

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

Tez Yöneticisi  
Prof. Dr. Çetin Hakan KARADAĞ

**MORRİS SU LABİRENTİ UZAYSAL ÖĞRENME VE  
BELLEK MODELİNDE, SIÇAN HİPOKAMPÜSÜNDE  
HİSTON ASETİLASYONU VE HİSTON DEASETİLAZ  
İNHİBİTÖRÜNÜN ETKİSİ**

**(Doktora Tezi)**

**Ruhan Deniz TOPUZ**

**Referans no: 10008321**

**EDİRNE-2015**

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

Tez Yöneticisi  
Prof. Dr. Çetin Hakan KARADAĞ

**MORRİS SU LABİRENTİ UZAYSAL ÖĞRENME VE  
BELLEK MODELİNDE, SIÇAN HIPOKAMPÜSÜNDE  
HİSTON ASETİLASYONU VE HİSTON DEASETİLAZ  
İNHİBİTÖRÜNÜN ETKİSİ**

**(Doktora Tezi)**

**Ruhan Deniz TOPUZ**

**Destekleyen Kurum: TÜBAP- 2012/210**

**Tez No:**

**EDİRNE-2015**

T.C.  
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ  
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğü

ONAY

Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı doktora programı çerçevesinde ve Prof. Dr. Ç. Hakan KARADAĞ danışmanlığında doktora öğrencisi Ruhan Deniz TOPUZ tarafından tez başlığı "Morris Su Labirenti Uzaysal Öğrenme ve Bellek Modelinde, Sıçan Hipokampusünde Histon Asetilasyonu ve Histon Deasetilaz İnhibitörlerinin Etkisi" olarak teslim edilen bu tezin tez savunma sınavı 12/06/2015 tarihinde yapılarak aşağıdaki jüri üyeleri tarafından "**Doktora Tezi**" olarak kabul edilmiştir.

  
Prof. Dr. Ç. Hakan KARADAĞ  
JÜRİ BAŞKANI

  
Prof. Dr. Ahmet ULUGÖL  
Üye

Prof. Dr. Kevser EROL  
Üye

Prof. Dr. Güner ULAK  
Üye

Yrd. Doç. Dr. Hakan GÜRKAN  
Üye

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

  
Doç. Dr. Tammam SİPAHİ  
Enstitü Müdürü

## **TEŞEKKÜR**

Doktora eğitimim ve tez çalıőmam boyunca desteğini hep hissettiğim danışmanım Prof. Dr. etin Hakan KARADAğ'a, bana daima güvenen Prof. Dr. Ahmet ULUGÖL, Prof. Dr. Dikmen DÖKMECİ ve Yrd. Doç. Dr. Özgür GÜNDÜZ'e, her zaman tecrübelerinden faydalandığım Doç Dr. Glnur Kızılay ÖZFİDAN'a ve Yrd. Doç. Dr. Hakan GÜRKAN'a, desteğinden dolayı Yrd. Doç Dr. Ebru TAŐTEKİN'e, arkadaşlarım Kübra AYDEMİR, Zeynep TODURGA, Özlem ÜREK ve Ceyda KORUCU'ya, bugünlere gelmemde en büyük emeğe sahip olan aileme, desteklerinden dolayı TÜBAP'a teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

<b>GİRİŞ VE AMAÇ</b> .....	1
<b>GENEL BİLGİLER</b> .....	3
<b>ÖĞRENME VE BELLEK</b> .....	3
<b>ÖĞRENME-BELLEK VE SİNAPTİK PLASTİSİTE</b> .....	8
<b>ÖĞRENME-BELLEK VE HİPOKAMPÜS</b> .....	10
<b>EPIGENETİK TANIMI</b> .....	12
<b>HİSTON ASETİLTRANSFERAZ VE HİSTON DEASETİLİZ ENZİMLERİ</b> .....	18
<b>EPIGENETİK VE ÖĞRENME- BELLEK</b> .....	21
<b>GEREÇ VE YÖNTEMLER</b> .....	24
<b>BULGULAR</b> .....	30
<b>TARTIŞMA</b> .....	47
<b>SONUÇLAR</b> .....	55
<b>ÖZET</b> .....	56
<b>SUMMARY</b> .....	57
<b>KAYNAKLAR</b> .....	58
<b>ŞEKİLLER LİSTESİ</b> .....	68
<b>ÖZGEÇMİŞ</b> .....	70
<b>EKLER</b>	

## SİMGE VE KISALTMALAR

<b>AMPA</b>	:	$\alpha$ -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropionik asid
<b>BDNF</b>	:	Brain-derived neurotrophic factor
<b>CA1</b>	:	Cornu Ammonis 1
<b>CA2</b>	:	Cornu Ammonis 2
<b>CA3</b>	:	Cornu Ammonis 3
<b>CBP</b>	:	CREB-binding protein
<b>CPG</b>	:	Cytosine phosphate guanine
<b>CRE</b>	:	cAMP response element
<b>CREB</b>	:	cAMP response element binding protein
<b>DNA</b>	:	Deoksiribonükleik asit
<b>GABA</b>	:	Gama-aminobütirik asit
<b>HAT</b>	:	Histon asetiltransferaz
<b>HDAC</b>	:	Histon deasetilaz
<b>İHK</b>	:	İmmunohistokimya
<b>LTD</b>	:	Long term depression
<b>LTM</b>	:	Long term memory
<b>LTP</b>	:	Long term potentiation
<b>NGF</b>	:	Nerve growth factor
<b>NMDA</b>	:	N-metil-D-aspartik asit
<b>RNA</b>	:	Ribonükleik asit

## GİRİŞ VE AMAÇ

Yüksek kognitif fonksiyonlardan olan öğrenme ve bellek sinirbilimciler için oldukça eski bir çalışma alanıdır. Öğrenme süreci ve bellek oluşumu hakkında yapılan birçok farklı çalışmaya rağmen fizyolojik mekanizmalar ve düzenleyicileri hala tam olarak aydınlatılabilmemiş değildir. Genetik faktörlerin, maruz kalınan iyi ya da kötü çevresel uyarıların, ilaçların, çeşitli hastalıkların öğrenme ve bellek oluşumunu etkileyip etkilemediği ve bunların altında yatan moleküler mekanizmalar son yıllarda sinirbilimcilerin özellikle odaklandığı alanlardır.

Öğrenme ve uzun dönem bellek yapılanmasının altında gen ekspresyonu, protein sentezi, sinaptik güçlenme gibi birçok farklı moleküler ve hücresel değişiklik yatmaktadır. Bu değişikliklerin bazıları öğrenme sırasında oluşur ve ömür boyu korunur. Histon modifikasyonları ve DNA metilasyonu gibi epigenetik düzenlemeler ise mitoz sonrası hücrelerde uzun vadeli değişiklikleri sağlamaları nedeniyle önemli bir role sahiptirler (1). Epigenetik ilk olarak 1940'lı yıllarda kullanılan ve kelime anlamı olarak genetik üstü anlamına gelen bir terimdir. Son yıllarda oldukça popüler bir çalışma alanı olan epigenetik düzenlemeler sinirbilim alanında da fazlaca çalışılmaktadır. Histon asetilasyonu epigenetik değişiklikler arasında en çok çalışılan ve etkileri nispeten daha çok açıklanabilmiş bir histon modifikasyonudur. Çeşitli bellek testleriyle beynin farklı bölgelerinde histonların asetilasyon düzeylerinde meydana gelen değişimler incelenmiştir. Histon asetilasyonu DNA'yı ökromatin hale getirerek transkripsiyonel aktivasyona sebep olur (2). Histon asetilasyonu geri dönüşümlü bir reaksiyondur ve histon asetiltransferaz enzimi ile, histon deasetilasyonu ise histon deasetilaz enzimi (HDAC) ile katalize edilir. HDAC enziminin inhibe edilmesi histonların asetilli kalmasına ve ilgili gen bölgesinin ekspresyonunda artışa neden olacaktır.

HDAC enzimleri birçok hastalık için yeni ilaç hedefleri olarak düşünülmektedir. HDAC enzimlerinin yavaş yavaş tanımlanmasıyla bu enzimleri inhibe edecek yeni ilaçlar geliştirilmeye çalışılmaktadır.

Skopolamin non-selektif muskarinik reseptör antagonistidir. Parasempatolitik, sedatif, antiemetik, amnezik etkili bir ilaçtır. Sağlıklı gönüllülerde yapılan bir çalışmada skopolaminle ortaya çıkan amnezinin yaşlılığa bağlı demansa ve Alzheimer hastalığında görülen kognitif bozukluklara benzediği görülmüştür. Bu nedenle hayvan deneylerinde kognitif bozukluk oluşturmak için skopolaminin kullanılabilmesi belirtilmektedir (3-5).

Son yıllarda ortalama yaşam süresinin artması sonucu yaşa bağlı kognitif bozukluklarda ve Alzheimer hastalığının insidansında artış görülmektedir. Kişilerin yaşam kalitesini oldukça fazla bozmaları ve hala tam anlamıyla tedavi edilememeleri nedeniyle bu alanda oldukça fazla ilaç çalışmasına ihtiyaç vardır. HDAC inhibitörlerinin yaşa bağlı kognitif bozuklukta ve Alzheimer hastalığında yeni bir tedavi seçeneği olabileceği düşünülmektedir.

Bu çalışmada uzaysal öğrenme ve bellek modellerinden biri olan Morris su labirenti kullanıldı. Çalışmamızın ilk bölümünde uzaysal öğrenme ve bellek oluşumu sürecinde hipokampus CA1 bölgesinde histon asetilasyon düzeylerinde ardışık günlerde meydana gelen değişimi göstermeyi amaçladık. İkinci bölümde normal sıçanlarda HDAC inhibitörlerinin öğrenme ve uzaysal bellek oluşumu üzerine etkilerini, üçüncü bölümde ise skopolamin kullanılarak kognitif bozukluk oluşturulan deney hayvanlarında, HDAC inhibitörlerinin Morris su labirenti performansı üzerine etkilerini incelemeyi amaçladık.



## GENEL BİLGİLER

### ÖĞRENME VE BELLEK

Öğrenme ve bellek beynin en önemli kognitif (bilişsel) fonksiyonlarından. Algılama, sebep-sonuç ilişkisi kurma, karar verme, dikkat, karşılaştırma ve dil beynin diğer kognitif fonksiyonları arasında sayılabilir. Öğrenme ve bellek iki ayrı kavram olmasına rağmen bu iki süreç birbirinin içine geçmiş durumdadır. Sıkça kullanılan bu iki terimi tam olarak açıklamak ve birbirinden ayırmak oldukça zordur, Sweatt'ın belirttiği gibi bir şeyi öğrendiğinizde öğrenme, öğrendiğinizi hatırladığınızda bellekten söz edilir (6).

Kavramları kısaca açıklamaya ve netleştirmeye çalışırsak öğrenme, çevresel uyarılara karşı kazanılmış davranış yanıtıdır. Burada dikkat edilmesi gereken nokta öğrenmenin çevresel uyarıya verilen yanıt değil, çevresel uyarıyı deneyimledikten sonra, verilen bazal yanıtta değişim olmasıdır. Bir deney hayvanı üzerinden düşünürsek, deney hayvanı herhangi bir çevresel uyarıya karşı bazal bir tepki verir, deney hayvanı aynı çevresel uyarı ile ikinci kez karşılaştığında ilkinden farklı, değişmiş bir tepki verir ve bu öğrenmedir. Bellek ise öğrenilen bilginin depolanmasıdır (6).

Kandel'e göre öğrenme dünyayla ilgili bilginin kazanılması veya deneyimlere bağlı olarak davranış değişikliği yapabilme yeteneğidir; bellek ise bilginin kodlanması, depolanması ve sonrasında bilinçli ya da bilinçsiz olarak hatırlanmasıdır (7).

Bellek işlevlerinin beyinde birçok farklı yolakla ve anatomik bölgeyle ilişkili olduğu düşünülmektedir (8). Öğrenme ve bellek yapılan çalışmalarda birçok farklı açıdan gruplandırılmıştır. Bellek; içeriğine, süresine, işlem düzeyine bağlı olarak birçok alt sınıfa ayrılabilir. Belleği öncelikle depolanan bilginin türüne ve depolanma süresine bağlı olarak sınıflandırmak anlaşılmasını kolaylaştırmaktadır.

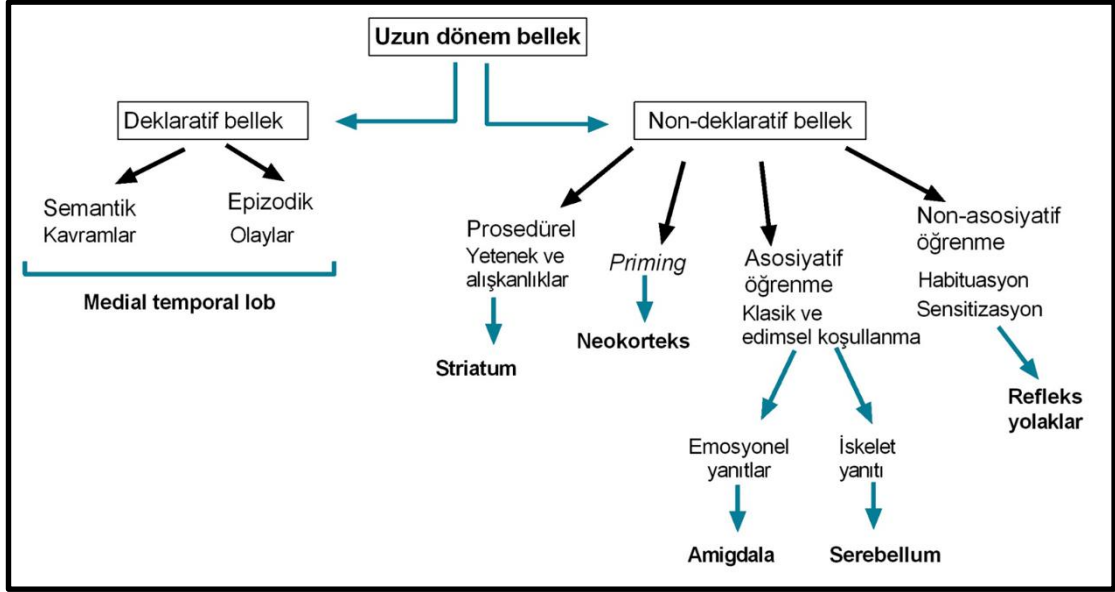
## **Belleğin Zamana Göre Sınıflandırılması**

Anıların ömrü bazen birkaç saniye, bazen saatler, bazen de yıllarca sürebilmektedir. Belleğin zamansal yönden sınıflandırılması ilk kez 19. yüzyıl sonlarında Hering, Ebbinghaus ve ardından Atkinson ve Shiffrin tarafından yapılmıştır (9). Belleği kısa süreli bellek ve uzun süreli bellek olmak üzere iki ana başlıkta incelemek anlaşılmasını kolaylaştırmaktadır.

