve motor olmayan beceriler (ayna hayali ile okuma vb.) ilk kez öğrenildiği sırada bilinçli bir şekilde yapılır. Beceri kazanıldıktan sonra ise üzerinde düşünmeye gerek kalmaz. Motor becerilerin öğrenilmesi prefrontal korteks, bazal ganglionlar ve serebelluma bağlıdır. Beceri kazanıldıktan sonra bu bölgelerdeki aktivite azalır ve motor korteks, neostriatum ile birlikte hareketlerin yapılmasını sağlar (10,15)

3- Klasik ve *operant* (edimsel) koşullanma: İlk kez Ivan Pavlov tarafından tarif edilen klasik koşullanmanın temelini iki uyarının eşleşmesi oluşturur. Tek başına etkisi olmayan ışık, ses gibi koşullu uyarılar ile birlikte yiyecek, şok gibi koşulsuz uyarıların uygulanması sonucunda sadece koşulsuz uyarana yanıt vermeye başlanmasına klasik koşullanma denir (10,19). Klasik koşullanmanın standart prosedüründe koşullu uyarın verilmesine başlanır, bir süre sonra koşulsuz uyarın uygulanır ve iki uyarın birlikte sona erer. Belirli bir tekrarlardan sonra koşullu uyarın tek başına verildiğinde, koşulsuz uyarın verilmesi ile oluşan yanıt oluşturabilir. Koşullu ve koşulsuz uyarın uygulanmasının zamanlaması, koşullanmanın oluşması için çok önemlidir. İkisi aynı anda verilirse, koşullu uyarın koşulsuz uyarıdan sonra verilirse ya da koşullu uyarın koşulsuz uyarıdan çok önce verilirse koşullanma gerçekleşmez (10,13).

Tavşanlarda yapılan bir çalışmada, tavşanların gözüne bir kez hava üflendiğinde tavşanlarda doğal göz kırpması refleksi gerçekleşir ve zil sesi ile üfleme arasında sese yanıt olarak göz kırpması şeklinde bir koşullanma meydana getirilir. Serebellumun vermesine verilen hasar koşullu refleksi ortadan kaldırır fakat koşulsuz refleksi etkilemez. İnterposit nükleusta meydana gelen hasar tavşanlarda koşullu göz kırpması refleksini ortadan kaldırır (10,13).

Edgar Thorndike tarafından tanımlanan *operant* koşullanma ise, deneğin doğru bir yanıt ile ödül arasındaki ya da yanlış bir yanıt ile cezalandırma arasındaki ilişkiyi öğrendiği asosiyatif öğrenmenin bir çeşididir (10,13).

4- Habitüasyon (alışma) ve sensitizasyon (duyarlılaşma): Habitüasyonda, hayvan önemsiz ya da zararsız bir uyarını öğrenir ve zararsız bir uyarın sürekli uygulandığında uyarana karşı verilen tepkide refleksif yollar aracılığı ile zamanla bir azalma meydana gelir (10,13).

Sensitizasyon, hayvanda zararlı veya tehdit edici bir uyarın sonucunda gelişen yanıttır. Canlı, zararlı bir uyarın ile karşılaştığında farklı tip uyarılara da zararsız olsalar bile güçlü bir yanıt verir (10,13).

HİPOKAMPÜS VE BELLEK

Santral sinir sisteminde hipokampüs deklaratif, epizodik ve uzaysal bellek oluşmasını ve depolanmasını sağlayan temel yapıdır (14,15).

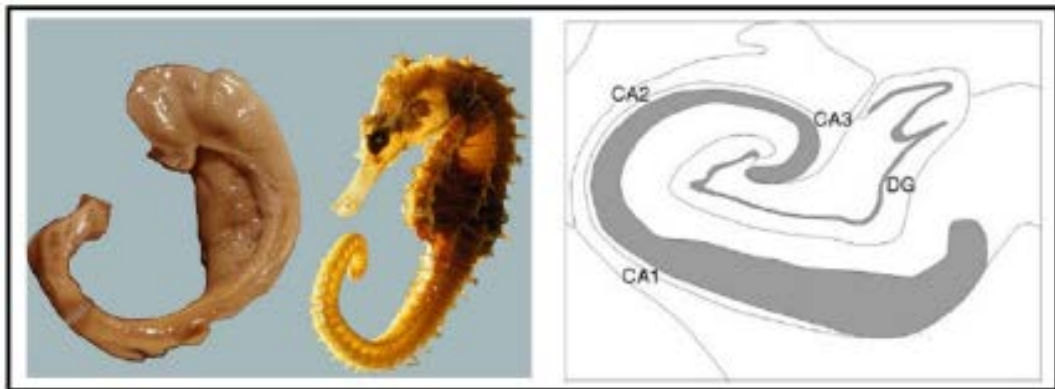
Temporal lob içerisine gömülü hipokampal formasyon, dentat girus, hipokampüs, subikulum, parasubikulum, presubikulum ve entorinal korteksten oluşur (20).

Hipokampüs Anatomisi

Hipokampüs terimi, Arantius isimli bir anatomist tarafından 1587 yılında vertikal düzlemde gördüğü yapıyı denizatına benzettiği için kullanılmıştır (21).

Hipokampüs, 5-8 cm uzunluğunda çift taraflı, temporal korteksin medial bölgesinde *ventriculus lateralis*'in *cornu inferius*'unun taban boyunca uzanan, C harfi şeklinde, anterior-posterior yönde yerleşmiş bir bölgedir. C harfinin konveks yüzü ventrikül boşluğuna, konkav yüzü ise hemisferin alt yüzüne doğru yönelmiştir. Alt mediale doğru subikulum ve girus parahipokampal ile devam eder (21,22).

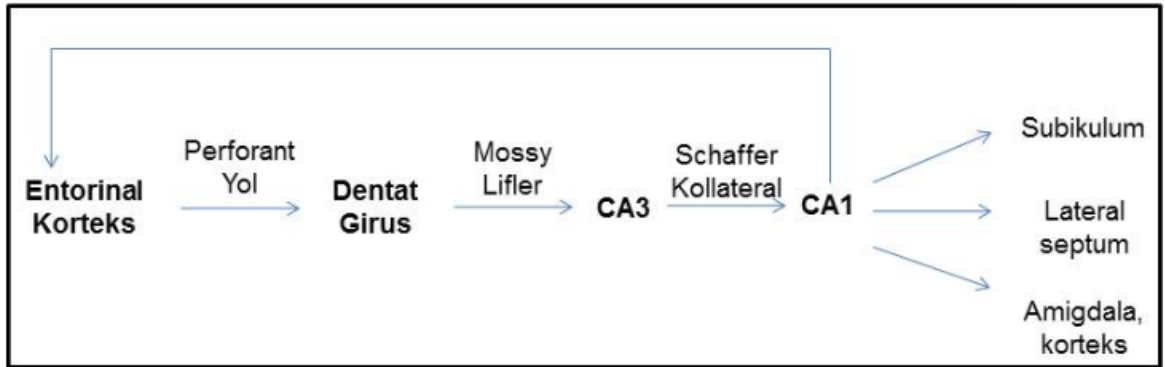
Hipokampüs aynı zamanda koç boynuzunu da anımsattığı için *Cornu Ammonis* (CA), yani ammon boynuzu da denilmektedir. Bu isimlendirme sebebiyle hipokampüsün dört alt bölgesi; CA1, CA2, CA3, CA4 şeklinde isimlendirilir. Hipokampüsün kuyruk kısmı CA1, kuyruğa yakın gövde kısmı CA2, baş bölgesine yakın olan gövde kısmı CA3 ve baş bölgesi de CA4 şeklinde isimlendirilir. CA1 ve CA3 en büyük ve en fazla tanımlanan bölgelerdir (Şekil 2) (21).



Şekil 2. İnsan hipokampüsünün denizatı ile benzerliği ve hipokampüsün alt bölgeleri (21).

Bölgeler arasında keskin ayrımlar yoktur. CA bölgelerinin temel nöronu piramidal nöronlardır. Duyusal ve uzaysal bilgiler hipokampüse çeşitli kortikal alanlardan, temporal lobda bulunan entorinal ve peririnal korteks aracılığı ile gelir. Hipokampüsten en büyük çıktı piramidal nöronlar aracılığı ile CA1 bölgesindedir. CA1 alanında meydana gelen lezyonlar sonucunda öğrenme ve bellekte görülen kayıplar bu bölge ile belleğin ilişkisini göstermektedir. Entorinal korteksten gelen bilgiler CA1 bölgesine direkt ve indirekt uyarıcı yollarla girer. Bu iki girdiye perforant yollar denir. Direkt yol entorinal korteksin üçüncü tabakasından başlar. Bu nöronların aksonları CA1 nöronlarının üzerindeki uç distal apikal dendritler ile sinaps yaparak iletilir. İndirekt yolda ise bilgi, entorinal korteksin ikinci tabakasından çıkıp üçlü sinaptik yol ile CA1 bölgesine ulaşır. İndirekt yolun ilk basamağında bilgi entorinal korteksin ikinci tabakasından çıkıp dentat girusun granüllü hücrelerine gelir. Bu entorinal aksonlar dentat girus hücreleri üzerinde sinaps yaparlar. Granüllü hücrelerin aksonları mossy lifler yolağı ile hipokampüsün CA3 bölgesindeki piramidal hücreleri uyarır. Son olarak da Schaffer kollateral yol ile CA1 bölgesindeki piramidal hücrelerin dendritlerine gelir (Şekil 3) (2,9,14,15,23).

Lezyon çalışmaları CA1 bölgesine giren direkt ve indirekt yolun her ikisinde öğrenme ve bellek ile ilişkili olabileceğini göstermektedir. CA1'e Schaffer kollateral yolak ile iletiyi ileten CA3, subikulum'a da bir lif grubunu gönderirir. Subikulum ise hipokampüsün çıktılarında sorumlu alandır (2,9,14,15,23).



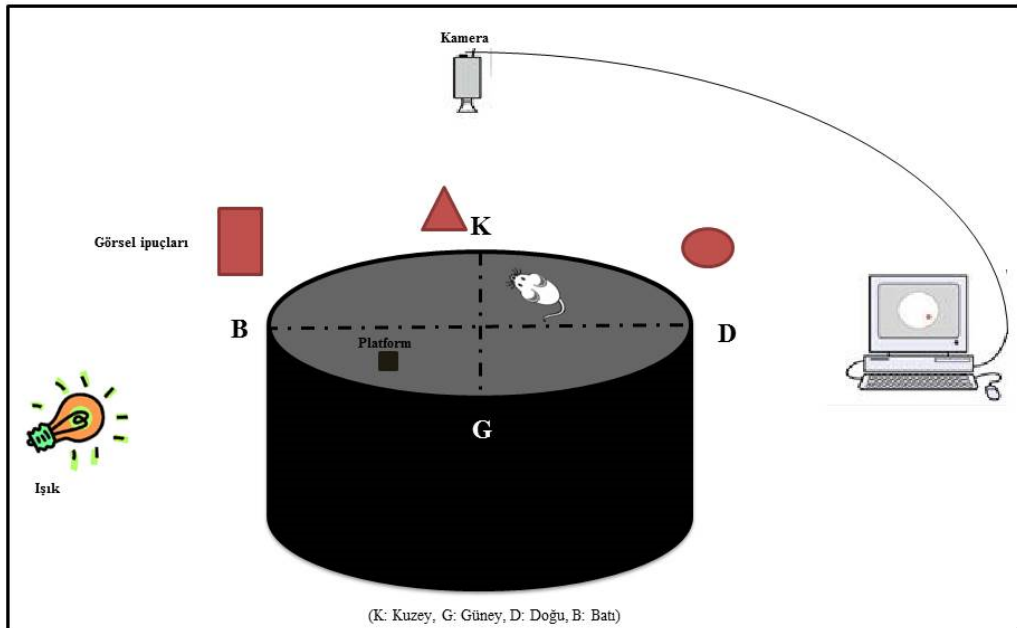
Şekil 3. Hipokampal indirekt yolun şematik gösterimi (Sweatt JD (23)'den uyarlanmıştır).

MORRİS SU LABİRENTİ

Morris su labirenti, 1981 yılında sıçan ve farelerde hipokampüse bağlı uzaysal öğrenme ve bellek çalışmaları için radyal labirente alternatif olarak Richard G. Morris tarafından geliştirilmiştir (24-26). Morris su labirenti nispeten daha az hayvan sayısı ile çalışma, deneyi basit ve hızlı bir şekilde yürütme, ön eğitime gerek duymama, uzaysal öğrenmeyi ve uzun dönem belleği ayırt etme, görsel ve motor performanslar gibi uzaysal olmayan yetenekleri test etme, koku algısının azalması, elektrik çarpması veya gıda yoksunluğu gibi hoş olmayan prosedürlerin olmaması ve cihazın düşük maliyetlerle kurulabilmesi gibi avantajları nedeniyle davranışsal nörobilim alanında en çok tercih edilen modellerden biridir (5).

Su labirenti, kemirgenlerin (fare, sıçan) dairesel bir havuz içinde uzaysal ipuçlarından faydalanarak sudan kaçıp, gizlenmiş veya görünür bir platforma ulaşmaya çalıştıkları düzendir (Şekil 4).

Labirentin ve platformun büyüklüğü çalışılacak deney hayvanının türüne ve yaşına göre ayarlanmalıdır. Morris, düzenekte kullanılan havuzun çapını ilk olarak 132 cm olarak belirtmiştir. Labirentin çapı fareler için 90-125 cm arasında, sıçanlar için 130-210 cm arasında olmalıdır. Gizlenmiş Morris su labirenti düzeneğinde labirent, toksik olmayan boya, sentetik opaklaştırıcılar ile opak hale getirilmiş 21-26 °C'de su ile doldurulur. Labirentin içine su yüzeyinin 0.5-2 cm (sıçanlar için 1-2 cm, fareler için 0.5-1 cm) kadar altına hayvan tarafından



Şekil 4. Morris su labirentinin şematik görünümü

görülmeyecek biçimde kare ya da daire şeklinde olan, akrilik veya polivinilklorürden yapılan platform sabit olarak yerleştirilir. Labirent, lokalizasyonu ifade edebilmek için kuzey, güney, doğu, batı olmak üzere dört nokta ile hayali olarak 4 kadrana ayrılır. Labirentin dışına deney süresince sabit konumda muhafaza edilmek üzere görsel ipuçları yerleştirilir. Hayvanlar ipuçlarını kullanarak platformun yerini bulmayı öğrenirler. Birçok protokolda dört başlangıç noktası kullanılır, bazı araştırmacılar sekiz başlangıç noktası kullanır (5,6,24,25,27-29).

Standart bir protokolda hayvanlara rastgele seçilmiş başlangıç noktasından başlayarak dört pozisyonun her birinden eğitim yapılır. Başarılı denemelerden sonra hayvan yaklaşık 10-15 sn platform üzerinde bırakılır. Eğer hayvan belirlenen süre içerisinde platformu bulamazsa, yardımla hayvana platform buldurulur ve hayvan yaklaşık 15-20 sn boyunca platformda bırakılır (25,26). Öğrenmenin sonunda referans belleği değerlendirmek için platform sudan çıkartılarak *probe* yüzmesi yapılır. Son eğitim gününden 24 saat sonra yapılan *probe* denemesinde hayvanın belirli bir süre boyunca suda yüzmesi sağlanır ve hedef kadranda geçirdiği süre ölçülür (25).

Hayvanların performanslarını ölçme, labirentin üzerine yerleştirilmiş video kayıt sistemi ile değerlendirilir. Performanslar değerlendirilirken platforma ulaşma süresi, yüzülen toplam mesafe uzunluğu, yüzme hızı gibi parametreler dikkate alınır (6,25).

Su labirenti testinde hayvanların performansında cinsiyet, tür, yaş, beslenme, strese maruziyet, enfeksiyon gibi faktörler etkilidir (25).

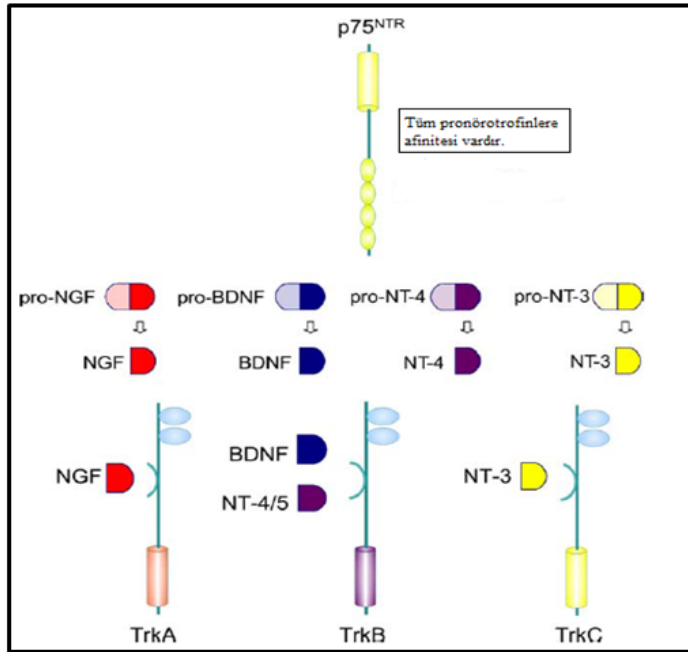
BEYİN KÖKENLİ NÖROTROFİK FAKTÖR

Nörotrofinler, erken beyin gelişiminde nöronların hayatta kalması ve farklılaşması gibi nöronal süreçlerde rol alan proteinlerdir (30,31). Memelilerde yaygın olarak santral sinir sisteminde eksprese edilen sinir büyüme faktörü (*nerve growth factor*, NGF), beyin kökenli nörotrofik faktör, nörotrofin-3 (NT-3) ve nörotrofin-4/5 (NT-4/5) olmak üzere dört nörotrofin tanımlanmıştır (30). Nörotrofin ailesinin prototipi olarak kabul edilen NGF, 1950 yılında keşfedildikten sonra, ailenin 2. üyesi olan *BDNF*, 1982 yılında domuz beyninden saflaştırılmıştır (32,33). Nörotrofinler 30-35 kilodalton (kDA) ağırlığında prekürsor proteinlerden ya da pronörotrofinlerden sentezlenirler (33). Tüm nörotrofinler temel olarak ortak yapıya sahip oldukları için selektif olmayan bir şekilde p75^{NGFR} reseptörüne, promotör bölgelerinde bulunan farklı domainler sayesinde ise, tropomiyozin ilişkili kinaz (*tropomyosine related kinase*, Trk) ailesinin reseptörlerine selektif olarak bağlanır ve

intraselüler sinyal kaskatlarını aktive ederek etkilerini gösterirler (7,30,33,34). NGF TrkA'ya, *BDNF* ve NT4/5 TrkB'ye, NT3 ise TrkC'ye ve daha düşük afinitede TrkB'ye selektif olarak bağlanır (Şekil 5) (35).

BDNF; uzun süreli potansiyalizasyon, bellek oluşumu ve depolanması için gerekli olan sinaptik plastisite ve nöronal farklılaşma gibi aktivite bağımlı nöronal modifikasyonları düzenleyen, üzerinde çok çalışılan bir nörotrofindir (31,35,36). Memeli beyinde en fazla prefrontal korteks ve hipokampüste sentezlenen *BDNF*, nöronlarda prekürsörü olan *proBDNF* şeklinde sentezlenerek *BDNF*'ye dönüştürülür. *proBDNF* ve *BDNF* farklı sinyal yollarını aktive ederek farklı fonksiyonlara sebep olur (7).

BDNF, Trk reseptörüne bağlandığında kinaz aktivasyonunu uyarır ve fosfatidilinositol 3-kinaz (*phosphatidylinositol 3-kinase*, PI3K), ekstraselüler sinyal düzenleyici kinaz (*extracellular signal regulated kinase*, ERK) olarak da bilinen mitojen aktiviteli protein kinaz (*mitogen-activated protein kinase*, MAPK) ve fosfolipaz C- γ (*phospholipase C- γ* , PLC- γ) sinyal yollarını aktive ederek intraselüler sinyal kaskatını başlatır (Şekil 6).



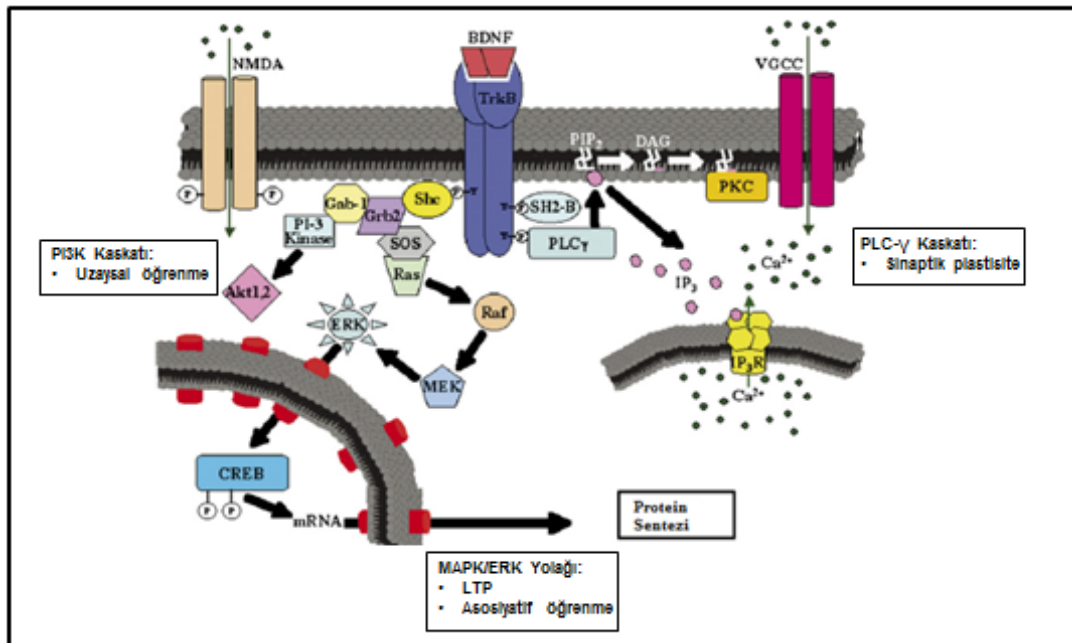
Şekil 5. Nörotrofinler ve bağlandıkları reseptörler (Schindowski K (35)'den uyarlanmıştır).

ERK yüksek oranda hipokampüsün piramidal dentritlerinde eksprese edilir, bu yüzden ras-MAPK/ERK yolağı, N-metil D-aspartat (NMDA) reseptörleri veya L tipi voltaj kapılı Ca^{+2} kanallarından Ca^{+2} girişi ile aktive edilir. Bu aktivasyon; LTP, hipokampüs ilişkili asosiyatif öğrenme ve *BDNF*'nin indüklediği omurga yapılanması için gereklidir. PI3K kaskatı, *BDNF*'nin dentritik hedeflenmesinden ve hipokampüs bağımlı uzaysal öğrenmeden sorumludur. PLC- γ kaskatı ise hipokampal sinaptik plastisitede rol oynar (30,37,38).

proBDNF, TrkB reseptörlerinin tersine bir etki oluşturan farklı bir sinyal kaskatını aktive eden $p75^{NGF}$ reseptörüne bağlanır.

BDNF, özellikle hipokampüs ve amigdala CA3 ve dentat girus bölgesinde daha fazla olmak üzere beynin her yerinde yüksek oranda eksprese edilir (37). *BDNF* gen ekspresyonu nöronal aktivite için gereklidir. *BDNF* ekspresyonu, doku kültürlerinde elektriksel aktivite ile artarken, hayvanlarda fiziksel egzersiz, yeni çevre, bilişsel öğrenme eğitimleri, kainik asite bağlı felçte artar. Örneğin, ışık ile uyarın verildiğinde görsel kortekste, osmotik uyarın ile hipotalamusta, elektriksel uyarın ve fiziksel egzersiz ile hipokampüste *BDNF* mRNA düzeyi artar (32,36).

İnsanlarda 11 eksone sahip ve 11. kromozomun 13-14. bölgesine yerleşmiş olan *BDNF* geni, sıçanlarda protein sentezini denetleyen, farklı promotörler ile ilişkili dört kısa 5' ekson (ekson I-IV) ve olgun *BDNF* proteininin sentezleyen 1 tane 3' eksondan (ekson V) oluşur (33, 39, 40). Sekiz farklı *BDNF* mRNA tanımlanmıştır. Farklı *BDNF* mRNA'ların biyolojik



Şekil 6. *BDNF* aracılı sinyal kaskatı (Amaral MD (30)'den uyarlanmıştır).

özellikleri tam olarak bilinmemektedir, ancak bu farklı *BDNF* mRNA'ların dokuya özgü *BDNF* gen ekspresyonunu düzenledikleri düşünülmektedir. Ekson IV, en çok akciğer ve kalpte eksprese olurken ekson I, II ve III ise en çok beyinde eksprese edilir (7,41).

BDNF'nin, LTP indüksiyonunda, sinaptik plastisitede, nöronal yaşam ve farklılaşmada, organizma ve çevresi ile ilişkili davranışsal etkileşimlerde rol oynadığı gösterilmiştir (7,41). *BDNF* ayrıca hücre ölümünün düzenlenmesinde, serebral kortekste dentritlerin büyümesinde de hayati öneme sahiptir (41). Sinaptik plastisite ile ilişkili *BDNF*, yetişkin hayvanlarda hipokampal öğrenmeyi de artırır (42).

Hipokampüsün CA1 bölgesinde bulunan sinapslarda *BDNF*'nin, LTP'yi kolaylaştırdığı gösterilmiştir. Hipokampal alanlarda *BDNF*'nin geç-LTP ve uzun dönem bellek gibi uzun dönem sinaptik etkilerinin cAMP ve yeni protein sentezine bağlı olduğu görülmüştür (38). *BDNF* ekspresyonunda meydana gelen değişiklikler depresyon, epilepsi, Huntington hastalığı, Parkinson ve Alzheimer hastalığı, amyotrofik lateral skleroz, şizofreni, ağrı gibi çeşitli patolojik süreçlerin oluşumuna sebep olur (32,40,43). Alzheimer hastalığında hipokampüs ve neokortekste *BDNF* mRNA düzeyleri azalır (35).

Stres, dentat girus ve hipokampüsün CA1 ve CA3 bölgelerinde *BDNF* ekspresyonunu azaltır. Strese bağlı *BDNF* down-regülasyon mekanizması tam bilinmemektedir. cAMP-CREB sinyal yolağında meydana gelen disfonksiyonun, stresin indüklediği *BDNF* down-regülasyonuna sebep olabileceği düşünülmektedir (39,44).