**1) Kısa süreli bellek:** Belleğin hızlı ve erken evreleri duyuşal ve algısal uyarılarla ilgilidir. Duyusal bilgiler saniyeler ya da birkaç dakika içinde kısa dönem belleğe dönüştürülür. Kısa dönem belleğin üç temel bileşeni; duyuşal bellek (*sensory memory*), kısa dönem depolanma (*short-term storage*) ve işler bellek (*working memory*)'tir. Kısa süreli bellek iki yönlüdür. Yeni algılanan duyuşal verilerle ilişkili olduğu gibi, uzun dönem bellek depolarından yeni geri çağrılan bilgilerle de ilgilidir. Bu nedenle kısa süreli bellek hem bir giriş merkezi hem de çıkış merkezi görevini üstlenmiştir. Kısa dönem belleğin ilk komponenti, yeni tanışılan bir kişinin yüzü gibi yeni algılanan duyuşal verilerle ilgilidir (6). Algılanan duyuşal uyarının kısa dönem belleğe geçişindeki ilk basamak kısa dönem depolanmadır. Bu aşamada duyuşal uyarın ne kadar güçlü ve açıksa kısa süreli belleğe geçişi o kadar belirgindir. Duyusal belleği, uyarının türüne göre ikiye ayırabiliriz: eğer uyarı işitselse ekoik, görselse ikonik bellekten söz edilir (6,10).

Kısa dönem depolanmada, depolanan bilgiye hiçbir şey yapmadan bilgi depolanabilir. Eğer bilgi işleniyorsa o zaman işler bellekten söz edilir. Günlük yaşamın sonucu olarak bazı bilgileri kısa süre aklımızda tutmamız ve hatırlamamız gerekir. Bazen bir telefon numarasını aklımızda tutmamız, bize dikte edilen farklı bir ismi yazmamız ya da bilmediğimiz bir ortamda yapılan yönlendirmeleri takip etmemiz gerekir; tüm bu aktiviteler aslında işler belleğin fonksiyonudur. İşler bellek, bilginin manipülasyonunu ve geçici depolanmasını anlatan bir terimdir (11). Parietal korteks ve dorsalateral prefrontal korteks kısa süreli bellek ile ilişkili beyin alanlarıdır (9).

**2) Uzun dönem bellek:** Kısa dönem bellek ve işler bellekte bilgiler çok kısa süreler saklanabilmesine rağmen uzun dönem bellekte (*long term memory, LTM*) bilgiler yıllarca saklanabilir. Uzun dönem belleğin saklanan bilginin içeriğine göre sınıflandırılması ve ilişkili oldukları beyin bölgeleri aşağıda gösterilmiştir (Şekil 1).



**Şekil 1. Uzun dönem bellek yapılanması ve beyinde ilişkili olduğu bölgeler (Sweatt JD. (6)'dan uyarlanmıştır).**

Bilgilerin bu kadar uzun süre saklanabilmesi LTM'nin altında yatan moleküler mekanizmalarla ilgilidir. LTM'nin oluşabilmesi için sinaptik gücün artması, yeni sinapsların oluşması, nörotransmitter salıverilmesi ve protein sentezi gereklidir (7,12).

#### A-Deklaratif (eksplisit) bellek:

İnsanlar, yerler, meydana gelen olaylar ve gerçeklerle ilgili bilgilerin bilinçli olarak hatırlanmasını içerir. Deklaratif bellek oldukça değişkendir, bilgilerin farklı parçaları farklı koşullarla ilişkili olabilir. Medial temporal lob ya da diensefalonda hasar olduğunda deklaratif belleğin kaybına bağlı nörolojik amnezi görülür (7,13,14).

Deklaratif bellek kendi içinde epizodik ve semantik bellek olarak ikiye ayrılır. Bu sınıflamayı ilk kez Endel Tulving yapmıştır. Tulving'e göre epizodik bellek kişisel deneyimler ve otobiyografik bellekten oluşurken, gerçekler ile ilgili bellek semantik belleği oluşturur (14-16).

Eksplisit bellekle ilgili iki önemli noktaya dikkat çekilebilir; bunlardan birincisi eksplisit bellekte bilgilerin tek bir uzun dönem bellek deposunun olmadığı, görsel, işitsel ve diğer duyuşsal uyarılara göre beyin çeşitli bölgelerine erişmesidir. İkinci önemli nokta deklaratif belleğin kodlama (*encoding*), depolama (*storage*), konsolidasyon (*consolidation*) ve geri çağırma (*retrieval*) işlemlerinden oluşmasıdır.

**Kodlama:** Edinilen yeni bilginin belleğe kaydedilmesi ve bellekteki bilgilerle bağlantısının kurulması sürecidir.

Depolama: Bilgilerin bellekte depolanmasıdır. Uzun dönem belleğin kapasitesi tam olarak tahmin edilememektedir ve sınırsız gibi görünmektedir, buna karşın işler bellek bir anda sadece birkaç bilgiyi saklayabilir.

Konsolidasyon: Labil (kararsız) olan bilginin protein sentezi, gen ekspresyonu ve sinapsların güçlendirilmesiyle kararlı (kalıcı) hale gelmesi sürecidir.

Geri çağırma: Depolanan bilginin hatırlanmasıdır. Beynin farklı bölgelerinde depolanan bilgileri akla getiren farklı düşünceler olur. Eğer kişi saklanan bilgiyi kişisel bir deneyimle kodlamışsa geri çağırma daha etkin (efektif) olur (7).

Deklaratif belleğin iki alt tipi olan epizodik bellek ve semantik bellek, medial temporal lob ve orta hat diensefalik yapılar ile ilişkilidir. Bunlara ek olarak frontal lob da epizodik bellekle ilişkilidir (16-18).

B-Non-deklaratif (implisit) bellek:

Non-deklaratif bellek, klasik koşullanma, alışkanlık, beceri gibi bilinç dışı öğrenilen bilgilerden oluşur. Başka bir ifadeyle non-deklaratif bellek, bilinçli bir çaba harcamadan ve bilinç dışı davranışlarla kazanılan bellek türüdür (7,12).

Non-deklaratif belleği dört ana başlık altında inceleyebiliriz.

1) Asosiyatif öğrenme: Asosiyatif öğrenme iki uyarı arasındaki ilişkinin ya da bir uyarıyla bir davranış arasındaki ilişkinin öğrenildiği öğrenme biçimidir. Klasik koşullanma ve *operant* koşullanma olarak ikiye ayrılır.

Klasik koşullanmanın temeli refleksif süreçlere dayanır ve ilk kez Rus fizyolog Ivan Pavlov tarafından tanımlanmıştır. Klasik koşullanmanın temeli iki uyarı birbirine eşleştirmektir. Ses, ışık, dokunma gibi zayıf ya da hiç yanıt oluşturmayan bir koşullu uyarı seçilir. Koşulsuz uyarı olarak yiyecek ya da şok gibi belirgin bir yanıt (salivasyon, ayağını geri çekme) oluşturacak uyarı seçilir. Koşulsuz yanıtlar içseldir ve öğrenmeye bağlı değildir. Koşullu uyarının, koşulsuz uyarı ile birlikte tekrarlayan uygulamaları sonucunda koşullu uyarıya karşı farklı bir yanıt oluşmasını sağlar ve bu yanıt koşullu yanıt (6,7).

*Operant* (edimsel) koşullanma ise ilk kez Edgar Thorndike tarafından tanımlanmıştır. *Operant* koşullanmayı açıklayan deney düzeneğinde, aç bir sıçan deney bölmesine yerleştirilir. Sıçan deney odasının bir duvarında bulunan kola bastığında kendisine ödül olarak yemek verilir. Bu davranış ve ödüllendirme birkaç kez tekrarlandıktan sonra deney hayvanı, acıktıkça duvardaki kola basmaya başlar. *Operant* koşullanma ödül ve ceza sisteminin temelini

oluşturur ve davranış sonuç ilişkisini açıklar. Eğer sonuç olumluysa davranış tekrarlanır, olumsuz ya da acı vericiyse davranış tekrarlanmaz (6).

2) Non-asosiyatif öğrenme: En basit öğrenme şeklidir ve canlı, bir uyarıyı öğrenir. Bu öğrenme tipi daha çok basit omurgasız canlılar üzerinde fleksiyon, göz kırpmaya, korkma gibi refleks yanıtlar üzerinde çalışılmıştır (7,19). Habitüasyon ve sensitizasyon olmak üzere iki alt tipi vardır.

Habitüasyon (alışma), implisit belleğin en basit şeklidir. Canlı ilk defa karşılaşılan çevresel bir uyarıya karşı yanıt geliştirir, ancak uyarı zarar verici değilse tekrarlayan uygulamalar sonunda canlı bu uyarıya alışır, verdiği yanıt azalır ve kaybolur. Sessiz küçük bir kasabada yaşayan birinin, büyük şehirde çok gürültülü bir ana caddeye taşındığı ilk günlerde, sokaktaki gürültüden çok rahatsız olması ve zaman geçtikçe gürültüyü fark etmemesi habitüasyona örnek verilebilir (7,19).

Sensitizasyon (duyarlılaşma), organizmanın bir uyarıya karşı beklenen bazal yanıtta daha güçlü bir yanıt vermesi durumudur. Sensitizasyon, genellikle rahatsızlık verici başka bir uyarının ardından zayıf bir uyarı verildiğinde, bu zayıf uyarıya verilen yanıtta bir artış olarak tanımlanır (7,10,19).

Bu iki non-asosiyatif öğrenme tipi de kısa süreli ya da uzun süreli olarak kendini gösterebilir. Öğrenilen olay için bellek tipi sadece uyarının ne kadar tekrar edildiğine bağlıdır (7).

3) *Prosedural* öğrenme (motor öğrenme, yetenek): Motor öğrenme, beceri ve alışkanlıklar bilinçdışı öğrenme ve bilinçsiz geri çağırmanın önemli örnekleridir. Örneğin yürümek, otomatik olarak kolaylıkla yerine getirilen, oysa oldukça karmaşık motor hareketleri içeren bir beceridir. Bizler daha küçük bir çocukken bilinçsiz olarak yürümeyi öğreniriz. Aynı durum konuşmak için de geçerlidir. Motor öğrenmede bilinçsiz yapılan davranışlarla çevresel uyarılar arasında karmaşık bağlantılar mevcuttur. Motor korteks ve bazal gangliyonlar motor öğrenmede birlikte rol alır (20).

4) *Priming* (hazırlama): Daha önceki deneyimlerin sonucunda bir ipucuyla, kelime ya da herhangi bir durumu tanımlamayı sağlayan gelişmiş bir yetenektir. Herhangi bir öğe ile ilk karşılaştığımızda o öğe beynimize bir şekilde sunulur ve beyinde işlenir. Aynı öğeyle tekrar karşılaştığımızda daha hızlı hatırlarız (14). *Priming*, herhangi bir uyarı ile ikinci kez karşılaşıldığında daha hızlı ve verimli bir yanıt verilmesini sağlar. Eksik parçaları olan bir resimden bütünü tahmin edebilme ya da bir kelimeyi ilk harfi söylendiğinde bulabilmek *priming*e örnek olabilir (21,22).

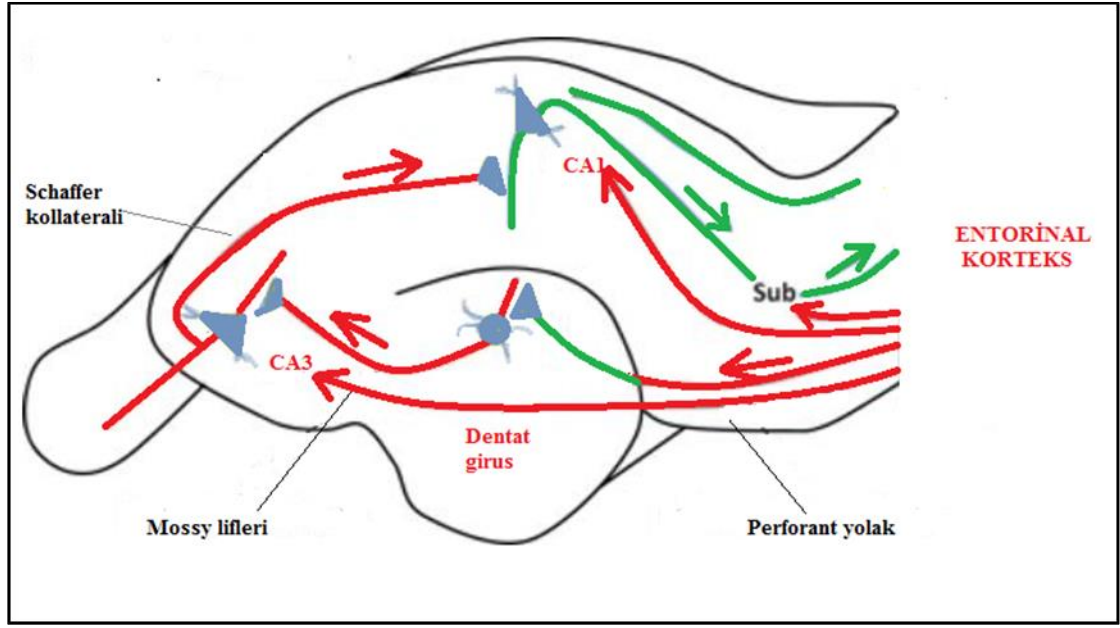
## ÖĞRENME-BELLEK VE SİNAPTİK PLASTİSİTE

Öğrenme ve bellek oluşumunun elektrofizyolojik (uyarılmış potansiyeller), kimyasal (nörotransmitter salınımı) ve sinaptik değişiklikler, gen ekspresyonu, yeni proteinlerin sentezi gibi çeşitli yönleri vardır. Bilim dünyası uzun yıllardır, davranışın, bilincin, öğrenme ve bellek oluşumunun moleküler temellerini anlamaya çalışmaktadır. Ancak belleğin altında yatan moleküler mekanizmayı anlamak nöral ağın karmaşık anatomisi ve fizyolojisi nedeniyle oldukça zordur. Bellek oluşumunun hücrel mekanizmasını anlamaya çalıştığımızda en temel hipotezin Kanadalı bilim adamı Donald Hebb'in hipotezi olduğunu görebiliriz. Hebb'e göre anılar, santral sinir sisteminde nöronlar arasındaki sinaptik bağlantıların gücündeki değişiklikler olarak depolanmaktadır (12,23,24).