REELİN

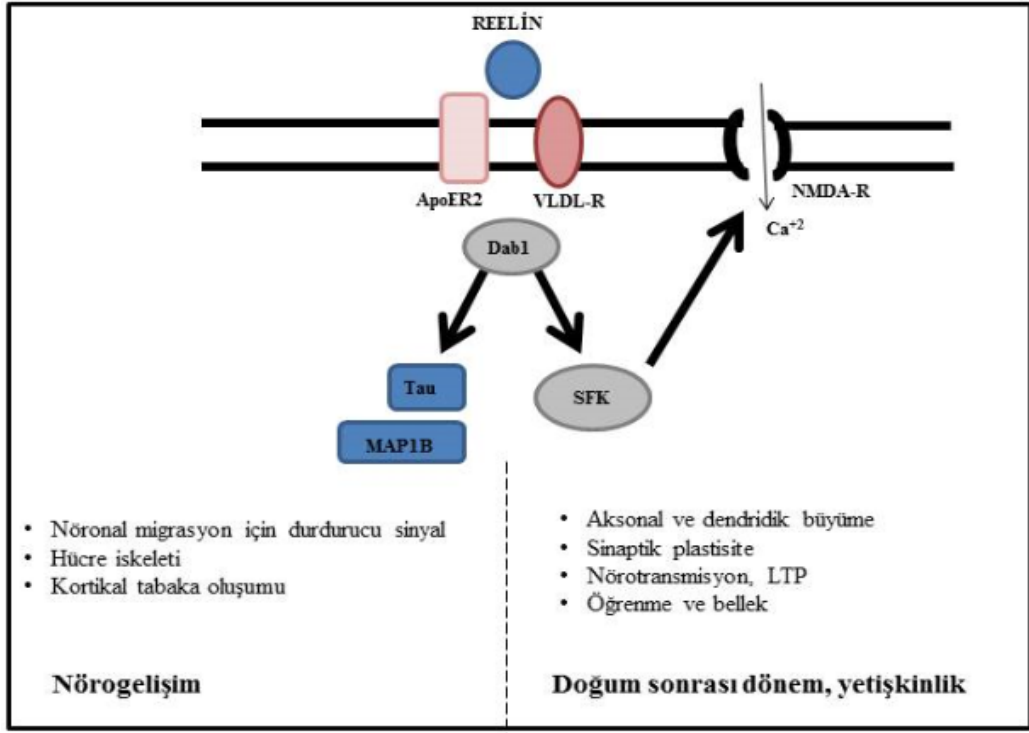
Reelin gelişmekte olan ve olgun beyinlerde bulunan ve nörolojik gelişim için önemli olan büyük bir ekstrasellüler glikoproteindir (8,45,46). Doğum öncesi dönemde *reelin*, nöronal migrasyonu ve hücre tabakası oluşumunu kontrol eden kortikal ve hipokampal *Cajal Retzius* hücreleri tarafından eksprese edilir ve salgılanır. *Reelin* ekspresyonu yetişkin dönemde de devam eder. Doğum sonrası dönemde ise, hücre migrasyonunu ve entegrasyonunu artırarak, sinaptogenezisi kolaylaştırarak ve sinaptik bağlantıları stabilize ederek nöronal plastisitenin düzenlenmesinde rol oynar. Korteks ve hipokampüste GABAerjik nöronların alt biriminde eksprese edilir ve salgılanır (45-48). *Reelin* eksprese eden hücreler özellikle dentat girus ve hipokampüsün *stratum lacunosum-moleculare* tabakalarının hiler bölgesinde de yer almaktadır. Bununla birlikte bu hücreler ayrıca CA1 ve CA3 bölgelerinin *stratum oriens* ve *stratum radiatum*'unda da bulunur (49,50).

1995’de iki grup birbirinden bağımsız olarak *reelin* genini klonladı. Bu gen, genomik DNA’nın yaklaşık 450kb uzunlukta bölümünü kapsayan 65 eksondan oluşmaktadır. *Reelin* geni farelerde 5. kromozoma yerleşmiştir. 1997 yılında insanlarda *reelin* geninin 7q22 kromozomu üzerinde bulunduğu gösterilmiştir (47,48).

Reelin yaklaşık olarak 450 kDa ağırlığındadır ve 3461 aminoasitten oluşur. Bu protein molekülü sinyal peptidi, glikozile bir N-uç ve bir hareket bölgesi içerir. Ana *sekans* her biri 350-390 aminoasitten oluşan ve merkezinde bir EGF-benzeri motifi içeren 8 *reelin* tekrarından oluşur. Bu molekül memeli türleri arasında yüksek benzerlik gösteren yüklü C-uç ile sonlanır. *Reelin in vivo* olarak 410, 330, 180 kDa ağırlığında 3 fragmana ayrılır. Bu fragmanların fizyolojik özellikleri tam olarak bilinmemektedir. Ancak ana fragmanın, kültürel embriyonik beyin bölümlerinde normal kortikal gelişimin sürdürülmesi için gerekli olduğu gösterilmiştir (47,48).

Reelin, VLDL (*very-low-density lipoprotein*) reseptör ve apolipoprotein E reseptör 2 (ApoER2) olmak üzere 2 farklı lipoprotein reseptörüne bağlanır ve NMDA reseptör aktivitesini kontrol ederek bilişsel süreçlerin önemli modülatörü olarak görev yapar. *Reelin*’in bu iki reseptöre bağlanması ve aktive olması, DAB-1 (*disabled-1*)’in fosforilasyonuna ve daha sonra ise SFK (*Src family kinaz*) aktivasyonuna, bu aktivasyon da sinaptik plastisite ve bellek fonksiyonlarının kontrolünde önemli rol oynayan NMDA reseptör tirozin kalıntılarının fosforilasyonuna sebep olmaktadır. *Reelin* tarafından ApoER2 ve VLDL-R aktivasyonu, hipokampüse bağlı öğrenme bellek sürecinde önemlidir (Şekil 7) (48,49). *Reelin* aracılı sinyal yolağının disfonksiyonu nörolojik, nöropsikiyatrik ve nörodejeneratif hastalıklarda önemli rol oynamaktadır (47).

İnsanlarda *reelin* geni bilişsel bozukluklar ile ilişkilidir (8). Bipolar bozukluk, depresyon ve şizofreninin patogeneğinde *reelin*’in rolü olup olmadığı tartışmalıdır. Çalışmalarda, şizofreni ve bipolar bozukluğa sahip hastaların ölüm sonrası beyin dokularında *reelin*’in azaldığı gözlemlenmiştir (45). Ölüm sonrası hipokampal dokularda *reelin* düzeylerinin şizofreni ve bipolar bozukluğun yanı sıra major depresif bozuklukta da azaldığı gösterilmiştir. Bu sonuçlar *reelin*’in depresyon dahil bazı psikiyatrik hastalıkların patojenezinde önemli rolü olduğunu göstermektedir (45). Yapılan nöroanatomik çalışmalarda şizofreni, bipolar bozukluk, otizm ve majör depresyon hastalarının beyinlerinde *reelin* anormallikleri bildirmiştir. Şizofreni hastalarının prefrontal korteks, hipokampus ve serebellumlarında *reelin* mRNA ve protein düzeyleri azalmıştır (47). *Reelin*’in beyinde azalması Alzheimer hastalığı ile de ilişkilidir (51,52).



Şekil 7. *Reelin*'in biyolojik fonksiyonu (Lakatosava S (48)'den uyarlanmıştır).

Reelin yetişkin hipokampuslarında sinaptik gücü ve plastisiteyi etkileyerek işlev gösterir. Yapılan çalışmalar *reelin* sinyalinin sinaptik bütünlüğün sürdürülmesinde ve uzaysal öğrenme görevlerinde önemli rol oynadığını göstermiştir. *Reelin* ekspresyonunun bozulması asosiyatif öğrenme, uzaysal öğrenme ve hipokampal LTP de hatalara sebep olur (3,8,49). Stranahan ve ark. (53) eğitimlerde ve *probe* testte *reelin* sinyalinin azalmasının bozulmuş uzaysal performans ile ilişkili olduğunu göstermiştir (8,53).

Reelin tedavisi hipokampal alanlarda LTP'yi artırır. Beynin ventrikülleri içerisine *reelin*'in ikili uygulamasının ardından hipokampusün CA1 bölgesinde, uzun süreli patansiyalizasyonda ve uzaysal öğrenme-bellek davranışsal testlerinin sonuçlarında hücre içi sinyal aktivasyonunda artış meydana gelmiştir (48).

PROTEİN FOSFATAZ 1

Protein fosforilasyonu, hücrelerde amino asit rezidüsüne kovalent bağlı fosfat grubunun eklenerek bir protein kinaz tarafından fosforile edilmesi ile hızlı, geri dönüşümlü ve aktivite bağımlı gerçekleşen, sinyal iletiminde önemli rol oynayan *post-translasyonel* bir

modifikasyondur. Hayvan hücrelerinin sitoplazmalarında PP1, PP2A, PP2B ve PP2C olmak üzere dört ana protein fosfataz bulunur (54).

Beyinde fazla miktarda bulunan PP1, yaklaşık 38.5 kDa ağırlığında, en iyi karakterize edilmiş serin/treonin fosfatazıdır. Memeli genomlarında bulunan PP1'in N- ve C- uçlarında aminoasit yapısında farklılık gösteren, sitoplazma ve çekirdekte farklı miktarda sentezlenen PP1 α , PP1 β , PP1 γ ve PP1 δ olmak üzere 4 farklı izoformu vardır. PP1 α sitoplazmada, PP1 γ büyük oranda çekirdekte, PP1 β ve PP1 δ ise sitoplazma ve çekirdekte bulunur (1,55). PP1 aktivitesi inhibitör-1(I-1), inhibitör-2 (I-2) ve dopamin ve cAMP düzenleyici fosfoprotein-32 (DARPP-32) gibi çok sayıda düzenleyici protein tarafından kontrol edilir (56). PP1 insülin direnci, mitoz, kas kasılması, transkripsiyon, translasyon ve apoptoz gibi birçok fizyolojik süreçte önemli bir role sahiptir (54-56).

Beyinde eksprese edilen protein fosfatazların arasında *PPI*, bilişsel fonksiyonlar için en önemli olan moleküldür (57). *PPI*, bellek oluşumunu ve hipokampal LTP'yi baskılar (3, 58). Graff ve ark. yaptığı çalışmada hipokampuslerinde *PPI* inhibe edilmiş transgenik fareler kullanılmış ve bu inhibisyonun CA1 ve dentat girus bölgesinde hipokampüse bağlı öğrenmeyi ve LTP'yi geliştirdiği gösterilmiştir. Ayrıca *PPI* inhibisyonunun genlerin regülasyonu ile ilişkili sinaptik plastisite, bellek oluşumu gibi hücrel süreçlerde de rol oynadığı belirtilmiştir (1).

PPI'in hipokampusün CA1 bölgesinde AMPA reseptörlerinin aktivasyonu ile sinaptik kuvveti ve kolaylaştırmayı azaltmak suretiyle uzun süreli depresyon (*long term depression*, LTD)'da rol oynadığı düşünülmektedir (59). Bazı elektrofizyolojik çalışmalar *PPI*'in LTD için gerekli olduğunu göstermiştir. Fare modellerinde yapılan çalışmalarda *PPI*'in LTD ve LTP indüksiyon eşliğini düzenlediği ve *PPI* aktivasyonunun bellek oluşumunu engellediği gösterilmiştir (60).

PPI nöronlarda, iki nöronun aynı anda aktif hale gelmesiyle bağlantının daha fazla güçlendiği *Hebbian* sinaptik plastisitede ve nöronal hücre ölümü gibi kalsiyum bağımlı nöronal süreçlerde önemli rol oynar. *PPI*'in aktivitesinin endojen bir sinyal yolağı tarafından baskılanması LTP indüksiyonu için gereklidir. *PPI* aktivasyonu ayrıca çekirdekte CREB inaktivasyonu için gereklidir. *PPI*, *Hebbian* sinaptik plastisite ve CREB aracılı gen transkripsiyonundaki rolünden dolayı öğrenme ve belleği sınırlar (56).

PPI'in öğrenme ve bellekte rolü transgenik yöntemlerden yararlanılarak da araştırılmıştır (58). Ön beyin nöronlarında bulunan endojen *PPI* inhibitörünün kontrollü ekspresyonu ile oluşturulan *PPI*'in inhibisyonuyla, tekrarlı öğrenme ve *PPI* arasında bir ilişki

olduğu gösterildi. Tekrarlı ğrenme, uzun süreli bellek oluşumu ve depolanması için gereklidir, ancak hipokampüs ve kortikal bölgede *PPI* inhibe edildiğinde, Morris su labirenti ve yeni nesne tanıma testinde optimal performans için daha kısa eğitim süresi gerekmiştir.

ğrenme sırasında ve sonrasında *PPI* inhibe edilmiş yaşlı mutant hayvanlarda bellek korunduğu için *PPI*'in yaşlanma ile ilgili bilişsel bozulmalardan sorumlu olduğu düşünülmektedir. Alzheimer hastalığında, bilişsel gerilemenin yanı sıra uzaysal belleğin de bozulması, Alzheimer hastalığı ve *PPI* arasında bir ilişki olabileceğini göstermektedir (54).

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışma Trakya Üniversitesi Hayvan Denepleri Yerel Etik Kurulu tarafından 31.01.2014 tarih ve 2 no'lu oturumda 2014.02.05 karar no'su ile onaylandı (Ek1). Çalışmamız İyi Laboratuvar Uygulamaları Kılavuzu ve Hayvan Etiği Evrensel İlkelerine uygun olarak gerçekleştirildi. Bu çalışmanın *Turnitin* programına göre orijinallik raporu ektedir (Ek2). Bu çalışma Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından TÜBAP-2014/51 kayıt numarası ile desteklendi.

DENEKLER

Çalışmada ağırlıkları ortalama 250-350 gr arasında değişen, 2-3 aylık, erkek, toplam 35 adet *Sprague-Dawley* sıçan kullanıldı. Deneyde kullanılan sıçanlar, T.Ü. Deney Hayvanları Merkezi'nden temin edildi ve tüm deney boyunca Anabilim Dalımız Hayvan Laboratuvarında standart koşullar altında barındırıldı. Beslenmeleri için standart sıçan yemi ve musluk suyu serbestçe verildi.

DENEY PLANI VE ÇALIŞMA GRUPLARI

Çalışmamızda kullandığımız sıçanlar Trakya Üniversitesi Deney Hayvanları Birimi'nden alındı. Deneyde hayvanlar her grup 5 hayvandan oluşacak şekilde 7 gruba ayrıldı. Deneylere başlamadan bir gün önce tüm hayvanların ağırlıkları tartıldı ve kuyruklarına gruplarına uygun renklere numaraları yazıldı. Gruplar A-G olacak şekilde isimlendirildi.