Nöronlar arasında bağlantının kurulduğu, nöronların birbiriyle etkileşim içinde olduğu bölgeye *sinaps* denir. Santral sinir sistemindeki sinaptik bağlantının sayısı, yapısı ve gücü canlılar için önemlidir. Nöronlar arasındaki sinaptik bağlantının değişme kapasitesi *sinaptik plastisite* olarak tanımlanır. *Sinaptik plastisite*, davranışın ve belleğin altında yatan temel mekanizmadır. Sinaptik plastisitenin, uzun dönem potansiyalizasyon (*long term synaptic potentiation, LTP*) ve uzun dönem depresyon (*long term synaptic depression, LTD*) olmak üzere iki ana formu vardır (23,25).

LTP, sinaptik gücün uzun zamanlı, aktivite bağımlı olarak artmasıdır. İlk kez Tim Bliss ve Terje Lomo'nun hipokampus üzerinde yaptığı çalışmalarda tespit edilmiştir. LTP, glutamat NMDA reseptörü ile ilişkilidir ve başlıca hipokampus, amigdala ve serebral kortekste asosiyatif öğrenme, uzaysal öğrenme ve adaptif değişikliklerin altında yatan hücrel mekanizmadır (26-28).

LTP'yi anlamak için yapılan çalışmalar daha çok hipokampus CA1 bölgesindeki Schaffer kollaterallerinde yapılmıştır, Hipokampüste LTP oluşumundaki nöral ağ Şekil 2'de gösterilmiştir. Nöral ağda üç nöron grubu bulunmaktadır. Bilgi, entorinal korteksten başlayıp perforant yolakla dentat girusa ulaşan ilk nöron grubuyla dentat girusa taşınır. Bu nöronlar dentat granül hücreleri ile sinaps yapar. Dentat girusdaki sinapstan sonra bilgi, dentat granül hücrelerinin aksonlarından oluşan mossy lifleri ile hipokampusün CA3 bölgesine taşınır ve CA3'deki piramidal hücreler ile sinaps yapar. CA3 bölgesindeki sinapstan sonra Schaffer kollateralleri olarak bilinen piramidal hücre aksonları ile ipsilateral CA1 bölgesine taşınır.



**Şekil 2. LTP oluşumunda nöral ağ**

CA1 bölgesindeki piramidal hücrelerle yapılan sinapstan sonra bilgi, piramidal hücrelerin aksonları ile hipokampüsten çıkar kortikal ve subkortikal yapılara taşınır (24,28)..

Bliss ve Lomo çalışmalarında, entorinal korteksten gelen perforant yolağı uyararak dentat girustaki sinaptik potansiyeli kaydetmişlerdir. Çalışma sırasında hücrelerde sabit bir sinaptik uyarıya karşı aksiyon potansiyeli (*eksitator postsinaptik potansiyel, excitatory postsynaptic potential, EPSP*) oluştuğunu ve kısa süreli yüksek frekansta bir uyarının (100 Hz'lik, tetanik) dentat hücreler ile perforant yolak arasındaki sinapslarda güçlenmeye yol açtığını fark etmişlerdir. Bu iki *fenomene* birden LTP adını vermişlerdir. Bu çalışmadan sonra birçok bilimci LTP'nin altında yatan mekanizmayı anlamaya yönelik çalışmalar yapmıştır. Bu çalışmalar sonucunda LTP'nin, eksitator bir nörotransmitter olan glutamatın AMPA ve NMDA reseptör alt tipleriyle ilişkili olduğu anlaşılmıştır (24). Bu iki reseptör iyonotropik reseptörlerdir ve kanal proteini ile kenetlenmişlerdir. NMDA reseptörü üzerinde allosterik etki oluşturarak kanal fonksiyonunu değiştiren glisin, poliamin, fensiklidin bağlanma yerleri de mevcuttur. NMDA reseptörünün ortasında bir  $Mg^{+2}$  tıkaçı bulunur (29). Magnezyumun bağlanması voltaj bağımlı bir özellik gösterir; şöyle ki istirahat membran potansiyelinde  $Mg^{+2}$  kendi bağlanma yerine bağlı kalır ve reseptöre glutamat bağlansa bile kanal açılmaz. Membran potansiyeli artacak olursa (hücre depolarize edilirse)  $Mg^{+2}$  bağlanma yerinden ayrılır ve eğer ortamda glutamat varsa kanal açılabilir. AMPA reseptörü  $Na^{+}$  kanalı ile kenetlidir ve AMPA reseptörünün uyarılması hücre içine fazla  $Na^{+}$  girişine ve EPSP oluşumuna sebep olur. Oluşan aksiyon potansiyeli sinirsel iletinin devamını sağlar. AMPA

reseptörlerinin uyarılmasıyla oluşan EPSP sonucunda hücre yeterince depolarize olur ve NMDA reseptörü  $Mg^{+2}$  tıkaçından kurtulur.  $Mg^{+2}$  tıkaçının açılmasıyla postsinaptik sinir ucuna  $Ca^{+2}$  girişi artar. Hücre içinde artan  $Ca^{+2}$  ilgili hücre içi sinyal yollarını aktive eder ve LTP oluşmasını sağlar (24,27,28).

## ÖĞRENME–BELLEK VE HİPOKAMPÜS

Hem öğrenme sürecinde hem de farklı biçimlerde tanımlanan bellek alt tiplerinde birçok farklı beyin bölgesi görev yapar. Frontal, parietal, oksipital ve temporal loblar, korteks, limbik sistem ve hipokampüsün hem kendi içlerindeki hem de farklı yapılarla aralarında bulunan nöral ağlar öğrenme ve bellek sürecinde önemlidir (7,12). Ana hatlarıyla beyin bölgeleri ve ilişkili olduğu bellek tipleri Tablo 1’de gösterilmiştir.

Öğrenme ve bellek sürecinde farklı birçok beyin bölgesinin yer almasına rağmen hipokampüs hem birçok bölgeden veri alması hem de bir veri çıkış merkezi olması nedeniyle kilit rol oynamaktadır. Aslında öğrenme ve bellek çalışmalarında hipokampüsten tek bir anatomik yapıymış gibi bahsetmek çok doğru değildir. Hipokampal sistem, hipokampal ve parahipokampal yapılar olarak gruplanabilir. Hipokampüs (CA1, CA2, CA3), dentat girus ve subikulum hipokampal yapıları oluştururken; peririnal, postrinal, entorinal, presubikular ve parasubikular korteksler parahipokampal yapıları oluşturur (30).

**Tablo 1. Bellek alt tipleri ve ilişkili olduğu beyin bölgeleri (2)**

Bellek alt tipi	İlişkili olduğu beyin bölgeleri
İşler bellek	Prefrontal korteks ve kaudat nukleus
Deklaratif, epizodik ve uzaysal bellek	Medial temporal lob (hipokampüs, dentat girus, entorinal korteks, perihinal korteks)
Motor beceri ve prosedural bellek	Striatum, globus pallidus ve serebellum
Priming	Oksipital korteks, neokorteks
Aversif koşullama	Amigdala
Sensitizasyon, habituasyon	Beyin sapı çekirdekleri, amigdala, medulla spinalis
Sirkadiyen ritm	Hipotalamus
Ödül, bağımlılık	Nükleus akumbens, ventral tegmental alan



Hipokampus birçok bölgeden input alan ve birçok bölgeye output gönderen bir merkezdir. Hipokampus görsel, işitsel ve somatosensoryal korteksten direkt ve indirekt yollarla, olfaktör sistemden de direkt olarak girdiler alır. Dış merkezlerden gelen veriler hipokampusün kendi içindeki nöral ağda iletdikten sonra tekrar korteks, amigdala gibi beyin bölgelerine dağılır.

Hipokampal sistemdeki nöral ağ çok farklı nöromodülatörler içerir. Nöral ağ kolinerjik, serotonerjik, dopaminerjik, noradrenerjik projeksiyon liflerini içerir. Hipokampal internöronlar arasındaki sinapslar ise çoğunlukla GABA' erjiktir; ayrıca reelin, BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*), NGF (*nerve growth factor*) gibi birçok nöromodülatör peptidi de içerirler, hipokampüsteki piramidal nöronlar ise glutamaterjiktir (30).

Hipokampusün hem anatomik yapısının hem de nöronlar arasındaki bağlantıların karmaşık olması nedeniyle santral sinir sistemi içindeki fonksiyonu tam olarak anlayamamıştır.

Hipokampusün duysal uyarıların talamus, hipotalamus ve limbik sisteme iletilmesinde, heyecan uyandıran olaylarda heyecanın kontrolünde ve endokrin düzenlemelerde rol aldığından farklı kaynaklarda söz edilmektedir (31-33). Birçok fonksiyonundan bahsedilmesine rağmen özellikle uzaysal bellek gelişiminde ve deklaratif belleğin yapılanmasında hipokampal yapılar önemlidir. Hipokampusün ana fonksiyonları, çevresel uyarıları algılama, zamanlama, ilişkilendirme ve bellek yapılanması olarak sınıflandırılabilir.

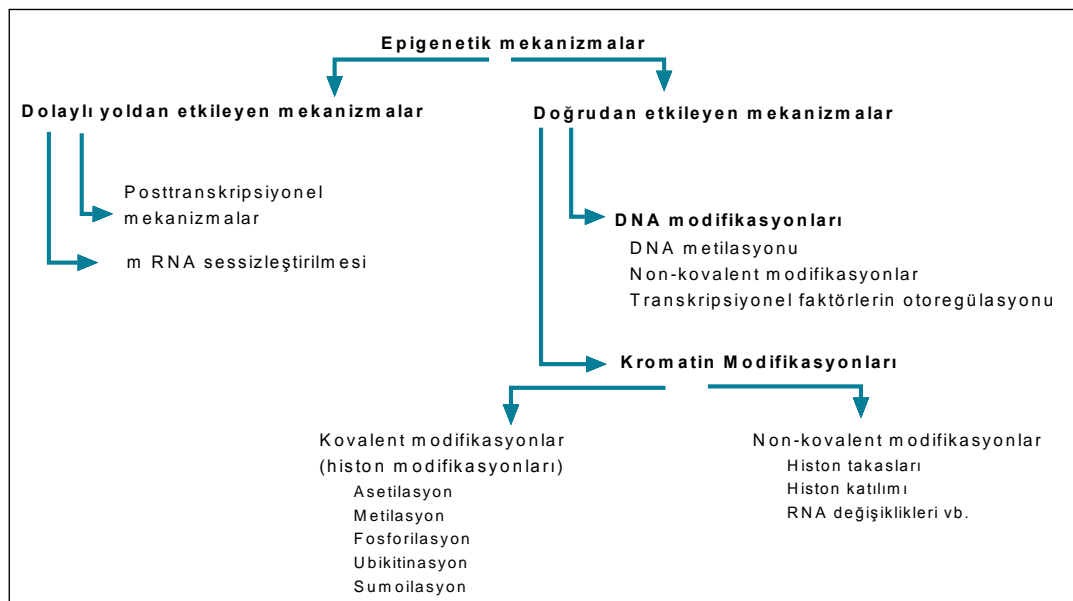
Hipokampusün uzaysal öğrenmedeki rolünü tam olarak açıklamak için yapılan çalışmalarda hipokampusün fonksiyonları üç ana başlık altında toplanmıştır. Bunlardan ilki mekansal verilerin yorumlanmasıdır. Hayvan mekansal verileri, pozisyonları, konumları öğrenirken hipokampus aktif durumdadır. Buna örnek olarak, saklı bir platformun öğrenildiği Morris su labirenti, bir yerin kötü olduğunun öğrenildiği korku koşullama ve bir yerin diğerinden farklı olduğunun öğrenildiği bağlamın ayırımı (*context discrimination*) sayılabilir. Bu testler süresince yapılan kayıtlarda hipokampüste belli bir hücre grubunun aktif olduğu fark edilmiş ve bu hücre grubuna *place cell* adı verilmiştir; bu hücreler hipokampal piramidal nöronlardır. İkinci fonksiyon ise zamanlama (*timing*)'dır. Epizodik belleğin kodlanmasında hipokampus görev yapar. Kişinin hayatındaki önemli olayların ya da bireysel deneyimlerinin zamansal ilişkisini kodlar ve sıralar. Ayrıca iki uyarı arasındaki zamansal ilişkiyi kurmada da hipokampus görev alır. Üçüncü fonksiyon ise çoklu bağlantıları (*multimodal associations*) kurmaktır. Hipokampus farklı duysal girdileri düzenler, birbiriyle ilişkilendirir ve kodlar. Bir

uyarının yeri, kokusu, tadı, bir ödül ya da ceza ile sonuçlanması gibi birçok farklı yönü hipokampus tarafından değerlendirilir ve uyarıyla eşleştirilir (34).

## EPIGENETİK TANIMI

Kelime anlamı olarak incelendiğinde genetik üstü anlamına gelen epigenetik terimi ilk kez 1940'larda Conrad Hal Waddington tarafından kullanılmıştır. Waddington'a göre epigenetik, genetiğin fenotipi nasıl oluşturduğunu inceleyen bir biyolojik bilim dalıdır (35). *Epigenetik* tanımı günümüzde 'sadece DNA dizisindeki değişikliklerle açıklanamayan, mitoz ve mayoz bölünmelerle aktarılabilen, gen fonksiyonundaki değişiklikler' şeklinde tanımlanmaktadır (36). Epigenetik farklı açılardan incelendiğinde, birbiriyle yakın ilişkili üç ayrı noktaya dikkat çekilebilir. Bunlardan birincisi mayoz ve mitoz bölünmelerde bilginin iletiminin sadece DNA dizisiyle ilgili olmadığı, bunun ayrıca proteinlerle de ilişkili olduğudur (37). Gelişim biyolojisi alanında yapılan tanımda ise gen ekspresyonundaki kalıtsal bazı mitotik ya da mayotik değişikliklerin sadece DNA zinciri üzerinde kodlanmadığını, ekspresyonun farklı şekillerinde DNA, RNA ya da proteinler üzerinde farklı belirleyici mekanizmaların olduğuna yer verilmiştir (38). Vurgulanan üçüncü önemli nokta ise DNA ya da DNA ile ilişkili proteinlerde meydana gelen fiziksel işaretlenmelerle genotipik olarak aynı olan hücrelerin, fenotipik olarak farklı olabileceğidir (39).

Genel olarak düşünüldüğünde epigenetik değişiklikler kromatin yapının düzenlenmesi anlamına gelir. Doğrudan DNA üzerinde ya da DNA ile ilişkili proteinler üzerinde meydana gelir (40). Epigenetik mekanizmalar Şekil 3'deki gibi gruplandırılabilir.

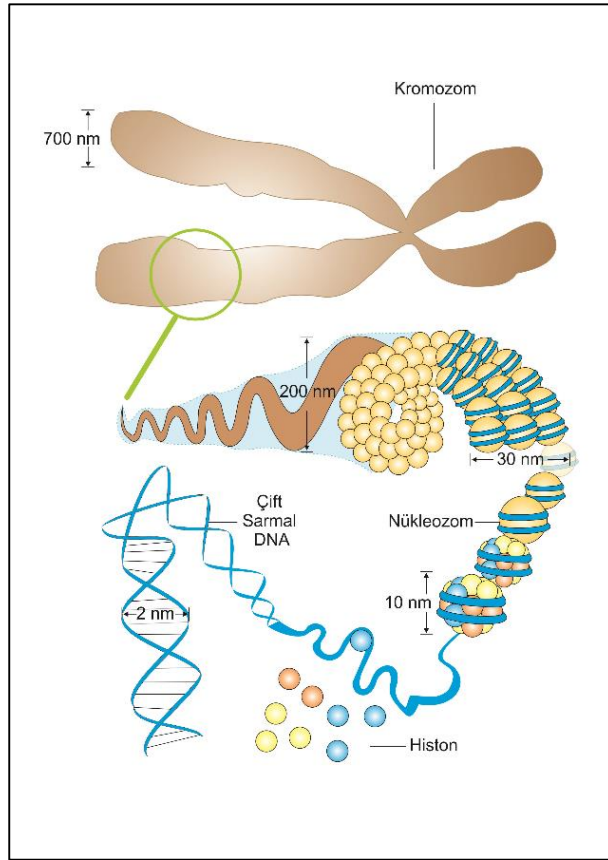


Şekil 3. Epigenetik değişikliklerin sınıflandırılması (40)

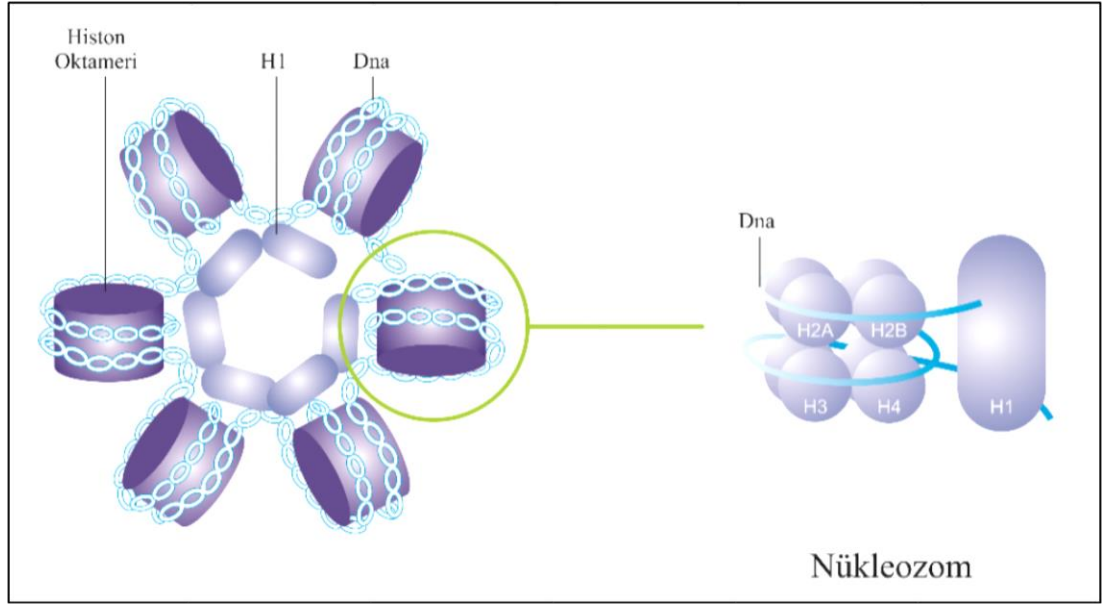
## Kromatin Yapısı ve DNA

Her bir insan kromozomundaki DNA uzunluğu 19.000 ile 73.000  $\mu\text{m}$ 'dir. Hücre çekirdeğinde bulunan toplam 46 kromozom yaklaşık 2 metre DNA içerir. DNA'nın tamamı ve ilişkili olduğu proteinler hücre çekirdeğine sığmak durumundadır. Bu nedenle DNA ve proteinler özel bir yerleşim izler. Mitoz bölünmenin interfaz safhasında genetik materyal ve proteinler çekirdek içinde dağınık biçimdedir ve bu yapıya kromatin denir. Mitoz bölünme başladığında kromatin yapı yoğunlaşmaya başlar ve metafazda bilinen kromozom yapısını alır. Ökaryotik kromatin yapısında çok fazla miktarda protein DNA ile etkileşim içindedir. Kromatin yapının içindeki proteinleri, bazık artı yüklü *histon proteinleri* ve daha az pozitif yüklü *histon olmayan proteinler* olarak gruplandırabiliriz (41,42). Kromozom yapısı ve DNA paketlenmesi Şekil 4'te gösterilmiştir.

Ökaryotlarda genom organizasyonunun ilk seviyesi nükleozom olarak bilinen dinamik bir nükleoprotein kompleksidir. Şekil 5'te görüldüğü gibi, nükleozom, histon proteinlerinden oluşan bir çekirdek etrafına sarılmış DNA ve bağlayıcı histon proteininden oluşur.



Şekil 4. Kromozom yapısı ve DNA paketlenmesi



**Şekil 5. Histone oktameri ve nükleozom yapısı**

Histon proteinlerinden oluşan çekirdeğe histone oktameri denir ve bu yapı ikişer adet H2A, H2B, H3 ve H4'den meydana gelmektedir. 147 baz çiftlik bir DNA parçası da histone oktameri etrafına yaklaşık 1,65 dönüş sarılmıştır (41).

Histon proteinleri basit yapılı, bazik özellikli proteinlerdir. Canlıların çoğunda, histone proteinlerini kodlayan genlerin birçok kopyası mevcuttur. Bu gen dizileri birbirleriyle oldukça benzerdir ve genellikle hücre döngüsünün S fazında eksprese olurlar (43). Yeni sentezlenen histone proteinleri, yeni sentezlenen DNA'nın paketlenmesi ve nükleozom yapısının oluşturulması için kullanılır (44). Histon proteinlerinin farklı alt tipleri bulunur ve bunlar varyasyon (alt tip, variant) gösterebilir. Bazı alt tipler farklı biyofiziksel özelliklere sahiptirler ve nükleozom yapısındaki değişikliklere yardımcı olurlar. Varyant histonlar genelde tek bir gen kopyasına sahiptirler ve hücre döngüsünün her evresinde eksprese olurlar; ekspresyonları sadece S fazında olmaz (43). Histon ana tipleri H1, H2, H3, H4'dür ve aminoasit özellikleri Tablo 2'de özetlenmiştir. Histon ana tiplerinin farklı varyantları vardır ve her varyantın özellikle bulunduğu hücre tipi ve özel görevleri vardır.

**Tablo 2. Histon ana tiplerinin özellikleri (42)**

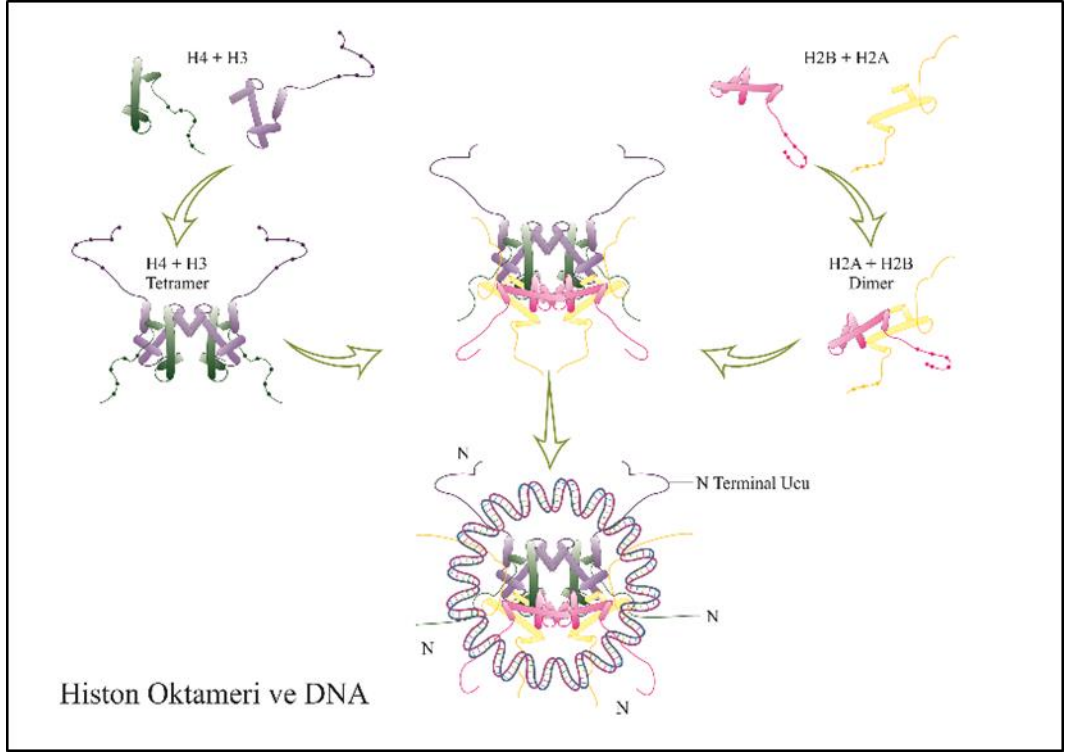
Histon Tipi	Aminoasit içeriği	Moleküler ağırlığı (dalton)
H1	Lizinden zengin	23,000
H2A	Belirli oranda lizinden zengin	14,000
H2B	Belirli oranda lizinden zengin	13,800
H3	Arjininden zengin	15,300
H4	Arjininden zengin	11,300

### **Histon Modifikasyonları**

Histonlar kromatin yapının oluşmasını sağlayan nükleozomun ana parçasıdır. Histonlar nükleozom içinde oktamer oluşturacak şekilde birbirlerine bağlanırken globüler kısımları içeride, serbest olan N-terminal uçları dışarıda kalır (45).

Kromatin yapının asıl proteinleri olmaları nedeniyle histonların hem yapısal hem de fonksiyonel görevleri bulunur. DNA, histonların etrafına sıkıca dolanarak nükleozom yapısını oluşturur. DNA'nın negatif yüklü şeker fosfat yapısı ile histonların N-terminal uçlarında bulunan pozitif yüklü lizin rezidüleri arasında oluşan elektrostatik bağ DNA ve histonlar arasındaki asıl etkileşimdir. Histonlar üzerinde meydana gelen posttranslasyonel modifikasyonlar hem N-terminal uçları üzerinde hem de histonların globüler kısmı üzerinde meydana gelebilir (36,45). N-terminal uçlarında meydana gelen asetilasyon, metilasyon, sumoilasyon, fosforilasyon gibi posttranslasyonel modifikasyonlar transkripsiyon faktörlerinin, kofaktörlerin aktivitesini etkiler, ilgili genlerin ekspresyonunu değişikliğe uğratar ve sadece buldukları bölgenin değil, tüm kromatin yapının düzenlenmesine aracılık ederler (45-47). Histon oktameri organizasyonu ve N-terminal uçlarının yerleşimi Şekil 6'da görüldüğü gibidir.

Ökaryotlarda genetik bilgi, kromatin yapının stratejik hiyerarşik organizasyonu ile yönetilir. DNA onarımı, replikasyonu, rekombinasyonu gibi süreçler sıkıştırılmış kromatin yapısı, histon ve histon olmayan proteinler tarafından yürütülür. Kromatin düzenleyici mekanizmalar, kromatinin lif yapısını gevşeterek gerekli metabolik sonuçlarla ilgili genom bölgesini serbestleştirirler (48).

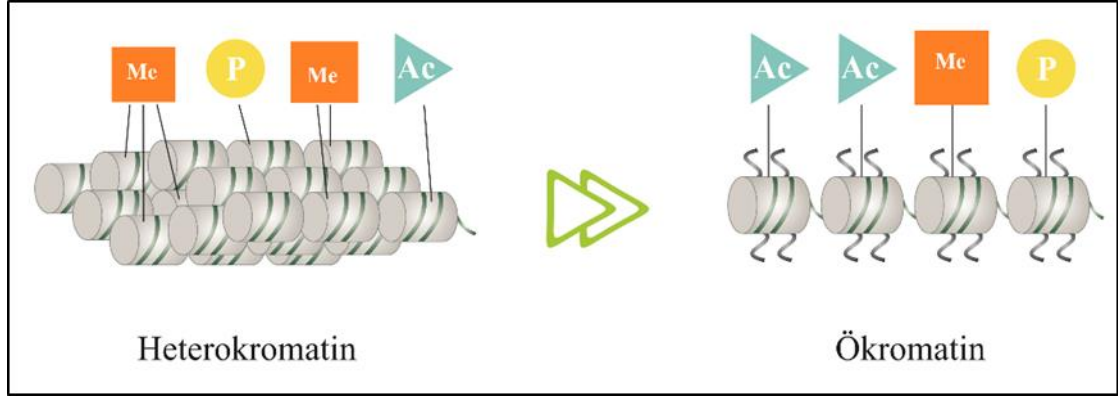


**Şekil 6. Histon oktameri ve N terminal uçları (37)**

Kromatinin açılmamış ve genetik olarak inaktif haline heterokromatin, gevşetilmiş ve protein sentezine izin veren haline ise ökromatin denir. Histonlar üzerinde meydana gelen modifikasyonlar kromatinin durumunu belirler (36,49,50). Histonların heterokromatin ve ökromatin formları Şekil 7’de görüldüğü gibidir.