Deneklerin uzaysal öğrenme ve bellek fonksiyonları Morris su labirentinde değerlendirildi. Tüm gruplarda yüzme eğitimleri sonunda, hipokampus CA1 ve CA3 bölgelerinde *BDNF*, *reelin*, *PPI* ekspresyonlarındaki değişim incelendi. Deney gruplarının tasarımı şöyledir:

GRUP A: (kontrol grubu) hiç yüzdürülmeyen grup, ötanazi yapıp beyin dokusu alındı.

GRUP B: 1 gün eğitim aldı ve eğitimden hemen sonra ötanazi yapıp beyin dokusu alındı.

GRUP C: 2 gün eğitim aldı ve eğitimden hemen sonra ötanazi yapıp beyin dokusu alındı.

GRUP D: 3 gün eğitim aldı ve eğitimden hemen sonra ötanazi yapıp beyin dokusu alındı.

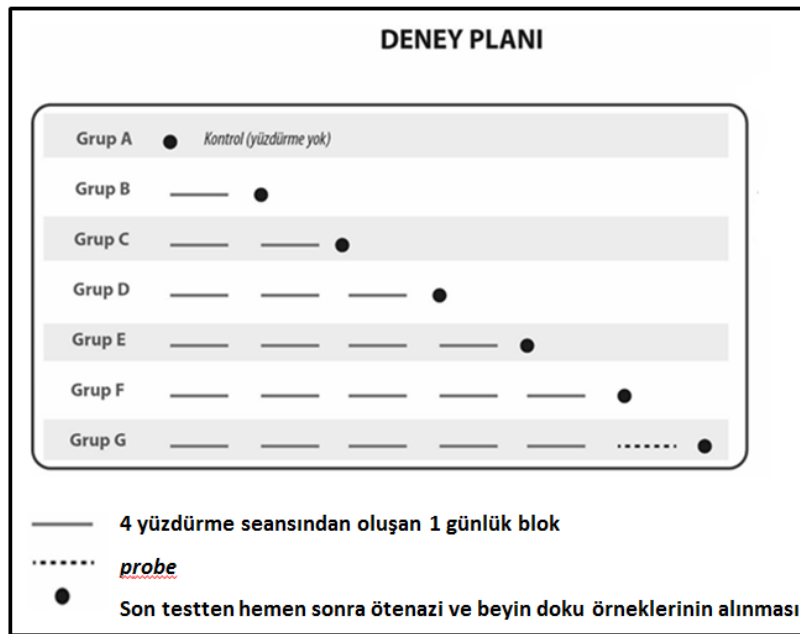
GRUP E: 4 gün eğitim aldı ve eğitimden hemen sonra ötanazi yapıp beyin dokusu alındı.

GRUP F: 5 gün eğitim aldı ve eğitimden hemen sonra ötanazi yapıp beyin dokusu alındı.

GRUP G: 5 gün eğitim aldı, 6. gün *probe* testi yapıldıktan hemen sonra ötanazi yapıp beyin dokusu alındı.

Gruplar Şekil 8’de şematize edilmiştir.

Morris su labirenti testlerinin bitiminden sonra alınan beyin dokularından polimeraz zincir reaksiyonu (*polymerase chain reaction*, PCR) yöntemi ile *BDNF*, *reelin* ve *PPI* gen ekspresyon analizleri yapıldı. Deneklere gruplarına uygun olarak yüzme eğitimlerinden ya da *probe* testinden hemen sonra 600 mg/kg kloral hidrat ile anestezi uygulandı.



Şekil 8. Deney planı

Anestezi derinliği sağlandıktan sonra deney hayvanları sakrifiye edildi. Beyin dokuları hızla çıkarıldı. 60 saniye boyunca -80°C’de bekletilen beyin dokusundan hipokampüsün bulunduğu bölgelere denk gelen kesitler alındı, *punch* yöntemi ile hipokampüs CA1 ve CA3 alanlarından alınan doku örnekleri -150°C’de 120 saniye boyunca bekletildi ve PCR analizleri yapıldı.

MORRİS SU LABİRENTİ ÇALIŞMALARI

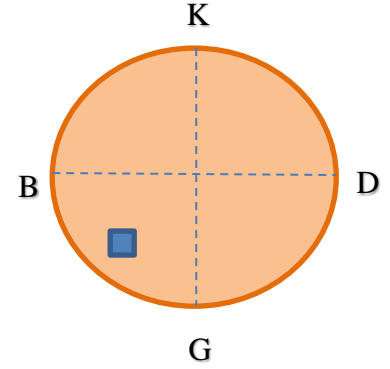
Morris su labirenti; çapı 1,5 metre, derinliği 45 cm olan daire şeklinde bir havuz ve su yüzeyinin 2 cm altında saklı bulunan 10x10 cm boyutunda bir platformdan oluşur. Platform, eğitim yüzdürmelerinin (*trial*) yapıldığı 5 gün boyunca sabit bir yerde tutuldu, bellek testinin (*probe*) yapıldığı 6. gün ise platform havuzdan çıkarıldı. Platformun görülmemesi için siyah boya atılarak su karartıldı. Deney düzeneğinin bulunduğu oda dışarıdan ışık almayacak şekilde düzenlendi ve deney süresince içerisi sabit bir ışık kaynağıyla aynı şiddette aydınlatıldı. Deneyin yapıldığı odanın duvarlarına denekler için ipucu oluşturabilecek farklı şekiller asıldı. Deneyin sürekli aynı ekiple yapılmasına, odada sessiz olunmasına ve denekler için ekstra bir uyarın oluşturmamaya dikkat edildi.

Deneyin eğitim yüzdürmelerinde (*trial*) sıçanlar her gün, günde 4 kez önceden belirlenen farklı yönlerden havuza bırakıldı (Tablo 1). Sıçanlardan 90 saniye içinde saklı platformu bulmaları beklendi. Platformu bulan sıçanların platform üzerinde 15 saniye kalmalarına izin verildi ve su tankının içinden alınıp kurulandıktan sonra kafeslerine geri kondular. Suya bırakılmalarını takiben 90 saniye içinde platformu bulamayan sıçanlara yardım edilerek platformu bulmaları sağlandı ve 15 saniye platform üzerinde kalmalarına izin verildi. Kalıcı belleğin test edildiği *probe* alıŐmaları ise deneyin 6. gününde gerçekleştirildi; bu testte platform su tankından çıkarıldı ve sıçanlar daha önce suya hiç bırakılmadıkları kuzeydoğu yönünden havuza bırakıldılar. Sadece bir kez 60 saniye boyunca yüzdüler.

Tüm yüzme eğitimleri havuzun merkezi hizasında tavana yerleŐtirilen bir video kamera ile bilgisayara aktarıldı ve Ethovision XT 9.0 (Noldus, Hollanda) yazılımı kullanılarak analiz edildi. Platforma erişme süresi, platforma ortalama uzaklık, yüzme hızı, yüzülen toplam yol ve tigmotaksi parametreleri hesaplandı.

Tablo 1. Sıçanların havuza bırakıldıkları yönler

Gün	Eğitim 1	Eğitim 2	Eğitim 3	Eğitim 4
1	K	D	GD	KB
2	GD	K	KB	D
3	KB	GD	D	K
4	D	KB	K	GD
5	K	GD	D	KB
<i>Probe</i>	KD			



K: Kuzey; **D:** Doğu; **G:** Güney; **B:** Batı.

POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU ANALİZLERİ

Polimeraz zincir reaksiyonu, herhangi bir organizmaya ait genomik DNA'da dizisi bilinen herhangi bir bölgenin *in vitro* şartlarda enzimatik olarak çoğaltılmasına olanak veren DNA sentez yöntemi olarak tanımlanmıştır.

PCR, çift iplikli bir DNA molekülünde hedef dizilere uygun oligonükleotid primerlerin bağlanması ve uzaması esasına dayanır. PCR, tekrarlanan 3 basamaktan oluşan bir yöntemdir ve çoğaltılmış DNA miktarı, bu üç adımın tekrarına bağlıdır.

- 1) Denatürasyon (90-95°C): Çoğaltılmak istenen DNA'nın yüksek sıcaklıkta denatüre edilerek tek zincirli hale getirilmesi
- 2) Primer bağlanması (50-70°C): primerlerin hedef bölgeye bağlanması
- 3) DNA sentezi (70-75°C): *Taq* DNA polimeraz enziminin en yüksek aktivite gösterdiği 72°C'de zincirin primerlerden itibaren uzaması.

PCR'nin temel bileşenleri; kalıp olarak kullanılan DNA molekülü, DNA polimeraz enzimi (*Taq* polimeraz), enzim tamponu, primerler, dNTP (dATP, dGTP, dCTP ve dTTP) karışımı ve MgCl₂'dir.

Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (*Real Time-PCR*, RT-PCR)'nda ürünlerin analizi reaksiyon sırasında yapılmaktadır. Bu nedenle, agaroz jel elektroforezi, DNA bantlarının mor ötesi ışık altında görüntülenmesi gibi işlemlerin uygulanmasına gerek kalmamaktadır. RT-PCR ürünlerinin kalitatif ve kantitatif analizlerinde, diziyeye özgün olmayan floresan boyalardan ya da diziyeye özgün problemlerden yararlanılmaktadır. RT-PCR'de nükleik asit çoğaltılmasıyla eş zamanlı olarak artış gösteren floresans sinyalinin ölçülmesiyle, kısa sürede nicel sonuç alınır (61).

Tablo 2. PCR amplifikasyonu için kullanılan gen primer dizileri

GEN	PRİMER	DİZİ
<i>BDNF</i>	F	5'-CCATAAGGACGCGGACTTGTAC-3'
	R	5'-AGACATGTTTGCGGCATCCAGG-3'
<i>Reelin</i>	F	5'-AAACTACAGCGGGTGAACC-3'
	R	5'-ATTTGAGGCATGACGGACCTATAT-3'
<i>PPI</i>	F	5'-CCATGAGTGTGCCAGCATCAA-3'
	R	5'-TGTCAAACTCGCCACAGTA-3'
<i>GAPDH</i>	F	5'-AACGACCCCTTCATTGAC-3'
	R	5'-TCCACGACATACTCAGCAC-3'

F: Forward; **R:** Reverse.

Çalışmamızın PCR ile gen ekspresyonlarının analizi aşaması Trakya Üniversitesi Teknoloji Araştırma Geliştirme Merkezi (TÜTAGEM)'nden hizmet satın alma yoluyla gerçekleştirildi. İlgili gen bölgelerini çoğaltmak için deneyde kullanılan *BDNF*, *reelin* ve *PPI* primerleri ve iç kontrol için kullanılan *GAPDH* (*Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*) daha önce yapılan benzer çalışmalara göre belirlendi (Tablo 2) (62,63). Oransal miktar tayini (*relative quantitation*, RQ) $\Delta\Delta C_t$ metoduna göre yazılım tarafından hesaplandı.

İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Verilerin sunulmasında tanımlayıcı istatistiksel analiz kullanıldı. Beş gün yüzen 10 hayvanın eğitim verilerinin değerlendirilmesinde tek yönlü tekrarlayan analiz (ANOVA) ve *Bonferroni's multiple comparisons* testleri, PCR verilerinin istatistiksel analizleri için ise, tek yönlü analiz (ANOVA) ve *Bonferroni's multiple comparisons* testleri kullanıldı.

Analizler Graphpad Prism 6.0 for Windows kullanılarak yapıldı ve $p < 0,05$ anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Çalışmamızda elde edilen veriler dört ana başlık olarak sunulmuştur. İlk olarak labirentteki yüzme eğitimleri ile öğrenme arasındaki ilişkiyi incelediğimiz sonuçlar verilmiştir. Ardından, Morris su labirentindeki yüzme eğitimleri sırasında hipokampüsün CA1 ve CA3 bölgesinde *BDNF*, *Reelin* ve *PPI* gen ekspresyonlarında meydana gelen değişimlerin incelendiği sonuçlar sırasıyla sunulmuştur.

ÖĞRENME VERİLERİNİN İNCELENMESİ

Ardışık günlerde eğitim yüzmeleri yapılan F ve G gruplarının öğrenme verileri (ilk beş güne ait) incelendiğinde platform alanına erişme süresinde ikinci günden itibaren bir azalma başladığı ($p<0,05$) ve ilerleyen günlerde bu azalmanın daha belirgin olduğu görülmüştür ($p<0,01$) (Şekil 9A).