### 1) Histon asetilasyonu

Histon asetilasyonu, histon modifikasyonları arasında bugüne kadar en çok çalışılan ve etkileri kısmen de olsa anlaşılan modifikasyondur. Asetilasyon histon yapısında bulunan lizin rezidüleri üzerinde meydana gelir. Reaksiyon histon asetiltransferaz (HAT) enzimi tarafından katalize edilir. HAT, asetil KoA’nın yapısında bulunan asetil grubunu lizinin  $\epsilon$ -NH grubuna transfer eder (51,52). Asetil grubunun transferiyle lizinin pozitif yükü nötralize olur ve histonla nükleotid arasındaki elektrostatik bağ zayıflar. Histon asetilasyonu geri-dönüştürülebilir bir reaksiyondur ve histonların deasetilasyonu histon deasetilaz enzimi (HDAC) ile katalize edilir (2).



**Şekil 7. Heterokromatin ve ökromatin yapıları (49)**

Asetilasyon sırasında lizinin pozitif yükünün nötralize olması yoğun halde bulunan kromatinin gevşemesine ve sonuç olarak transkripsiyona izin verir. Yapılan çalışmalarla tipik olarak histon asetilasyonunun aktif transkripsiyonla, deasetilasyonun ise inaktif transkripsiyonla ilişkili olduğu anlaşılmıştır (50,53).

## 2) Histon metilasyonu

Histon metilasyonu da asetilasyon gibi lizin rezidülerinin  $\epsilon$ -NH grubuna metil grubunun bağlanmasıyla gerçekleşir. Reaksiyon histon metiltransferaz enzimi ile katalize edilir. Ancak metilasyonun asetilasyondan iki farkı mevcuttur. Birincisi, metilasyon lizinin pozitif yükünde bir nötralizasyona sebep olmaz ve bu nedenle DNA ve histonlar arasındaki elektrostatik bağda zayıflık meydana gelmez; ikincisi ise histonlara tek bir asetilasyon grubu bağlanabilirken, bir histona üçe kadar metil grubu bağlanabilir. Metilasyon sadece lizin üzerinde değil arjinin aminoasidi üzerinde de meydana gelebilir, bu reaksiyon da protein arjinin metiltransferaz enzimi (PRMT) ile gerçekleştirilir (36,54,55).

## 3) Histon ubikitinasyon

Histon ubikitinasyonu son yıllarda dikkat çeken konulardan biridir. Ubikitin 76 aminoasitten oluşan bir proteindir ve tüm hücre tiplerinde yaygın olarak bulunması nedeniyle bu ismi almıştır. Ubikitinasyon bir posttranslasyonel modifikasyondur. Bir substratın poliubikitinasyonu, o substratın proteozomlar tarafından yıkılması için sinyal oluşturur, monoubikitinasyon ise proteozom aracılı proteolizden farklı hücresel fonksiyonlar ile ilişkili gözükmemektedir (56). Birçok histonun monoubikitinli olduğu ise yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Histonların lizin rezidülerinin  $\epsilon$ -NH grubuna ubikitinin bağlanması ile reaksiyon gerçekleşir ve yapılan çalışmalarda H1, H2A, H2B ve H3'ün ubikitinasyonu

gösterilmiştir (57,58). Histonların ubikitinasyonu birçok çalışmada gösterilmiş olduğu halde fonksiyonu hala net olarak anlaşılamamıştır (36).

#### **4) Histon sumoilasyonu**

Proteinler üzerinde ubikitinasyon benzeri birçok posttranslasyonel modifikasyon tanımlanmaktadır. Bunlara en önemli örnek SUMO (*small ubiquitin-related modifier*)'dur (59). SUMO modifikasyonları da ubikitinasyona benzer mekanizmalar ile gerçekleşir. SUMO ubikitin ile ilişkili bir protein olduğu halde, sumoilasyon, ubikitinasyon gibi proteinlerin degranulasyonları için bir sinyal değildir. Yapılan ilk çalışmalarda H4'ün sumoilasyonu ve bu durumun transkripsiyonel baskılanma ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (60).

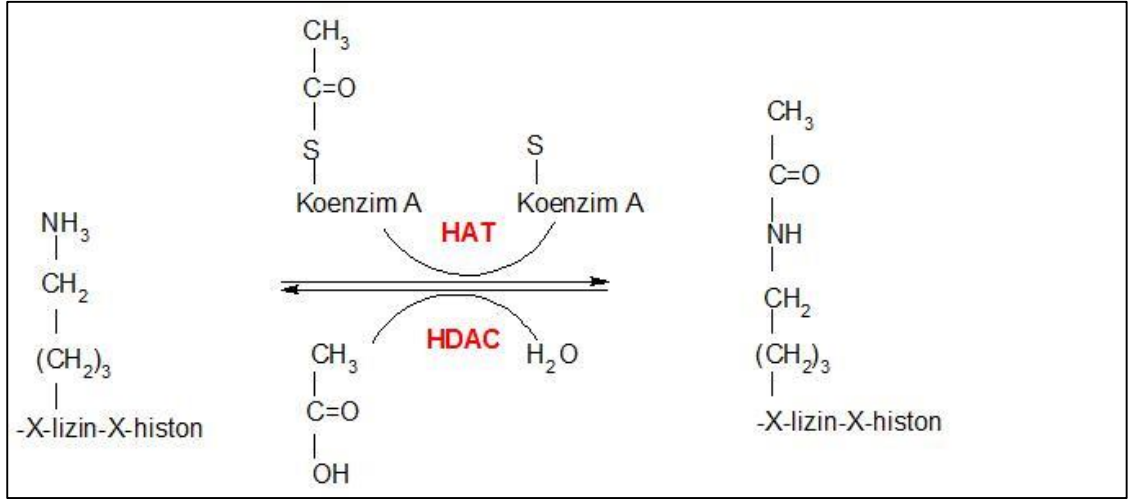
#### **5) Histon fosforilasyonu**

Mitoz bölünmede, kromozom yoğunlaşması sırasında H1 ve H3'ün fosforilasyonu tespit edilmiştir. Çalışmalarda H3'ün serin aminoasidinin fosforilasyonunun Rsk 2 (*ribosomal S6 kinase*), Msk 1 (*mitogen and stress-activated protein kinase*) ve auro kinaz aile üyesi Ipl 1 enzimleri ile katalize edildiği, defosforilasyonunun ise, diğer proteinlerde de olduğu gibi fosfatazlarla katalize edildiği gösterilmiştir. H3'ün fosforilasyonunun mitojenik sinyal yollarının aktivasyonu ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (36,61).

### **HİSTON ASETİLTRANSFERAZ VE HİSTON DEASETİLİZ ENZİMLERİ**

Histonların amino terminal uçları nükleozom yapısının dışında serbest bulunur ve bu serbest uçlarda bulunan lizin aminoasitlerine histon asetiltransferaz enzimi ile asetil grubu eklenir. Histon asetilasyonu geri dönüşümlüdür ve asetil grubu histon deasetilaz enzimi ile uzaklaştırılır (Şekil 8). HAT enzimleri transkripsiyonel koaktivatör olarak görev yapar; HDAC enzimleri ise korepresör olarak görev yapar ve transkripsiyonu baskılar (62). HAT ve HDAC enzimleri arasındaki denge genlerin aktivasyonunu ve sessizliğini belirler (63). HAT ve HDAC enzimleri sadece histonların değil histon-dışı proteinlerin asetilasyonlarını da düzenleyerek hücrede önemli etkilere yol açarlar. Protein yerleşimi, protein stabilitesi, DNA afinitesi bu etkiler arasındadır (64).





**Şekil 8. Histon asetilasyonu ve deasetilasyonu**

### **Histon Asetiltransferaz Enzim Ailesi**

Histonların asetilasyon düzeyinin transkripsiyonu regüle ettiği uzun yıllardır bilinmesine rağmen, asetilasyona aracılık eden proteinlerin keşfi uzun zaman almıştır. Bu konudaki en büyük gelişme *Tetrahymena*'dan histon asetiltransferaz enziminin klonlanması ve bu enzimin daha önceden transkripsiyon koaktivatörü olarak bilinen Gcn5'in homoloğu olduğunun anlaşılması ile başlamıştır (65). Daha sonra yapılan çalışmalarda daha önceden transkripsiyon kofaktörü olarak bilinen birçok molekülün (*CBP/p300*, *TAFII250* ve *SRC-1* vb.) HAT aktivitesine sahip olduğu anlaşılmıştır (65-67). HAT aktivitesine sahip proteinlere sekans analizi yapıldığında aile içinde büyük benzerlik gösteren, ama aralarında çok büyük farkların olduğu ailelere ayrıldığı görülmüştür (68).

Son yıllarda yapılan birçok çalışmaya rağmen, HAT enzimlerinin yapısı, fonksiyonları, alt grupları, histonlara karşı afiniteleri ya da hastalıklarla olan ilişkileri tam olarak anlaşılamamıştır (69).

### **Histon Deasetilaz Enzim Ailesi**

HDAC enzimleri, histonların N-terminal uçarındaki lizin aminoasitinden asetil grubunu uzaklaştırır. Buna ek olarak histon dışı proteinlerin de deasetilasyonundan HDAC enzimleri sorumludur. Histonların deasetilasyonu transkripsiyonel sessizlikle sonuçlanırken, histon dışı proteinlerin deasetilasyonu hücre döngüsünü ve apoptozu düzenler (68,70). Yapılan çalışmalarda 50'den fazla histon dışı proteinin HDAC enzimlerinin substratı olduğu gösterilmiştir (71).

Bugüne kadar 18 tane insan HDAC enzimi tanımlanmıştır. Bu enzimler dizi benzerliklerine dayanılarak 4 ana sınıfa ayrılmıştır. Bunlar sınıf I, II ve IV ‘klasik’ metal-bağımlı HDAC enzimleridir; sınıf III HDAC enzimleri ise metal-bağımlı olmayan enzimlerdir. Sınıf II enzim grubu da kendi içinde IIa ve IIb olarak iki alt sınıfa ayrılır (72). HDAC enzimlerinde hem sınıflar arası hem de aynı sınıf içinde bile farklı özelliklere rastlanır. Molekül ağırlıkları, hücredeki yerleşim yerleri (çekirdek, sitoplazma), bağlandıkları proteinler açısından oldukça değişkenlik gösterirler (64,72).

### **Histon Deasetilaz Enzim İnhibitörleri**

HDAC inhibitörleri, histonların ve histon dışı proteinlerin asetilasyonunu sağlayarak biyolojik aktivitelerini değiştirmektedir. HDAC inhibitörleri sayesinde histonların deasetilasyonu azalmakta ve asetilli halde kalmaktadır; böylece transkripsiyon devam etmektedir (73).

HDAC enzimleri, oldukça umut verici yeni ilaç hedefleridir. Son yıllarda birçok HDAC inhibitörü geliştirilmiştir. Bu moleküllerle ilgili özellikle onkoloji alanında birçok çalışma devam etmektedir. HDAC inhibitörleri; neoplazmlar dışında, nörodejeneratif hastalıklar, Alzheimer hastalığı, Huntington hastalığı, spinal müsküler distrofi, Parkinson hastalığı ve diyabet hastalığı için de umut vericidir (71).

Bugüne kadar FDA (*Food and Drug Administration*), tarafından sadece vorinostat (*Suberoilanolithidroksamik asit; SAHA*) ve romidepsin (*FK228*) adlı iki HDAC inhibitörüne antineoplastik ajan olarak onay verilmiştir. Ancak şu an farklı endikasyonlarda kullanılan ve faz I ve II çalışması devam eden birçok HDAC inhibitörü vardır (64,74).

**Sodyum bütirat:** Bütirik asidin sodyum tuzu olan dört karbonlu bir yağ asididir. Birçok mikroorganizmada bulunan doğal bir metabolittir. Hücre döngüsü, proliferasyonu ve apoptozda görev almaktadır (75). Sodyum bütirat sınıf I ve II HDAC enzimlerini inhibe eder (72). Sodyum bütirat histon deasetilasyonu ve fosforilasyonunu inhibe eder (71). Yapılan son çalışmalar sodyum bütiratu epigenetik etkilerinin sadece deasetilasyonun inhibisyonu ve asetilasyonun aktivasyonundan daha karmaşık olabileceğini düşündürmektedir; bu nedenle sodyum bütiratla yapılacak çalışmalara ihtiyaç vardır (75).

## EPIGENETİK VE ÖĞRENME- BELLEK

Bellek, bilgilerin beyinde saklanması için geçirilen aşamaları anlatır. İlk yapılan çalışmalar hem transkripsiyonun hem de translasyonun uzun dönem bellek yapılanması için önemli olduğunu göstermiştir. Daha sonraki çalışmalar ise uzun dönem bellek yapılanmasının farklı sinyal yolları (*MEK-ERK/MAPK*) ve bazı genlerin (*reelin, protein fosfatase1, c-fos* vb.) düzenlenmesini de içeren karmaşık bir durum olduğunu ortaya çıkarmıştır. Son yıllarda, ise uzun dönem bellek yapılanmasında genomun epigenetik işaretlenmesinin de önemli rol oynadığına dikkat çekilmektedir (2,36).

Öğrenme ve yeni anıların oluşturulması, moleküler ve hücresele düzeydeki değişikliklerle sinapslarda meydana gelen fonksiyonel ve yapısal değişimi gerektirir. Bellek oluşumunun altında yatan hücresele mekanizmanın, nöronal aktivitenin özel örüntüleri (*pattern*) olan sinaptik gücün azalması olarak bilinen uzun süreli depresyon (*long-term depression, LTD*) ve sinaptik gücün artması olan uzun süreli potansiyalizasyon (*long-term potentiation, LTP*) olduğu düşünülür (76).