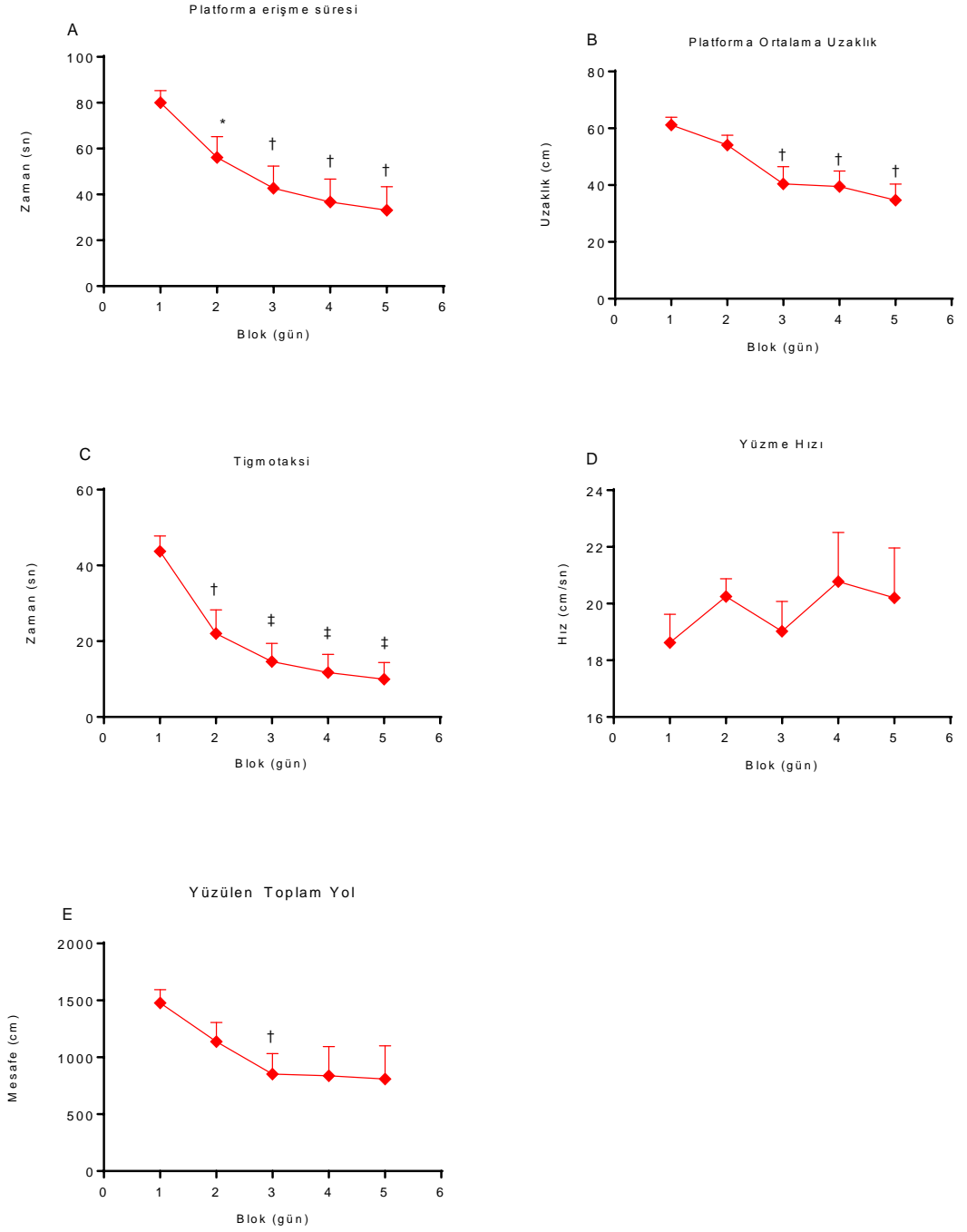
Platform alanına ortalama uzaklıkta ise üçüncü günden itibaren bir azalma başlamış, günlerde bu azalma devam etmiştir ($p<0,01$) (Şekil 9B). Sıçanların platformun yerini daha kısa sürede ve daha az mesafede bulmaları platformun yerini öğrendiklerini göstermektedir.

Sıçanlar yüzme eğitimlerinin ilk gününde platformun havuzdan çıkabilmeleri için bir yol olduğunu öğrenemezler, havuzdan kaçabilmek için bir yer arar ve havuzun kenarına yakın yüzerler. Havuzun kenarına 10 cm'lik uzaklıktaki alan *perimetre* olarak tanımlanır ve sıçanın bu bölgede yüzmesi *thigmotaxis* (tigmotaksi) olarak adlandırılır (25).

Tigmotaksi sürelerinde ikinci günden itibaren bir azalma görülmektedir ($p<0,01$) ve bu azalma üçüncü günden itibaren artmaktadır ($p<0,001$) (Şekil 9C). Bu azalma hayvanın içinde bulunduğu sorunu çözdüğü ve platformun havuzdan çıkmak için bir yol olduğunu anladığını göstermektedir.

Deney süresince sıçanların yüzme hızları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik olmamıştır (Şekil 9D). Yüzme hızında değişiklik olmaması, diğer verilerde elde edilen değişimlerin yüzme hızında meydana gelen herhangi bir değişime bağlı olmadığını gösterir.

Sıçanların yüzdükleri toplam yolda üçüncü günden itibaren bir azalma görülmektedir ($p<0,01$) (Şekil 9E). Bu da, sıçanların platformun yerini öğrendiklerini ve giderek daha az mesafe yüzerek platform alanına ulaştıklarını göstermektedir.



Şekil 9. Beş gün yüzen 10 hayvannın (F ve G grupları) öğrenme verileri:

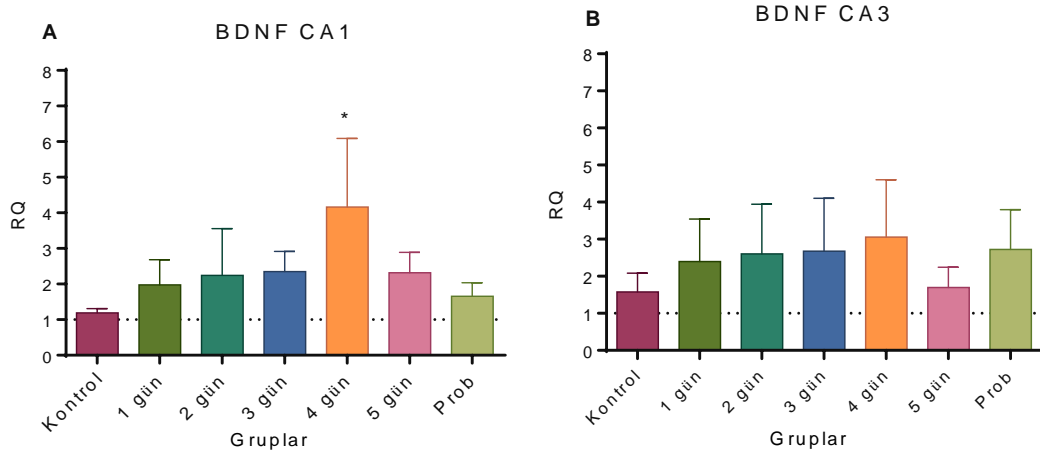
A- Platforma erişme süresi, B- Platforma ortalama uzaklık,

C-Tigmotaksi, D- Yüzme hızı, E- Yüzülen toplam yol.

(*:p<0,05, †:p<0,01, ‡: p<0,001, birinci gün değerine karşı. Tek yönlü tekrarlayan analiz ANOVA, *post hoc Bonferroni*. Grafiklerdeki dikey çizgiler standart hatayı göstermektedir.)

BDNF GEN EKSPRESYONLARINDA MEYDANA GELEN DEĞİŞİMLER

Eğitim almayan kontrol grubunun (Grup A) ve 5 gün boyunca yüzdürülen B-F, 6. gün *probe* testi uygulanan G gruplarının hipokampus CA1 ve CA3 alanlarının *BDNF* gen ekspresyonlarında meydana gelen değişimler Şekil 10'da gösterilmiştir. CA1 bölgesinden alınan doku örnekleri incelendiğinde eğitim almayan kontrol grubu ile dört gün eğitim alan grubun verileri karşılaştırıldığında eğitim alan grupta *BDNF* gen ekspresyonu belirgin derecede ($p<0,01$) artmıştır, ancak diğer artışlar istatistiksel anlamlılığa erişmemiştir (Şekil 10A). Bu veriler, *BDNF*'nin hipokampus aracılı öğrenme ve bellek sürecinden sorumlu olduğunu göstermektedir. Deney süresince sıçanların CA3 bölgelerindeki *BDNF* gen ekspresyonları değerlendirildiğinde *BDNF* ekspresyon düzeylerinde artış görülmektedir, ancak bu istatistiksel anlamlı boyuta erişmemiştir (Şekil 10B).



Şekil 10. *BDNF* ekspresyonunda meydana gelen değişimler: A-CA1 bölgesi

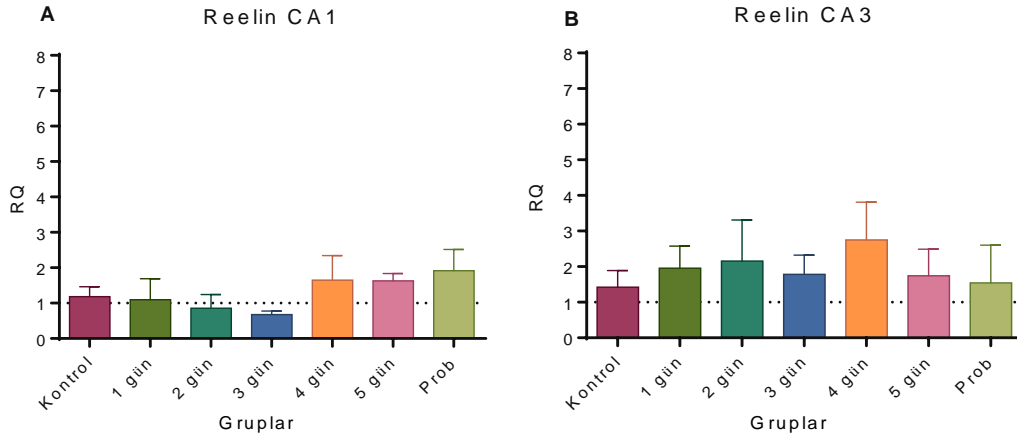
B-CA3 bölgesi.

(*: $p<0,01$ kontrol grubuna karşı. Her grup için $n=5$, tek yönlü analiz ANOVA, *post hoc Bonferroni*. Grafiklerdeki dikey çizgiler standart hatayı göstermektedir.)

REELİN GEN EKSPRESYONLARINDA MEYDANA GELEN DEĞİŞİMLER

Hiçbir eğitim almayan kontrol grubunun (Grup A) ve 5 gün boyunca yüzdürülen B-F, 6. gün *probe* testi uygulanan G gruplarının hipokampus CA1 ve CA3 alanlarının *reelin* gen ekspresyonlarında meydana gelen değişimler Şekil 11’de gösterilmiştir. CA1 bölgesinden alınan doku örneklerinin verileri incelendiğinde kontrol grubuna oranla iki ve üç gün eğitim alan grupların *reelin* gen ekspresyon düzeylerinde azalma; dört ve beş gün eğitim alan grupların ve altıncı günde *probe* testi yapılan grubun *reelin* gen ekspresyonlarında ise artış görülmektedir, ancak bu azalma ve artış kontrol grubuna oranla hiçbir grupta istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Şekil 11A).

CA3 bölgesindeki *reelin* gen ekspresyonları değerlendirildiğinde ise, grupların *reelin* ekspresyon düzeylerinde kontrol grubuna oranla artış görülmektedir, ancak bu artış hiçbir grupta istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Şekil 11B).



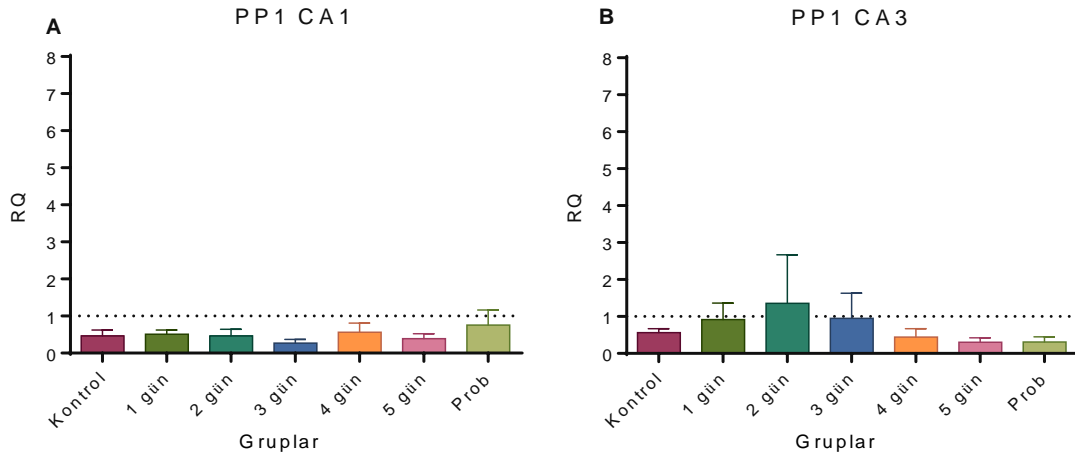
Şekil 11. *Reelin* ekspresyonunda meydana gelen değişimler: A-CA1 bölgesi, B-CA3 bölgesi.

(Her grup için n=5, tek yönlü analiz ANOVA, *post hoc Bonferroni*. Grafiklerdeki dikey çizgiler standart hatayı göstermektedir.)

PP1 GEN EKSPRESYONLARINDA MEYDANA GELEN DEĞİŞİMLER

Hiçbir eğitim almayan kontrol grubunun (Grup A) ve 5 gün boyunca yüzdürülen B-F, 6. gün *probe* testi uygulanan G gruplarının hipokampus CA1 ve CA3 alanlarının PP1 gen ekspresyonlarında meydana gelen değişimler Şekil 12’de gösterilmiştir. CA1 bölgesinden alınan doku örnekleri incelendiğinde grupların *PP1* ekspresyon düzeylerinde kontrol grubuna oranla istatistiksel herhangi bir değişiklik saptanmamıştır. (Şekil 12A).

CA3 bölgelerindeki *PP1* gen ekspresyonları değerlendirildiğinde ise, grupların *PP1* ekspresyon düzeylerinde kontrol grubuna oranla bir, iki ve üç gün eğitim alan gruplarda artma, diğer gruplarda ise azalma görülmektedir ancak bu veriler hiçbir grupta istatistiksel anlamlılığa ulaşmamıştır (Şekil 12B).



Şekil 12. PP1 ekspresyonunda meydana gelen değişimler: A-CA1 bölgesi, B-CA3 bölgesi.

(Her grup için n=5, tek yönlü analiz ANOVA, *post hoc Bonferroni*. Grafiklerdeki dikey çizgiler standart hatayı göstermektedir.)