Son dönemde yapılan çalışmalar uzun süreli davranışsal belleğin oluşmasında genomun epigenetik işaretlenmesinin de belirleyici olduğunu göstermiştir (77). Epigenetik mekanizmaların farklı bellek tiplerinin yapılanmasını etkileyebilmesi için çevresel uyarıların indüklediği sinyal yollarına duyarlı olması gerekir. Kromatin yapının düzenlenmesi sonucunda bellekle ilgili genlerin ekspresyonu düzenlenir. Daha açık bir deyişle epigenetik modifikasyonlar belirli bellek tipleriyle ilişkili özel beyin bölgeleri ve hücrelerdeki spesifik genlerde seçici sinyal yolları tarafından uyarılır. Gen ekspresyonunun epigenetik düzenlenmesinin bölge, zaman, tür ve ilgili sinyalleme mekanizmasına bağlı olarak çeşitli bellek tiplerinin oluşumunu etkilediğini gösteren birçok çalışma mevcuttur (45).

Örneğin, hipokampus bağımlı öğrenme modellerinden biri olan kavramsal korku koşullamada, deney hayvanı caydırıcı (*aversif, aversive*) bir uyarıdan sonra kaçınma davranışı geliştirmeyi öğrenir. Kavramsal korku koşullamada birinci saatte H3 asetilasyonunun arttığı, ancak latent inhibisyon eğitimlerinin H3 asetilasyonundaki artışı bloke ettiği ve H4'ün asetilasyonunda artışa sebep olduğu gösterilmiştir (77). Hipokampüste uzun süreli kavramsal korku koşullama belleğinin oluşması NMDA reseptörüne bağımlı sinaptik geçiş ve MEK-ERK/MAPK sinyal yolağına bağılıdır (78,79). Hipokampus CA1 bölgesinde NMDA'ya bağılı sinaptik geçiş ve ERK/MAPK sinyal yolağı histon H3 asetilasyonu için gereklidir (36). CA1 bölgesinde NMDA reseptörünün aktivasyonu *in vitro* çalışmada histon H3 asetilasyonunu artırır ve ERK sinyal yolağının inhibisyonu bu artışı bloke eder (77).

Histon asetilasyonunun öğrenme ve bellek yapılanmasında rolü olması “asetilasyonu katalize eden histon asetiltransferaz enzimi (HAT) de bu süreçlerde etkili olabilir mi” sorusunu akıllara gelmiştir. Bu soruya yanıt bulmak için yapılan çalışmalarda endojen histon asetiltransferaz aktivitesine sahip olan ve bir transkripsiyonel kofaktör olan CBP (*CREB [cAMP yanıt elemanı bağlayıcı protein] bağlayıcı protein*) aktivitesi bozulmuş transgenik fareler kullanılmıştır. CREB bir transkripsiyonel faktördür ve CRE (*cAMP yanıt elemanı*) olarak adlandırılan belirli bir DNA dizisine bağlanarak ilgili genlerin transkripsiyonunu inhibe ya da aktive eder. CBP allellerinden biri eksik olan farelerde yapılan çalışmada, deney hayvanlarının ipuçlu ve kavramsal korku koşullama testleriyle, nesne tanıma bellek testlerinde bozulmalar tespit edilmiştir. Aynı çalışmada deney hayvanlarına HDAC inhibitörü uygulanması uzun dönem bellekte meydana gelen bozulmayı düzeltmiştir (80). HAT *domaini* silinmiş mutant CBP’li farelerde yapılan başka bir çalışmada, farelerin hipokampus bağımlı kavramsal korku koşullama ve Morris su labirenti testlerinde bozulma görülmüştür, ancak amigdala bağımlı ipuçlu korku koşullama testinde bozulma olmamıştır (81).

Histon asetilasyonunun, HAT aktivitesi ile regüle edildiğini ve bu sürecin bozulmasının uzun dönem bellek yapılanmasını bozduğunu gösteren çalışmalardan sonra, kromatin yapıyı regüle eden bu süreçlerin HDAC inhibitörlerini kullanarak bellek oluşumunun *in vivo* olarak etkilenip etkilenemeyeceği sorusu akıllara gelmektedir. “Histon asetilasyonundaki artış bellek oluşumunu güçlendirebilir mi” sorusuna cevap bulmak için çalışmalar yapılmıştır. Levenson ve ark. (77) tarafından yapılan çalışmada HDAC inhibitörü sodyum bütirat sistemik olarak uygulanmış ve kavramsal korku koşullama testinde uzun dönem bellek oluşumunda artış olduğu görülmüştür. Yine benzer amaçla yapılan başka bir çalışmada HDAC inhibitörü intrahipokampal uygulanmış ve kavramsal korku koşullama testinde uzun dönem bellek yapılanmasında artış bulunmuştur (82).

Bellek yapılanmasının epigenetik düzenlenmesine ait çalışmaların çoğunluğu korku koşullama, Morris su labirenti, nesne tanıma gibi hipokampus bağımlı bellek testleriyle yapılmıştır. Genel olarak hipokampal testler histonların ökromatin yapı ile ilişkili posttranslasyonel modifikasyonlarının global artışı ve gen ekspresyonunun pozitif regülasyonu ile ilişkilidir (45). Morris su labirentinde yapılan başka bir çalışmada ise H4 lizin 12’nin asetilasyonunun ve H2B’nin asetilasyonunun arttığı bildirilmiştir (83).

Hipokampus bağımlı bellek testlerinde, histon asetilasyonu ve öğrenme-bellek yaygın olarak çalışılmasına rağmen, öğrenme ve bellek oluşumunda etkili olan tek epigenetik mekanizma bu değildir. Prefrontal korteks, amigdala, entorinal korteks, dentat girus gibi beyin

bölgelerindeki epigenetik değişiklikleri gösteren, sadece histon asetilasyonuna değil histon metilasyonu, fosforilasyonu ve DNA metilasyonuna dikkat çeken birçok çalışma da mevcuttur (79,84-86).

## **GEREÇ VE YÖNTEMLER**

Bu çalışma Trakya Üniversitesi Hayvan Deneyleeri Yerel Etik Kurulu tarafından 03.07.2012 tarih ve 5 no'lu oturumda 2012/ 05/ 10 karar no'su ile onaylandı (Ek1). İlk deney planında yaşanan hayvan kayıpları nedeniyle 2014/ 07/ 04 karar no'su ile Trakya Üniversitesi Hayvan Deneyleeri Yerel Etik Kurulu'nun 27.06.2014 tarihindeki 7 no'lu oturumunda deney planında değişiklik yapıldı (Ek2). Çalışmamız İyi Laboratuvar Uygulamaları Kılavuzu ve Hayvan Etiği Evrensel İlkelerine uygun gerçekleştirildi. Bu çalışmanın *Turnitin* programına göre orjinallik raporu ektedir (Ek3). Bu çalışma Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi tarafından TÜBAP 2012/210 kayıt numarası ile desteklenmiştir.

### **DENEKLER**

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

### **DENEY PLANI VE ÇALIŞMA GRUPLARI**

Deneyde hayvanlar 15 grupta toplandı ve her grup 10 hayvandan oluştu. Deneklerin uzaysal öğrenme ve bellek fonksiyonları Morris su labirentinde değerlendirildi. Morris su labirenti testlerinden 90 dk sonra alınan beyin dokularından immunohistokimya (İHK) analizleri planlandı. Eğitimlerle ötenazi arasındaki zaman benzer çalışmalara göre belirlendi (85).

Grup sayısının fazla olması nedeniyle deney planını 3 ana bölümde incelemek faydalı olacaktır. Deneyin ilk bölümü Grup A-G'den oluşmaktadır. Bu gruplarda ardışık günlerde yüzme eğitimleri sonucunda, deneklerin öğrenme ve bellek davranışları ile hipokampus CA1 bölgesinde histon H2B ve bu histonun asetilenmiş formunun düzeyinde değişiklik olup olmadığı incelendi.

Grup H-K'dan oluşan 2. bölümde grup H ve I sırasıyla grup J ve K'nin kontrolleri olarak planlandı ve çözücü olarak kullanılan %0,9 NaCl enjekte edildi. Grup J ve K'ya ise sırasıyla yüzme eğitiminden 30 dk önce veya 30 dk sonra 1,2 gr/ kg dozunda sodyum bütirat intraperitoneal yoldan uygulandı. Deneyin 3 bölümünü oluşturan grup L-O' da ise grup L ve M sırasıyla grup N ve O'nun kontrolleri olarak planlandı. Bu dört grupta histon deasetilaz inhibitörü olan sodyum bütiratın yüzme öncesi skopolamin uygulanan hayvanlarda etkisini görmek için, 0,5 mg/kg dozunda skopolamin intraperitoneal yolla deneklere yüzme eğitimlerinden 30 dk önce uygulandı. Bu gruplardaki deneklere skopolamine ek olarak sırasıyla ya çözücü (%0,9 NaCl) ya da sodyum bütirat enjekte edildi. Deney grupları aşağıda daha ayrıntılı olarak anlatılmıştır ve Şekil 9'da şematize edilmiştir.

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

GRUP B: 1 gün eğitim aldı ve 90 dk sonra ötanazi yapıp beyin dokusu alındı.

GRUP C: 2 gün eğitim aldı ve 90 dk sonra ötanazi yapıp beyin dokusu alındı.

GRUP D: 3 gün eğitim aldı ve 90 dk sonra ötanazi yapıp beyin dokusu alındı.

GRUP E: 4 gün eğitim aldı ve 90 dk sonra ötanazi yapıp beyin dokusu alındı.

GRUP F: 5 gün eğitim aldı ve 90 dk sonra ötanazi yapıp beyin dokusu alındı.

GRUP G: 5 gün eğitim aldı, 6. gün *probe* testi yapıldıktan 90 dk sonra ötanazi yapıp beyin dokusu alındı.

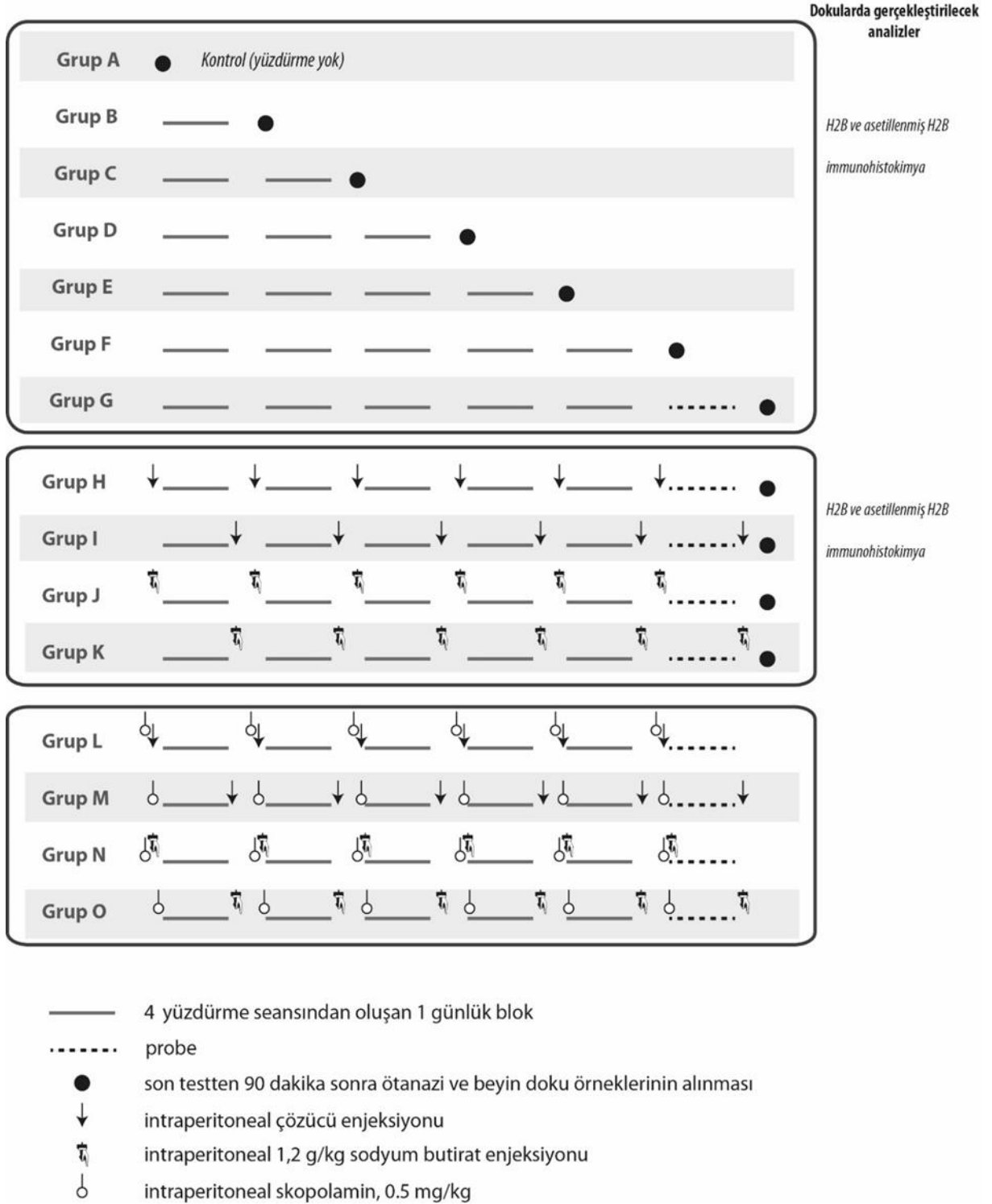
GRUP H: Her gün eğitim öncesi çözücü verilen grup. Bu gruptaki hayvanlar 5 gün süreyle yüzdürüldü ve 6.gün *probe* testi yapıldıktan 90 dk sonra ötanazi yapıp beyin dokusu alındı.

GRUP I: Her gün eğitim sonrası çözücü verilen grup. Bu gruptaki hayvanlar 5 gün süreyle yüzdürüldü ve 6.gün *probe* testi yapıldıktan 90 dk sonra ötanazi yapıp beyin dokusu alındı.