TARTIŞMA

Öğrenme ve bellek beynin en önemli kognitif fonksiyonlarından ve oluşumunun altında yatan karmaşık fizyolojik süreç hala tam olarak aydınlatılamamıştır. Hipokampusun uzaysal öğrenme ve bellek oluşumuyla ilgili bir yapı olduğu daha önce birçok çalışmada gösterilmiştir (1-3). Biz çalışmamızda sinaptik plastisite, öğrenme ve bellek gelişiminde rol oynadığı bilinen *BDNF*, *reelin*, *PPI* genlerinin ekspresyonlarında hipokampus CA1 ve CA3 bölgelerinde ardışık günlerde meydana gelen değişimi inceledik.

Çalışmamızın davranış bölümünde, deneklerin uzaysal öğrenme ve bellek testlerinin en önemlilerinden biri olan Morris su labirenti ile eğitimlerinde saklı platformun yerini öğrenmeleri hedeflenmiştir. Uzaysal öğrenme ve belleğin test edildiği birçok çalışmada Morris su labirenti tercih edilmiştir (9). Çünkü eğitimler sonucunda su labirentinde elde edilen davranış değişikliğinin diğer labirentler ile kıyaslandığında daha hızlı olduğu gösterilmiştir. Morris su labirentinde hayvanları önceden aç veya susuz bırakmak gerekmez. Su labirentinin en büyük avantajlarından bir diğeri ise hayvanların koku duyusunu kullanarak yön bulmasını ortadan kaldırmasıdır. Ayrıca kemirgenler doğal yüzücülerdir (5,24,64). Bu nedenle çalışmamızda yer bulma öğrenmesinin test edilmesinde Morris su labirenti kullanılmıştır.

Morris su labirenti testinde öğrenmenin en önemli göstergelerinden olan platforma erişme süresi ve platforma ortalama uzaklık verileri açısından değerlendirildiğinde platform alanına erişme süresinde ikinci günden itibaren başlayan azalma, eğitimin ilerleyen günlerinde daha belirgin hale gelmiştir. Platforma ortalama uzaklıkta ise, üçüncü günden itibaren bir azalma başlaması bize sığınların platformun yerini öğrendiğini ve daha az mesafe yüzerek

platform alanına ulaştıklarını göstermektedir. Tigmotaksi sürelerinde ise ikinci günden itibaren bir azalma görülmekte ve bu azalma üçüncü günden itibaren artmaktadır. Bu bize, hayvanın içinde bulunduğu sorunu çözdüğü ve platformun havuzdan çıkmak için bir yol olduğunu anladığını göstermektedir. Deney süresince sıçanların yüzme hızları değerlendirildiğinde, yüzme hızları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik olmamıştır. Bu da bize, diğer verilerde elde edilen değişimlerin yüzme hızında meydana gelen herhangi bir değişime bağlı olmadığını göstermektedir. Morris su labirentinde elde ettiğimiz sonuçlar, beklendiği gibi, literatür verilerine benzerlik göstermektedir.

Tez çalışmamızın ikinci basamağında alınan beyin dokularından PCR yöntemi ile *BDNF*, *reelin* ve *PPI* gen ekspresyon analizleri yapılarak ardışık günlerde öğrenme sürecinde hipokampüsün CA1 ve CA3 bölgelerinde meydana gelen değişikliklerin incelenmesi hedeflenmiştir. Miller ve Sweatt (3) kavramsal korku koşullama modeli ile erkek, *Sprague-Dawley* sıçanlar üzerinde yaptıkları bir çalışmada *reelin* ve *PPI* ekspresyonlarını CA1 bölgesi üzerinde incelemişlerdir. Bunun için sıçanlar eğitimlerden 1 saat sonra sakrifiye edilmiş ve CA1 bölgesinden alınan doku -80°C’de muhafaza edilmiştir. Biz de bu çalışmayı da göz önüne alarak, çalışmamızda deney hayvanlarını Morris su labirenti eğitimlerinden sonra ortalama 1 saat içinde sakrifiye edip beyin dokularını aldık.

BDNF’nin LTP, bellek oluşumu ve depolanması için gerekli olan sinaptik plastisite ve nöronal farklılaşma gibi aktivite bağımlı nöronal modifikasyonlarda rol oynadığı bilinmektedir (7,32,42). *BDNF* ayrıca hücre ölümünün düzenlenmesinde, serebral kortekste dentritlerin büyümesinde de hayati öneme sahiptir (41,65).

Sinaptik plastisiteyi düzenleyerek bellek oluşumunda ve depolanmasında rol oynayan *BDNF* mRNA ve protein düzeyinin Alzheimer hastalığı olan beyinlerde azaldığına dair literatür bilgileri yer almaktadır (33,35). Öğrenme ve bellek sürecinde *BDNF* ekspresyonunda meydana gelen değişimin anlaşılmasının Alzheimer hastalığının da patofizyolojisini aydınlayabileceğini düşünmekteyiz.

BDNF, en fazla hipokampus, amigdala ve dentat girus bölgesinde olmak üzere beyin her yerinde yüksek oranda eksprese edilir (32,33,37). Hipokampüsün CA1 bölgesinde bulunan sinapslarda *BDNF*’nin LTP’yi kolaylaştırdığı gösterilmiştir. Hipokampal alanlarda *BDNF*’nin geç-LTP ve uzun dönem bellek gibi uzun dönem sinaptik etkilerinin cAMP ve yeni protein sentezine bağlı olduğu görülmüştür. Tetanik stimülasyon ile oluşturulan LTP’de, *BDNF* mRNA seviyesinin belirgin bir artış gösterdiği çalışmalarda belirtilmiştir (38). *BDNF* ekspresyonu doku kültürlerinde elektriksel aktivite ile artarken, hayvanlarda fiziksel egzersiz, yeni çevre, bilişsel öğrenme eğitimleri ile artar (32,36,42). Park ve ark. (42) yaşlı (20

haftalık), erkek, C57BL/6 farelerde Morris su labirentinde bilişsel işlevlerle ilişkili kortikal gen ekspresyonlarının aktivasyonlarını incelemişlerdir. Bu çalışmada, gen transkripsiyonu için, labirentte öğrenme eğitimleri alan, sadece yüzen ve hiçbir eğitim ya da egzersiz uygulanmayan kontrol grubu deneklerin beyin dokuları incelenmiştir. *BDNF* gen ekspresyonunun öğrenme eğitimi alan grupta sadece yüzen gruba göre daha fazla arttığı görülmüştür.

Bu bulgular, *BDNF* ekspresyonunun öğrenme ve bellek ile ilişkisini incelemek için araştırmacılara öncülük etmiştir. Biz de çalışmamıza başlarken daha önce yapılan çalışmalar doğrultusunda deney hayvanlarının öğrenme grafiklerine paralel bir *BDNF* gen ekspresyon grafiği elde edebileceğimizi öngörerek hipokampüsün CA1 ve CA3 bölgelerinde öğrenme arttıkça *BDNF* gen ekspresyonlarında da artışı bekledik. Kontrol grubu ile eğitim alan gruplar karşılaştırıldığında, hem CA1 bölgesinde hem de CA3 bölgesinde ardışık günlerde öngördüğümüz gibi artış gördük, ancak bu artış sadece CA1 bölgesi ölçümlerinde 4 gün eğitim alan grupta istatistiksel anlamlılığa erişti ($p < 0,01$).

Stres dentat girus ve hipokampüsün CA1 ve CA3 bölgelerinde *BDNF* ekspresyonunu azaltır (37,44). Smith ve ark. (66) immobilizasyon yöntemi ile akut ve kronik strese maruz bırakılmış *Sprague-Dawley* erkek sıçanların özellikle dentat girus olmak üzere hipokampüs CA1 ve CA3 bölgelerinde *BDNF* ekspresyonunun belirgin derecede azaldığını göstermiştir. Çalışmamızda CA3 bölgesinden aldığımız doku örneklerinde incelenen *BDNF* gen ekspresyonlarının istatistiksel anlamlılığa erişememesi bize hayvanların stres faktörlerine maruz kalmış olabileceğini düşündürmektedir. Sharma ve ark. (24) kemirgenlerin doğal yüzücüler olmalarına rağmen suyun hayvanlarda stres oluşturabileceğini ve Morris su labirentinde yüzmenin bilişsel fonksiyonları etkileyebilecek nörokimyasal değişikliklere sebep olabileceğini belirtmiştir.

Reelin, sinaptik plastisiteyi artırıcı bir etkiye sahiptir; bunu sinaptogenezi kolaylaştırarak ve sinaptik bağlantıların stabilizasyonunu sağlayarak yapar. Ayrıca *reelin* hipokampüsteki hücre migrasyonunu ve entegrasyonunu artırarak da nöronal plastisitenin düzenlenmesinde rol oynar (8,45-48). *Reelin* eksprese eden hücreler dentat girusun yanı sıra hipokampüsün CA1 ve CA3 bölgelerine de yerleşmiştir (49,50).

Roger ve ark. (67) *wild* tip farelerle yaptıkları bir çalışmada hipokampüsün lateral ventriküllerine kanül yardımıyla tek doz *reelin* enjeksiyonunun saklı platform su labirentinde uzaysal öğrenmeyi artırdığını göstermişlerdir. Farelere ilk dört gün boyunca günde 4 kez yüzme eğitimleri verilmiştir, 5. gün platform havuzdan çıkarılarak 60 sn boyunca *probe* testi

yaparak hedef kadranda geçirdikleri süre değerlendirilmiştir. Altıncı ve yedinci günlerde ise platform farklı bir kadrana yerleştirilmiş, 8. gün ise tekrar *probe* test yapılmıştır.

Literatür bilgilerinde *reelin* sinyalinin sinaptik bütünlüğün sürdürülmesinde ve uzaysal öğrenme görevlerinde önemli rol oynadığını belirtilmiştir. *Reelin* ekspresyonunun bozulması asosiyatif öğrenme, uzaysal öğrenme ve hipokampal LTP’de hatalara sebep olur (3, 8, 49).

Weeber ve ark. (68) *reelin* reseptörleri olan VLDL ve ApoER2 reseptörleri silinmiş fareler kullanarak kavramsal korku koşullanma modeli ile yaptıkları bir çalışmada *reelin* ve reseptörlerinin sinaptik plastisiteyi düzenleyerek hipokampal öğrenmeye katkı sağladığını göstermiştir.

Stranahan ve ark. (53) genç ve yaşlı sıçanlar ile uzaysal belleğin test edildiği Morris su labirentini kullanarak yaptıkları çalışmada, yaşlı sıçanlarda eğitimlerde ve *probe* testte *reelin* sinyalinin azalmasının bozulmuş uzaysal performans ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Biz de çalışmamızda ilerleyen yaşın sıçanlarda uzaysal performansı etkileyeceğini düşünerek 2-3 aylık sıçanlar kullandık.

Yin ve ark. (8) yaptığı bir çalışmada sekiz haftalık 10 erkek ve 10 dişi fareden doğan 8 yavru fareyi 4 dişi 4 erkek olmak üzere ayırmış ve erkek fareleri ise egzersiz yapan grup ve egzersiz yapmayan (kontrol) grup olmak üzere ikiye ayırmıştır. Daha sonra egzersiz yapan grubun yavrularının ve kontrol grubunun yavrularının uzaysal bellekleri Morris su labirenti ile değerlendirilmiştir. Egzersiz yapan farelerin yavrularının hipokampuslerinde *BDNF* ve *reelin* düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede arttığı belirtilmiştir.

Öğrenme ve bellek süreci ile ilişkili olduğu düşünülen *BDNF*, *reelin* ve *PPI* genleri ile ilgili daha önce yapılan çalışmalarda bu genlerin değişimi eğitimlerin sonunda incelenmiştir. Bu bağlamda ilk çalışma özelliği göstermektedir.

Bu sonuçlardan yola çıkarak çalışmamızda günler içerisinde öğrenme arttıkça sinaptik bağlantılar daha çok güçleneceği için, *reelin* ekspresyonunun da öğrenme ile doğru orantılı şekilde artacağını düşündük. CA1 bölgesinde kontrol grubuna oranla iki ve üç gün eğitim alan grupların *reelin* gen ekspresyon düzeylerinde azalma, diğer günlerde ise artış gözlemledik, ancak bu değişimler de istatistiksel anlamlılığa erişmedi. Öğrenme ve bellek sürecinde daha çok rol oynadığı bilinen CA3 bölgesinde ise, *reelin* ekspresyonunda birinci günden itibaren kontrol grubuna göre bir artış gördük, ancak bu artışlar da istatistiksel anlamlılığa erişmedi. Sadece bir gün eğitim alan grubun CA1 bölgesinden alınan doku örneklerinde değişim olmamıştır, ancak ikinci ve üçüncü günlerde meydana gelen azalma çalışmamızda öngöremediğimiz bir durumdur. CA3 bölgesinde meydana gelen değişimlerin kontrol grubuna

göre artma eğiliminde olması sıçanların öğrenme sürecinde sinaptik bağlantıların güçlenmesinden dolayı beklediğimiz gibi olmuştur.

Beyinde eksprese edilen protein fosfatazlar arasında bilişsel fonksiyonlar için en önemli olan molekül olan *PPI*'in bellek oluşumunu ve hipokampal LTP'yi baskıladığı bilinmektedir (3,58). Ön beyin nöronlarında bulunan endojen *PPI* inhibitörünün kontrollü ekspresyonu ile oluşturulan *PPI*'in inhibisyonu Morris su labirenti ve yeni nesne tanıma testinde optimal performans için daha kısa eğitim süresi gerektiği belirtilmiştir (54). Fare modellerinde yapılan çalışmalarda *PPI*'in LTD ve LTP indüksiyon eşiğini düzenlediğini ve *PPI*'in aktivasyonunun bellek oluşumunu engellediği gösterilmiştir (60).