GRUP J: Her gün eğitim öncesi sodyum bütirat verilen grup. Bu gruptaki hayvanlar 5 gün süreyle yüzdürüldü ve 6.gün *probe* testi yapıldıktan 90 dk sonra ötanazi yapıp beyin dokusu alındı.

GRUP K: Her gün eğitim sonrası sodyum bütirat verilen grup. Bu gruptaki hayvanlar 5 gün süreyle yüzdürüldü ve 6.gün *probe* testi yapıldıktan 90 dk sonra ötanazi yapıp beyin dokusu alındı.

## DENEY PLANI



Şekil 9. Deney planı



GRUP L: Her gün eğitim öncesi skopolamin ve çözücü verilen grup. Bu gruptaki hayvanlar 5 gün süreyle yüzdürüldü ve 6.gün *probe* testi yapıldıktan 90 dk sonra ötanazi yapıp beyin dokusu alındı.

GRUP M: Her gün eğitim öncesi skopolamin ve eğitim sonrası çözücü verilen grup. Bu gruptaki hayvanlar 5 gün süreyle yüzdürüldü ve 6.gün *probe* testi yapıldıktan 90 dk sonra ötanazi yapıp beyin dokusu alındı.

GRUP N: Her gün eğitim öncesi skopolamin ve sodyum bütirat verilen grup. Bu gruptaki hayvanlar 5 gün süreyle yüzdürüldü ve 6.gün *probe* testi yapıldıktan 90 dk sonra ötanazi yapıp beyin dokusu alındı.

GRUP O: Her gün eğitim öncesi skopolamin ve eğitim sonrası sodyum bütirat verilen grup. Bu gruptaki hayvanlar 5 gün süreyle yüzdürüldü ve 6.gün *probe* testi yapıldıktan 90 dk sonra ötanazi yapıp beyin dokusu alındı.

Deney hayvanlarına gruplarına uygun olarak yüzme eğitimlerinden ya da *probe* testinden 90 dk sonra 600 mg/kg kloral hidrat ile anestezi uygulandı. Anestezi derinliği sağlandıktan sonra deney hayvanları giyotin ile sakrifiye edildi. Beyin dokuları hızla çıkarıldı. Paxinos ve Watson'ın sıçan beyin atlasına (87) uygun olarak beyin dokuları kesildi. İHK analizleri için alınan beyin yarısı %10'luk formaldehit ile fikse edildi.

## **İLAÇLAR**

Skopolamin (Tocris) ve sodyum bütirat (Merck) intraperitoneal yoldan uygulandı.

Deneklerin ötenazisi için kloral hidrat (Merck) kullanıldı. Skopolamin ve sodyum bütirat %0,9 NaCl içinde, kloral hidrat ise distile su içinde çözüldü. Uygulanılan tüm ilaçlar ve çözücü 0,1 ml/100 gr vücut ağırlığı olacak şekilde hesaplandı.

## **MORRİS SU LABİRENTİ ÇALIŞMALARI**

Çalışmada kullanılan sıçanlar Trakya Üniversitesi Deney Hayvanları Birimi'nden temin edildi. Tüm hayvanlar yüzme eğitimlerine başlamadan bir gün önce anabilim dalı laboratuvarımıza getirildi ve deneyleri süresince orada barındırıldı. Deneylere başlamadan bir gün önce tüm hayvanların ağırlıkları tartıldı ve kuyruklarına gruplarına uygun renklerde numaraları yazıldı. Bütün sıçanlara, kendi deney günlerinden bir gün önce alışma yüzmesi yaptırıldı.

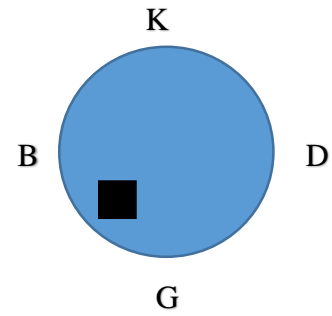
Morris su labirenti düzeneği; çağı 1,5 metre derinliği 45 cm olan daire şeklinde bir havuz ve su yüzeyinin 2 cm altında saklı bulunan 10x10 cm boyutunda bir platformdan oluşur. Platform, eğitim yüzdürmelerinin (*trial*) yapıldığı günlerde sabit bir noktada tutuldu, bellek testinin (*probe, retention*) yapıldığı gün ise platform havuzdan çıkarıldı. Su tankı platformun görülmemesi için siyah boya atılarak 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, deney süresince aynı giysilerin giyilmesine, odada sessiz olunmasına ve denekler için ekstra bir uyaran oluşturmamaya dikkat edildi.

Deneyin eğitim yüzdürmelerinde (*trial*) sıçanlar her gün, günde 4 kez farklı yönlerden havuza bırakıldı (Tablo 3). Sıçanların 60 saniye içinde saklı platformu bulmaları beklendi. Platformu bulduktan sonra platform üzerinde yaklaşık 15 saniye kalmaları sağlandıktan sonra havuzdan alındılar. 60 saniye içinde platformu bulamayan sıçanlara yardım edilerek platformu bulmaları sağlandı ve yaklaşık 15 saniye platform üzerinde kaldıktan sonra havuzun dışına alındılar. Bellek testinde (*probe*) platform havuzdan çıkarıldı ve sıçanlar daha önce suya hiç bırakılmadıkları kuzeydoğu yönünden havuza bırakıldılar ve 60 saniye boyunca yüzdüler.

Tüm yüzme eğitimleri havuzun merkezi hizasında tavana yerleştirilen bir video kamera ile bilgisayara aktarıldı ve Ethovision XT 9.0 (Noldus, Hollanda) yazılımı kullanılarak analiz edildi. Eğitim yüzmelerinden, platforma ulaşana kadar geçen süre, platforma ortalama uzaklık, yüzme hızı ve tigmotaksi parametreleri hesaplandı. *Probe* yüzmelerinde ise hedef kadrana (güneybatı) ulaşana kadar geçen süre, hedef kadranda (güneybatı) geçirilen süre, platformun olması gereken alana ortalama uzaklık, yüzme hızı ve tigmotaksi verileri hesaplandı.

**Tablo 3. Sıçanların havuza bırakıldıkları yönler**

GÜN	EĞİTİM 1	EĞİTİM 2	EĞİTİM 3	EĞİTİM 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
PROBE	KD			



(K: kuzey, D: doğu, G: güney, B: batı)

## İMMUNOHİSTOKİMYA ANALİZLERİ

İmmunohistokimya; immunolojik ilkelere dayanarak, varlığı araştırılan antijenlere karşı geliştirilmiş, poliklonal veya monoklonal antikolar aracılığı ile dokudaki antijeniteyi gösteren bir yöntemdir. Histonlar hücre içinde nükleusta yaygın olarak bulunan proteinlerdir. Bu çalışma Histon 2B ve Asetilli Histon 2B proteinlerini gösterebilmek için sırasıyla Anti-Histon H2B antikorunu (Millipore MABE15) ve Anti-Histon H2B Asetil-Lizin5 antikorunu (Lifespan LS-C49727) kullanıldı. Hipokampus CA1 bölgesini en iyi örnekleyen parafin bloklardan 4 µm kalınlığında kesitler hazırlanarak pozitif şarjlı lamlara alındı. Kesitlere deparafinizasyon uygulandı, daha sonra antikor geri kazanımı işlemi yapıldı ve primer antikolar ile muamele edildi. Her iki primer antikor 1/500 dilüsyonda kullanıldı. Antikorlar distile su ile yıkanarak uzaklaştırıldıktan sonra lamlar PBS ile yıkandı. Sonra lamlara biotine bağlanacak olan işaretleyici solüsyonu *Anti-Polyvalent Biotinylated* antikor damlatıldı ve 20 dakika bekletildi. Lamlar tekrar PBS ile yıkandıktan sonra *Streptavidin biotinylated peroxidase-complex* ile 20 dakika daha bekletildi. AEC substrate damlatılarak 10 dakika bekletildikten sonra lamlar musluk suyunda yıkandı ve Harris hematoksilen solüsyonunda 1.5-2 dakika tutularak zıt boyama yapıldı. Bu basamakların sonunda lamlara morartma işlemi uygulanıp yıkandıktan sonra lamellerle kapatıldı.

Yapılan immunohistokimyasal işlemlerden sonra preparatlar deney gruplarını bilmeyen tamamen kör bir patolog tarafından değerlendirildi. Örnekler değerlendirilirken histolojik skorlama (HSCORE) kullanıldı. Değerlendirme rastgele seçilen beş alanda x20 objektifte yapıldı. Skorlama yapılırken hücrelerin boyanma yüzdesi ve boyanma şiddeti kullanıldı.

## İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Verilerin sunulmasında tanımlayıcı istatistiksel analiz kullanıldı. Yüzme eğitimlerinden elde edilen veriler, tekrarlayan ölçümler iki yönlü analiz varyans (ANOVA) ve *post hoc Bonferroni* testleri ile analiz edildi. *Probe* verileri ise tek yönlü varyans analizi ve *post hoc Bonferroni* testiyle analiz edildi. İHK skorlarının istatistiksel ölçümleri için ilk gruplarda (A-G) tek yönlü analiz (ANOVA) ve *post hoc Bonferroni*, diğer gruplarda ise iki yönlü analiz (ANOVA) ve *post hoc Bonferroni* testleri kullanıldı.

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

## BULGULAR

Sıçanlar, havuzdaki gizli platformun yerini öğrenebilmeleri için 5 gün boyunca her gün, günde 4 kez farklı yönlerden havuza bırakılarak yüzdürüldü. Bir günde tamamlanan 4 yüzme sonucu elde edilen verilerin ortalamaları hesaplandı. Bulunan ortalama değerler günlük bloklar olarak kullanıldı. Beş gün boyunca yapılan eğitim yüzmelerinden (*trial*) elde edilen sonuçlarla sıçanların öğrenme eğrileri elde edildi. Beş günlük eğitimin ardından, altıncı günde platform havuzdan çıkarılarak hayvanlar daha önce hiç bırakılmadıkları bir yönden havuza bırakıldı ve 60 saniye yüzdürüldü (*probe test, retention*). Bu testte elde edilen veriler, sıçanların uzun süreli uzaysal bellek oluşumları hakkında bilgi vermektedir.

Çalışmamızda elde edilen veriler dört ana grup altında değerlendirilmiştir. İlk bölümde Morris su labirentindeki yüzme eğitimleri ile histon asetilasyonu arasındaki ilişkiyi incelediğimiz bulgular verilmiştir. İkinci bölümde, HDAC inhibitörü sodyum butiratın öğrenme ve uzun dönem bellek üzerine olan etkileri sunulmuştur. Üçüncü bölümde, yüzme eğitimleri öncesi skopolamin uygulamasının sıçanların öğrenme ve uzun dönem bellek fonksiyonları üzerindeki etkileri gösterilmiştir. Son bölümde ise sodyum butiratın yüzme eğitimleri öncesi skopolamin alan sıçanlar üzerindeki etkilerinin incelendiği sonuçlar sunulmuştur.

## UZAYSAL ÖĞRENME VE HİSTON ASETİLASYONU İLİŞKİSİ

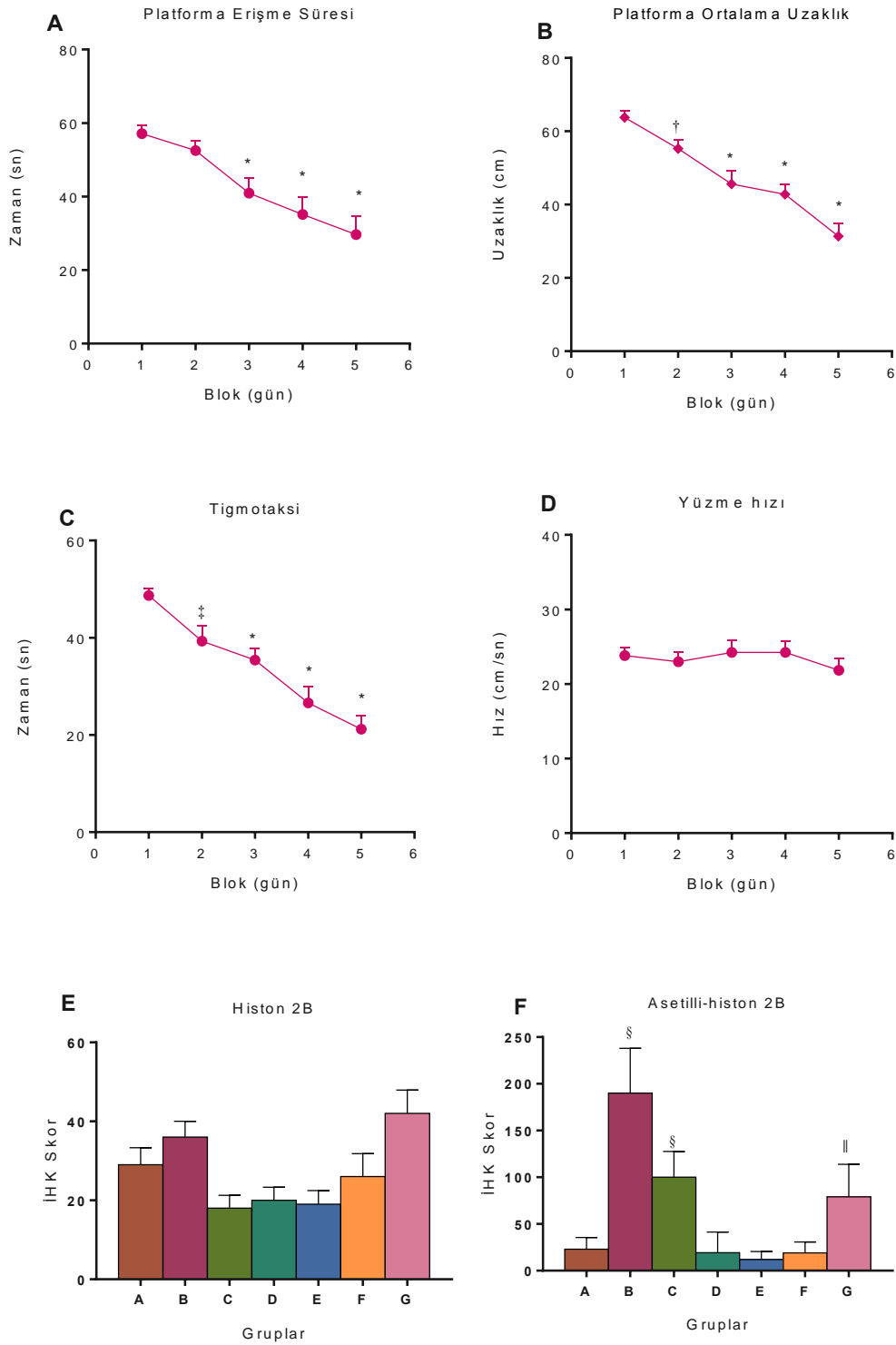
Hiçbir ilaç uygulaması yapılmadan 5 gün boyunca yüzdürülen ve 6. gün *probe* testi uygulanan G grubunun öğrenme verileri (ilk beş güne ait) Şekil 10'da gösterilmiştir.