Koshibu ve ark. (58) tarafından PP1 inhibitör fragmenti taşıyan transgenik farelerde, PP1 inhibisyonunun etkisini incelemek için yapılan bir çalışmada bağlamsal ve ses koşullaması modellerinde 10. dakika ve 24. saatte ölçümler yapılmıştır. 24 saat sonra hem bağlamsal korku koşullamada hem de sesle korku koşullamada alınan donma yanıtında artış olmuştur. Mauna ve ark. (69) ise PP1'in yetişkin, erkek, *Sprague-Dawley* sıçanların hipokampusünün CA1 bölgesinde elektrofizyolojik metotlar kullanarak yaptıkları çalışmalarında uzun süreli depresyonda önemli rol oynadığını belirtmişlerdir. Graff ve ark. (1) ise, hipokampuslerinde *PPI* inhibe edilmiş transgenik fareler kullanmış ve bu inhibisyonun CA1 ve dentat girus bölgesinde hipokampüse bağlı öğrenmeyi ve LTP'yi artırdığı göstermiştir.

Daha önce yapılan çalışmalar ve literatür taramaları bize *PPI*'in ön beyinde, bellek ve sinaptik plastisite düzenlenmesinde negatif etki yaptığını göstermektedir (3,58). Biz de çalışmamızda bu bilgilerden yola çıkarak, hipokampus CA1 ve CA3 bölgelerinde *PPI* ekspresyonunun değişiminde öğrenme ile ters orantılı bir değişim bekledik. CA3 bölgesinden alınan dokular incelendiğinde *PPI* ekspresyonu öğrenme eğitimlerinin ilk üç gününde kontrol grubuna göre bir artış göstermiştir. Ancak öğrenmenin arttığı 4 ve 5 gün eğitim alan grupların verileri incelendiğinde ise PP1 ekspresyonlarında literatür verileri doğrultusunda bizim de beklediğimiz gibi bir azalma meydana gelmiştir.

Yapılan tüm bu çalışmalara ve kendi çalışmamıza dayanarak *BDNF*, *reelin* ve *PPI* genlerinin moleküler ve hücresel mekanizmaları hala tam olarak aydınlatılamayan öğrenme ve bellek sürecinde önemli rol oynadığı söylenebilir. Çalışmamızın DNA metilasyon çalışmalarına öncülük edebileceğini düşünmekteyiz.

SONUÇLAR

Öğrenme ve bellek oluşumunun moleküler mekanizmasını aydınlatmak için yapılan çalışmalar hızla devam etmektedir. Bugünkü bilgilere dayanarak gen ekspresyonunun öğrenme ve bellek sürecinde önemli rol oynadığı bilinmektedir. Özellikle çeşitli genlerin bellek oluşumunu indüklediği ya da inhibe ettiği düşünülmektedir.

Çalışmamızın ilk bölümünde deneklerin Morris su labirentindeki uzaysal öğrenme ve bellek fonksiyonlarını değerlendirdik.

Çalışmamızın ikinci bölümünde ise eğitimleri tamamlanan grupların beyin dokularında hipokampus CA1 ve CA3 alanlarından doku örnekleri alarak *BDNF*, *reelin* ve *PPI* genlerinin PCR analizlerini yaptık.

Elde ettiğimiz sonuçlar *BDNF*'nin öğrenme ve bellek sürecinde birinci günden itibaren rolünün olduğunu düşündürmektedir.

Öğrenme ve bellek sürecindeki mekanizmaların daha iyi aydınlatılması için çok sayıda çalışmaya gereksinim vardır.

ÖZET

Hipokampüs uzaysal öğrenme ve bellek oluşumuyla ilgili bir merkezdir. Çeşitli genlerin bellek oluşumunu indüklediği veya inhibe ettiği düşünülmektedir. Çalışmamızda sıçanlarda uzaysal öğrenme ve bellek gelişiminde hipokampüste *BDNF*, *reelin*, *PPI* genlerinin ekspresyonlarında meydana gelen günlük değişim incelenmesi amaçlanmıştır. Her birinde 5 erişkin erkek sıçan bulunan gruplar uzaysal öğrenme ve bellek eğitimi için her gün 4 kez olmak üzere 5 gün süreyle eğitilmiştir. Altıncı gün platform çıkarılmış ve bellek performansları incelenmiştir. Eğitimlerin tamamlanmasından sonra, ötanazi uygulanarak beyin dokuları çıkarılmıştır. Hipokampüs CA1 ve CA3 alanlarından alınan doku örneklerinde polimeraz zincir reaksiyonu analizleri yapılmıştır. Sonuçlarımızda, CA1 bölgesinde dördüncü günde *BDNF* ekspresyonunun kontrole göre istatistiksel anlamlı derecede ($p<0,01$) arttığını göstermiştir. Her iki bölgeden alınan doku örneklerinde *reelin* ve *PPI* ekspresyonlarındaki değişimler ise istatistiksel anlamlılığa erişmemiştir. Sonuçlarımız *BDNF*'nin uzaysal öğrenme ve bellek sürecinde birinci günden itibaren rolünün olduğunu düşündürmektedir.

Anahtar kelimeler: *BDNF*, *reelin*, *PPI*, uzaysal öğrenme, bellek

DETERMINATION OF THE CHANGES IN *PP1*, *BDNF* AND *REELIN* GENE EXPRESSION ON SPATIAL LEARNING AND MEMORY IN THE MORRIS WATER MAZE IN RAT HIPPOCAMPUS

SUMMARY

Hippocampus is a center related to spatial learning and memory formation. It has been thought that several genetic changes occur in the hippocampus in the process of learning and memory formation. In this study, it is aimed to investigate activity changes of *PP1*, *BDNF*, *reelin* genes in hippocampus during learning and memory formation after successive trainings in rats. The groups of animals [n=5] were given 4 trials per day for 5 consecutive days to locate a hidden platform. On the sixth day the platform was removed and the animals were swum. Learning and memory functions of the animals were evaluated based on their performances in these tests. After memory tests, the rats that completed training were euthanized and their brain tissues were removed. Tissue samples were taken at hippocampal CA1 and CA3 zones. *PP1*, *BDNF* and *Reelin* gene expressions in the taken tissue samples were analyzed by polymerase chain reaction. Our results show that in the CA1 region, *BDNF* gene expression increased in a statistically significant degree ($p < 0,01$) on the fourth day. In tissue samples taken from both regions, there were no statistically significant differences in *reelin* and *PP1* gene expressions. Our results suggest that *BDNF* has a role in spatial learning and memory processes starting from the first day.

Keywords: *BDNF*, *reelin*, *PP1*, spatial learning, memory

KAYNAKLAR

1. Graff J, Koshibu K, Jouvenceau A, Dutar P, Mansuy IM. Protein phosphatase 1-dependent transcriptional programs for long-term memory and plasticity. *Learn Mem* 2010;17(7):355-63.
2. Sweatt JD. Hippocampal function in cognition. *Psychopharmacology* 2004;174(1):99-110.
3. Miller CA, Sweatt JD. Covalent modification of DNA regulates memory formation. *Neuron* 2007;53(6):857-69.
4. Cardin JA, Abel T. Memory suppressor genes: enhancing the relationship between synaptic plasticity and memory storage. *J Neurosci Res* 1999;58(1):10–23.
5. Puzzo D, Lee L, Palmeri A, Calabrese G, Arancio O. Behavioral assays with mouse models of Alzheimer's disease: practical considerations and guidelines. *Biochem Pharmacol* 2014;88(4):450-67.
6. Schimanski LA, Nguyen PV. Multidisciplinary approaches for investigating the mechanisms of hippocampus-dependent memory: a focus on inbred mouse strains. *Neurosci Biobehav Rev* 2004;28(5):463-83.
7. Dincheva I, Glatt CE, Lee FS. Impact of the BDNF Val66Met polymorphism on cognition: implications for behavioral genetics. *Neuroscientist* 2012;18(5):439-51.
8. Yin MM, Wang W, Sun J, Liu S, Liu XL, Niu YM, et al. Paternal treadmill exercise enhances spatial learning and memory related to hippocampus among male offspring. *Behav Brain Res* 2013;253:297-304.

9. Lynch MA. Long-Term Potentiation and Memory. *Physiol Rev* 2004;84:87-136.
10. Schacter DL, Wagner AD. Learning and Memory. In: Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, Siegelbaum SA, Hudspeth AJ (Eds) *Principles of Neural Science*. 5th ed Newyork:The McGraw-Hill Companies; 2013. p.1441-60.
11. Consciousness the Brain and Behavior. In: Widmaier EP, Raff H, Strang KT (Eds) *Vander's Human Physiology: The Mechanisms of Body Function*. 11 th ed Mc Graw-Hill Co, 2007. p.232-53.
12. Özen Erberk N, Rezaki M, Prefrontal korteks: bellek İşlevi ve bunama ile ilişkisi. *Türk Psikiyatri Derg* 2007;18(3):262-9.
13. Guyton HC, Hall CE. Tıbbi Fizyoloji. Çavuşoğlu H, Çağlayan Yeğen B (Editörler). *Beyin Korteksi, Beyin Zihinsel İşlevleri, Öğrenme ve Bellek*. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevi; 2007. s.714-727.
14. Siegelbaum SA, Kandel ER. Prefrontal Cortex, Hippocampus, and the Biology of Explicit Memory Storage. In: Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, Siegelbaum SA, Hudspeth AJ.(Eds) *Principles of Neural Science*.5th ed Newyork:The McGraw-Hill Companies; 2013. p.1487-519.
15. Sweatt DJ. The Basics of Psychological Learning and Memory Theory. In: Sweatt DJ (Eds.). *Mechanism of Memory*.2th ed. Slovenia: Elsevier; 2010. p.2-23.
16. Schacter DL, Wagner AD, Celluler Mechanisms of Implicit Memory Storage and the Biological Basis of Individuality. In: Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, Siegelbaum SA, Hudspeth AJ (Eds.). *Principles of Neural Science*.5th ed Newyork:The McGraw-Hill Companies; 2013. p.1461-85.
17. Badre D, Wagner AD. Left ventrolateral prefrontal cortex and the cognitive control of memory. *Neuropsychologia* 2007;45(13):2883-901.
18. Maril A, Wagner AD, Schacter DL. On the tip of the tongue: an event-related fMRI study of semantic retrieval failure and cognitive conflict. *Neuron* 2001;31:653–60.
19. RD Hawkins, N Lalevic, GA Clark, ER Kandel. Classical conditioning of the Aplysia siphon-withdrawal reflex exhibits response specificity. *Neurobiology* 1989;86:7620-24.
20. Andersen P, Morris R, Amaral D, Bliss T, O'Keefe J, The Hippocampal Formation. In: Andersen P, Morris R, Amaral D, Bliss T, O'Keefe J (Eds). *The Hippocampus Book* Newyork:Oxford University Press, Inc 2007. p.3-8.

21. Amaral D, Lavenex P, The Hippocampal Neuroanatomy. In: Andersen P, Morris R, Amaral D, Bliss T, O'Keefe J (Eds.). *The Hippocampus Book* Newyork:Oxford University Press, Inc 2007. p.114-41.
22. Songur A, Özen OA, Sarsılmaz M. Hipokampus. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 2001;21:427-31.
23. Sweatt DJ. *Studies of Human Learning and Memory*. In: Sweatt DJ (Eds.). *Mechanism of Memory*. 2th ed. Slovenia: Elsevier; 2010. p.25-47.
24. Sharma S, Rakoczy S, Brown-Borg H. Assessment of spatial memory in mice. *Life Sci* 2010;87(17-18):521-36.
25. D'Hooge R, Deyn PD. Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Res Rev* 2001;36:60–90.
26. Fischer W, Sirevaag A, Wiegand SJ, Lindsay RM, Björklund A. Reversal of spatial memory impairments in aged rats by nevre growth factor and neurotrophins 3 and 4/5 but not by brain-derived neurotrophic factor. *Proc Natl Acad Sci* 1994;91:8607-11.
27. Tuzcu M, Baydas G. Effect of melatonin and vitamin E on diabetes-induced learning and memory impairment in rats. *Euro J Pharmacol* 2006;537:106–10.
28. Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods* 1984;11:47-60.
29. Myhrer T. Neurotransmitter systems involved in learning and memory in the rat: a meta-analysis based on studies of four behavioral tasks. *Brain Res Rev* 2003;41(2-3):268-87.
30. Amaral MD, Chapleau CA, Pozzo-Miller L. Transient receptor potential channels as novel effectors of brain-derived neurotrophic factor signaling: potential implications for Rett syndrome. *Pharmacol Ther* 2007;113(2):394-409.
31. Andero R, Ressler KJ. Fear extinction and BDNF: translating animal models of PTSD to the clinic. *Genes Brain Behavior* 2012;11(5):503-12.
32. Binder DK, Scharfman HE. Brain-derived neurotrophic factor. *Growth Factors* 2004; 22(3):123–31.
33. Tapia-Arancibia L, Rage F, Givalois L, Arancibia S. Physiology of BDNF: focus on hypothalamic function. *Front Neuroendocrinol* 2004;25(2):77-107.
34. Kaplan DR, Miller FD. Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol* 2000;10(3):381-91.

35. Schindowski K, Belarbi K, Buee L. Neurotrophic factors in Alzheimer's disease: role of axonal transport. *Genes Brain Behav* 2008;7(1):43-56.
36. Zheng F, Zhou X, Moon C, Wang H. Regulation of brain-derived neurotrophic factor expression in neurons. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol* 2012;4:188-200.
37. Gray JD, Milner TA, McEwen BS. Dynamic plasticity: the role of glucocorticoids, brain-derived neurotrophic factor and other trophic factors. *Neuroscience* 2013;239:214-27.
38. Lu B. BDNF and activity-dependent synaptic modulation. *Learn Mem* 2003;10(2):86-98.
39. Nair A, Vadodaria KC, Banerjee SB, Benekareddy M, Dias BG, Duman RS, et al. Stressor-specific regulation of distinct brain-derived neurotrophic factor transcripts and cyclic AMP response element-binding protein expression in the postnatal and adult rat hippocampus. *Neuropsychopharmacology* 2007;32(7):1504-19.
40. Martínez-Levy G, Cruz-Fuentes CS. Genetic and epigenetic regulation of the brain-derived neurotrophic factor in the central nervous system. *Yale J Bio Med* 2014;87:173-86.
41. Garoflos E, Stamatakis A, Mantelas A, Philippidis H, Stylianopoulou F. Cellular mechanisms underlying an effect of "early handling" on pCREB and BDNF in the neonatal rat hippocampus. *Brain Res* 2005;1052(2):187-95.
42. Park SS, Stranahan AM, Chadwick W, Zhou Y, Wang L, Martin B, et al. Cortical gene transcription response patterns to water maze training in aged mice. *BMC Neurosci* 2011;12:63.
43. Aid T, Kazantseva A, Piirsoo M, Palm K, Timmusk T. Mouse and rat BDNF gene structure and expression revisited. *J Neurosci Res* 2007;85(3):525-35.
44. D'Sa C, Duamn RS. Antidepressants and neuroplasticity. *Bipolar Disord* 2002; 4: 183-94.
45. Lussier AL, Romay-Tallon R, Kalynchuk LE, Caruncho HJ. Reelin as a putative vulnerability factor for depression: examining the depressogenic effects of repeated corticosterone in heterozygous reeler mice. *Neuropharmacology* 2011;60(7-8):1064-74.
46. Jessell TM, Sanes JR. Differentiation and Survival of Nerve Cells. In: Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, Siegelbaum SA, Hudspeth AJ.(Eds) *Principles of Neural Science*.5th ed Newyork:The McGraw-Hill Companies; 2013. p.1187-1208
47. Knuesel I. Reelin-mediated signaling in neuropsychiatric and neurodegenerative diseases. *Prog Neurobiol* 2010;91(4):257-74.

48. Lakatosova S, Ostatnikova D. Reelin and its complex involvement in brain development and function. *Int J Biochem Cell Biol* 2012;44(9):1501-4.
49. Stranahan AM, Erion JR, Wosiski-Kuhn M. Reelin signaling in development, maintenance, and plasticity of neural networks. *Ageing Res Rev* 2013;12(3):815-22.
50. Rogers JT, Weeber EJ. Reelin and apoE actions on signal transduction, synaptic function and memory formation. *Neuron Glia Biol* 2008;4(3):259-70.
51. Reichelt AC, Maniam J, Westbrook RF, Morris MJ. Dietary-induced obesity disrupts trace fear conditioning and decreases hippocampal reelin expression. *Brain Behav Immun* 2015;43:68-75.
52. Botella-Lopez A, Cuchillo-Ibanez I, Cotrufo T, Mok SS, Li QX, Barquero MS, et al. Beta-amyloid controls altered Reelin expression and processing in Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* 2010;37(3):682-91.
53. Stranahan AM, Haberman RP, Gallagher M. Cognitive decline is associated with reduced reelin expression in the entorhinal cortex of aged rats. *Cereb Cortex* 2011;21(2):392-400.
54. Munton RP, Vizi S, Mansuy IM. The role of protein phosphatase-1 in the modulation of synaptic and structural plasticity. *FEBS Lett* 2004;567(1):121-8.
55. Peti W, Nairn AC, Page R. Folding of Intrinsically Disordered Protein Phosphatase 1 Regulatory Proteins. *Curr Phys Chem* 2012;2:107-14.
56. Siddoway BA, Altimimi HF, Hou H, Petralia RS, Xu B, Stellwagen D, et al. An essential role for inhibitor-2 regulation of protein phosphatase-1 in synaptic scaling. *J Neurosci* 2013;33(27):11206-11.
57. Raha-Chowdhury R, Andrews SR, Gruen JR. CAT 53: a protein phosphatase 1 nuclear targeting subunit encoded in the MHC Class I region strongly expressed in regions of the brain involved in memory, learning, and Alzheimer's disease. *Brain Res Mol Brain Res* 2005;138(1):70-83.
58. Koshibu K, Graff J, Mansuy IM. Nuclear protein phosphatase-1: an epigenetic regulator of fear memory and amygdala long-term potentiation. *Neuroscience* 2011;173:30-6.
59. Wang Y, Wei W, Song B, Wang Y, Dong J, Min H, et al. Developmental hypothyroxinemia caused by mild iodine deficiency leads to HFS-induced LTD in rat hippocampal CA1 region: involvement of AMPA receptor. *Mol Neurobiol* 2014;50(2):348-57.

60. Hou H, Sun L, Siddoway BA, Petralia RS, Yang H, Gu H, et al. Synaptic NMDA receptor stimulation activates PP1 by inhibiting its phosphorylation by Cdk5. *J Cell Biol* 2013;203(3):521-35.
61. Joshi M, Despande JD. Polymerase chain reaction: methods, principles and application. *IJBR* 2010;5:81-97.
62. Sui L, Wang Y, Ju LH, Chen M. Epigenetic regulation of reelin and brain-derived neurotrophic factor genes in long-term potentiation in rat medial prefrontal cortex. *Neurobiol Learn Mem* 2012;97(4):425-40.
63. Hosseinmardi N, Azmi L, Fathollahi Y, Javan M, Naghdi N. In vivo sodium salicylate causes tolerance to acute morphine exposure and alters the ability of high frequency stimulation to induce long-term potentiation in hippocampus area CA1. *Eur J Pharmacol* 2011;670:487-94.
64. Block F. Global ischemia and behavioural deficits. *Prog Neurobiol* 1999;58(3):279-95.
65. Tyler WJ, Alonso M, Bramham CR, Pozzo-Miller LD. From acquisition to consolidation: on the role of brain-derived neurotrophic factor signaling in hippocampal-dependent learning. *Learn Mem* 2002;9(5):224-37.
66. Smith MA, Makino S, Kvetnansky R, Post RM. Stress and glucocorticoids affect the expression of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNAs in the hippocampus. *J Neuroscience* 1995;15(3):1768-77.
67. Rogers JT, Rusiana I, Trotter J, Zhao L, Donaldson E, Pak DT, et al. Reelin supplementation enhances cognitive ability, synaptic plasticity, and dendritic spine density. *Learning Mem* 2011;18(9):558-64.
68. Weeber EJ, Beffert U, Jones C, Christian JM, Forster E, Sweatt JD, et al. Reelin and ApoE receptors cooperate to enhance hippocampal synaptic plasticity and learning. *J Biological Chem* 2002;277(42):39944-52.
69. Mauna JC, Miyamae T, Pulli B, Thiels E. Protein phosphatases 1 and 2A are both required for long-term depression and associated dephosphorylation of cAMP response element binding protein in hippocampal area CA1 in vivo. *Hippocampus* 2011;21(10):1093-104.

ŞEKİLLER LİSTESİ

ŞEKİLLER

Şekil 1. Uzun dönem bellek oluşumu ve ilişkili olduğu bölgeler.....	5
Şekil 2. İnsan hipokampüsünün denizati ile benzerliği ve hipokampüsün alt bölgeleri.....	8
Şekil 3. Hipokampal indirekt yolun şematik gösterimi.....	9
Şekil 4. Morris su labirentinin şematik görünümü.....	10
Şekil 5. Nörotrofinler ve bağlandıkları reseptörler	12
Şekil 6. BDNF aracılı sinyal kaskatı.....	13
Şekil 7. <i>Reelin</i> 'in biyolojik fonksiyonu.....	16
Şekil 8. Deney planı.....	20
Şekil 9. Beş gün yüzen 10 hayvanın (F ve G grupları) öğrenme verileri.....	26
Şekil 10. <i>BDNF</i> ekspresyonunda meydana gelen değişimler.....	27
Şekil 11. <i>Reelin</i> ekspresyonunda meydana gelen değişimler.....	28
Şekil 12. <i>PPI</i> ekspresyonunda meydana gelen değişimler.....	29

TABLolar

Tablo 1. Sıçanların havuza bırakıldıkları yönler.....	22
Tablo 2. PCR amplifikasyonu için kullanılan gen primer dizileri.....	23

ÖZGEÇMİŞ

1988 yılında Edirne’de doğdum. İlk ve ortaöğretimimi Edirne’de tamamladıktan sonra 2007 yılında Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi’nde lisans eğitimime başladım. 2012 yılında Eczacılık Fakültesi’nden mezun oldum. 2012 yılında Trakya Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi Robotik İlaç Hazırlama Ünitesinde eczacı olarak çalışmaya başladım. 2013 yılı Şubat ayında Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Farmakoloji Yüksek Lisans programına başladım. 2013 yılı Ekim ayında eczacı olarak atandığım Trakya Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi’nde görevime devam etmekteyim.

EKLER

EK-1



T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARLARI

EDİRNE

Oturum Sayısı: 2014/02

Karar Tarihi: 31.01.2014

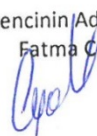
KARAR NO: 2014.02.05

Yürütücülüğünü Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi öğretim üyesi Prof. Dr. Çetin Hakan KARADAĞ'ın yaptığı, Fatma Ceyda KORUCU'nun Yüksek Lisans tezi olarak planlanan TÜHDYEK-2014/06 protokol nolu "Sıçanlarda Morris Su Labirenti Uzaysal Öğrenme Eğitimleri Sırasında Hipokampüste PPI, BDNF ve Reelin Genlerinin Ekspresyonlarında Meydana Gelen Değişikliklerin Belirlenmesi" başlıklı çalışma hakkında görüşüldü. Araştırmanın amaç, yaklaşım, gereç ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmesi sonucunda; Hayvan deneyleri yerel etik kurulu yönergesinde belirtilen ilke ve kurallara uygun bulunarak, çalışmanın yapılabileceğine mevcudun oy birliği ile karar verilmiştir.

Ünvanı/Adı/Soyadı	Araştırma ile İlişki	Toplantı Katılımı	İmza
Doç. Dr. Enis ULUÇAM Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input type="checkbox"/> yok	<input type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Yrd. Doç. Dr. Hayati ARDA Fen-Edebiyat Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input checked="" type="checkbox"/> yok	<input checked="" type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Vet. Hek. Ziya ÇUKUR Veteriner Hekim	<input type="checkbox"/> var <input type="checkbox"/> yok	<input type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Hüseyin KOÇ Sivil Toplum Örgütü Üyesi Sivil Üye	<input type="checkbox"/> var <input checked="" type="checkbox"/> yok	<input checked="" type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Yrd. Doç. Dr. Beytullah ÖZKAN Fen-Edebiyat Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input type="checkbox"/> yok	<input type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Doç. Dr. Y. Atakan SEZER Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input type="checkbox"/> yok	<input type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Doç. Dr. Tevfik AKTOZ Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input checked="" type="checkbox"/> yok	<input checked="" type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Yrd. Doç. Dr. Hakan GÜRKAN Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input checked="" type="checkbox"/> yok	<input checked="" type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Osman GÜLTEKİN Sivil Üye	<input type="checkbox"/> var <input type="checkbox"/> yok	<input type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	

EK-2

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS/DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI
ORJİNALLİK RAPORU

Öğrencinin Adı Soyadı: Fatma Ceyda KORUCU										
Numarası: 1128306152										
Anabilim Dalı: Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı										
Programı: <input checked="" type="checkbox"/> Yüksek Lisans <input type="checkbox"/> Doktora										
Tez başlığı/Konusu: Sıçanlarda Morris Su Labirenti Uzaysal Öğrenme Eğitimleri Sırasında Hipokampüste <i>PP1</i> , <i>Bdnf</i> ve <i>Reelin</i> Genlerinin Ekspresyonlarında Meydana Gelen Değişikliklerin Belirlenmesi										
Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne										
<p>Yukarıda açık adı bulunan tezimin "Kapak Sayfası, Giriş ve Amaç, Genel Bilgiler, Bulgular, Tartışma, Sonuçlar, Özet ve Summary" bölümlerinden oluşan toplam 35 sayfalık kısmına ilişkin 12/01/2016 Tarihinde tez danışmanım tarafından <i>Turnitin</i> adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanmış olan orijinallik raporuna göre tezimin benzerlik oranı % 9 olarak belirlenmiştir.</p> <p><u>Uygulanan filtrelemeler:</u></p> <table><tr><td>1-Kabul ve Onay Sayfası hariç</td><td>6-Kaynaklar hariç</td></tr><tr><td>2-Teşekkür hariç</td><td>7-Şekiller Listesi hariç</td></tr><tr><td>3-İçindekiler hariç</td><td>8-Özgeçmiş hariç</td></tr><tr><td>4-Simge ve Kısaltmalar hariç</td><td>9-Ekler hariç</td></tr><tr><td>5-Gereç ve Yöntemler Hariç</td><td></td></tr></table> <p>Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez çalışması Orijinallik Raporu Uygulama Esaslarını inceledim ve bu uygulama esaslarında belirtilen maksimum benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini, aksinin ispat edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğruluğunu beyan ederim. 12/01/2016</p>	1-Kabul ve Onay Sayfası hariç	6-Kaynaklar hariç	2-Teşekkür hariç	7-Şekiller Listesi hariç	3-İçindekiler hariç	8-Özgeçmiş hariç	4-Simge ve Kısaltmalar hariç	9-Ekler hariç	5-Gereç ve Yöntemler Hariç	
1-Kabul ve Onay Sayfası hariç	6-Kaynaklar hariç									
2-Teşekkür hariç	7-Şekiller Listesi hariç									
3-İçindekiler hariç	8-Özgeçmiş hariç									
4-Simge ve Kısaltmalar hariç	9-Ekler hariç									
5-Gereç ve Yöntemler Hariç										
Öğrencinin Adı Soyadı, İmza Fatma Ceyda KORUCU 										
UYGUNDUR 12/01/2016 Danışman Adı Soyadı, İmza Prof. Dr. Ç. Hakan KARADAĞ 