Platform alanına erişme süresinde deneyin üçüncü gününden itibaren belirgin bir azalma ( $p<0,001$ ) olmuştur (Şekil 10A). Platform alanına ortalama uzaklıkta ise deneyin ikinci gününden itibaren istatistiksel olarak anlamlı ( $p<0,05$ ) azalma başlamış ve üçüncü günden itibaren azalma daha belirgin ( $p<0,001$ ) olmuştur (Şekil 10B). Bu, sıçanların platformun yerini öğrendiklerini ve giderek daha kısa sürede ve daha az mesafe yüzerek platform alanına ulaştıklarını göstermektedir.

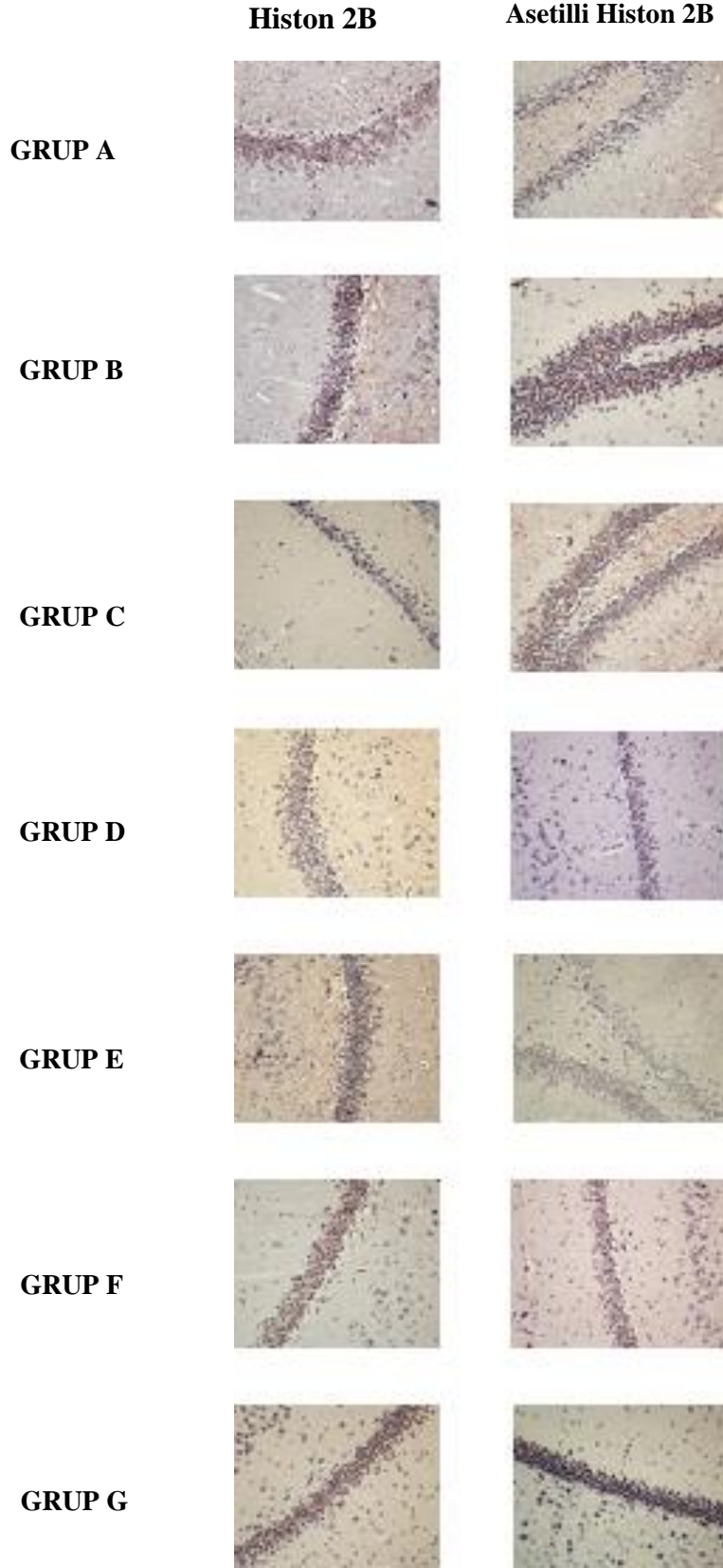
Sıçanlar yüzme eğitimlerinin ilk gününde havuzdan kaçabilmek için bir yer arar ve havuzun kenarına yakın yüzerler. Havuzun kenarına 10 cm'lik uzaklıktaki alan perimetre olarak tanımlanır ve sıçanın bu bölgede yüzmesi *thigmotaxis* (tigmotaksi, dokunsal yönelme) olarak adlandırılır. İlk günlerde, hayvanlar platformun havuzdan çıkabilmeleri için bir yol olduğunu öğrenemezler ve tigmotaksi gösterirler. Yüzme eğitimleri ilerledikçe deney hayvanında tigmotaksinin azalması beklenir; bu, hayvanın içinde bulunduğu sorunu çözdüğü ve platformun havuzdan çıkmak için bir yol olduğunu anladığını gösterir (88). G grubunun verilerine bakıldığında tigmotaksi sürelerinde ikinci günden itibaren istatistiksel olarak anlamlı bir azalma ( $p<0,001$ ) görülmektedir ve bu azalma üçüncü günden itibaren ( $p<0,001$ ) artmaktadır (Şekil 10C).

Deney süresince sıçanların yüzme hızları değerlendirildiğinde, yüzme hızları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik olmamıştır (Şekil 10D) Bu, diğer verilerde elde edilen değişimlerin yüzme hızında meydana gelen herhangi bir değişime bağlı olmadığını gösterir.

Kontrol grubu (Grup A), yüzdürülüp ardışık günlerde beyin dokuları alınan gruplar (Grup B, C, D, E, F) ve 6. gün *probe* testi uygulanan G grubundan alınan beyin dokularında yapılan immunhistokimyasal inceleme sonucunda elde edilen Histon 2B ve Asetilli-Histon 2B skorları Şekil 10E ve Şekil 10F'de gösterilmiştir. Hipokampus CA1 bölgesinden alınan kesitlerdeki İHK fotoğrafları Şekil 11'de verilmiştir. Yapılan immunohistokimyasal inceleme sonucunda total histon 2B seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik izlenmemiştir. Asetilli H2B (lizin 5) seviyelerinde ise B, C ve G gruplarında kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı bir fark (tüm karşılaştırmalar için,  $p<0,001$ ) vardı.



**Şekil 10. G grubunun ilk beş gündeki öğrenme verileri ve A-G gruplarının İHK skorları: A- Platforma erişme süresi, B- Platforma ortalama uzaklık C-Tigmotaksi, D- Yüzme hızı, E-Histon 2B İHK skorları, F-Asetilli-Histon 2B İHK skorları.**  
 (\*:  $p < 0,001$ , †:  $p < 0,05$ , ‡:  $p < 0,01$ , birinci gün değerine karşı. §:  $p < 0,001$ , ||:  $p < 0,05$ , A grubuna karşı, tek yönlü analiz ANOVA *post hoc Bonferroni*. Grafiklerdeki dikey çizgiler standart hatayı göstermektedir).



**Şekil 11. Sıçan hipokampüsü CA1 bölgesinde Histon 2B ve Asetilli Histon 2B'nin immunhistokimya fotoğrafları (X 200 büyütmede)**

## SODYUM BÜTİRATIN UZAYSAL ÖĞRENME ÜZERİNE ETKİLERİ

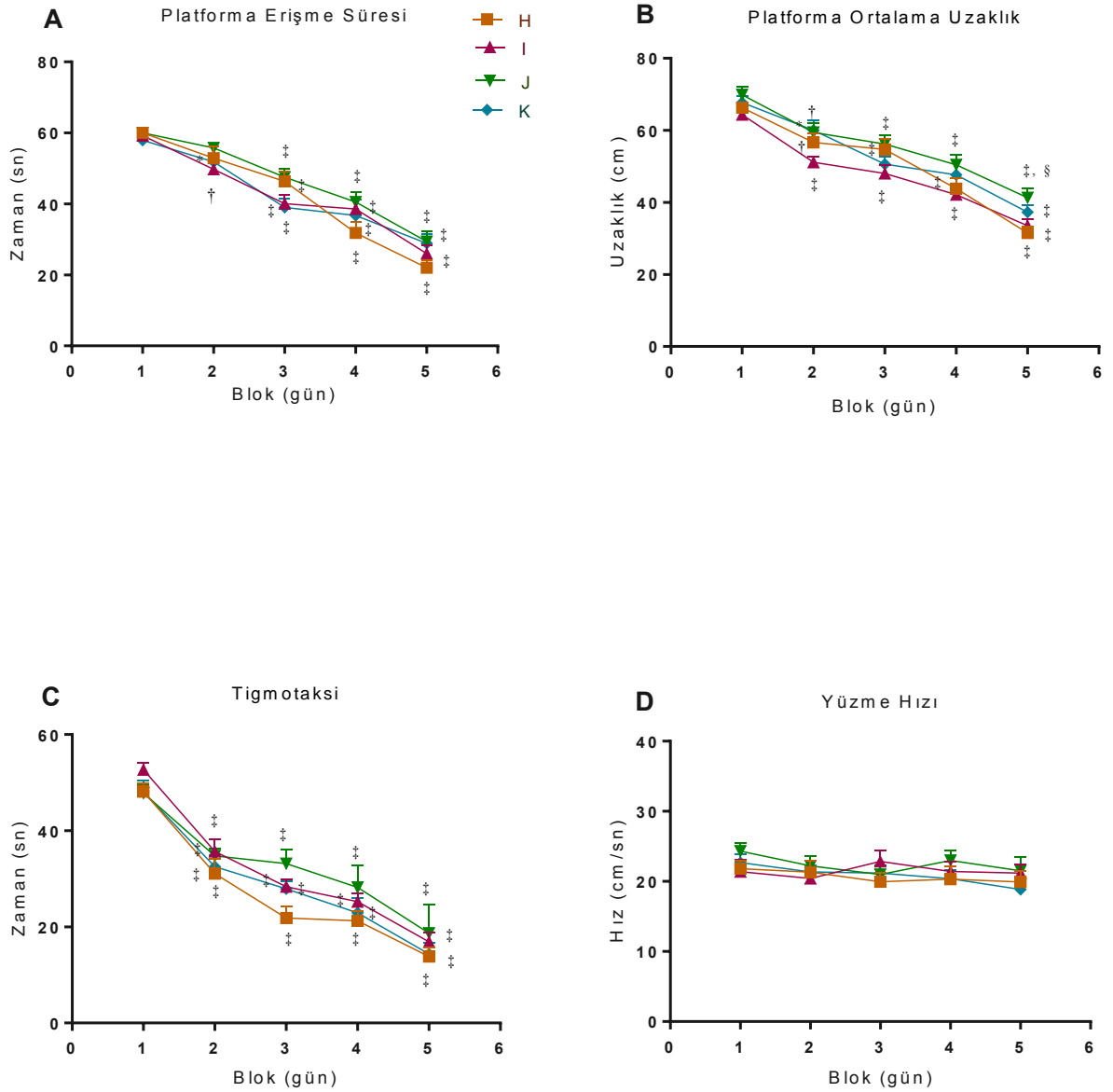
Platforma erişme süresi açısından incelendiğinde grupların tümü, 5 gün boyunca giderek daha kısa bir sürede platformu buldular (Şekil 12A). Platforma erişme süresi üçüncü günden itibaren istatistiksel olarak daha anlamlıydı ( $p<0,001$ ). Platforma erişme süresi açısından sodyum bütiratın istatistiksel olarak anlamlı bir etkisi olmadı. Sodyum bütiratın eğitim öncesi ya da eğitim sonrasında uygulanmasında da anlamlı bir değişiklik izlenmedi.

Kontrol grupları (H ve I) ve eğitim öncesi (J) ya da eğitim sonrası (K) sodyum bütirat alan grupların hepsinde platforma ortalama uzaklıkta ikinci günden itibaren belirgin azalma oldu (Şekil 12B). Bu azalma, tüm gruplarda dördüncü ve beşinci günlerde en fazlaydır ( $p<0,001$ ). Bu, sıçanların gizli platformun yerini öğrendiklerini ve giderek daha yakın yüzdükleri anlamına geliyordu. Ancak sodyum bütirat uygulanan gruplarda (J ve K) kontrol gruplarına (H ve I) göre anlamlı bir değişiklik olmadı. Hatta deneyin 5. gününde yüzme öncesi sodyum bütirat alan J grubunda platforma ortalama uzaklık H grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı yüksekti ( $p<0,05$ ).

Tigmotaksi kontrol grupları (H ve I) ile sodyum bütirat gruplarında (J ve K) deney süresince azaldı (Şekil 12C). Bu azalma tüm gruplarda ikinci günden itibaren istatistiksel olarak anlamlıydı ( $p<0,001$ ). Ancak sodyum bütirat gruplarıyla kontrol grupları arasında tigmotaksi süresinin azalmasında bir farklılık gözlenmedi.

Deney süresince yüzme hızı açısından değerlendirildiğinde grupların hiçbirinde belirgin bir değişiklik görülmedi (Şekil 12D).





**Şekil 12. Sodyum bütiratın öğrenme üzerine etkileri: A- Platforma erişme süresi B-Platforma ortalama uzaklık, C-Tıgnotaksi, D- Yüzme hızı**

(\*:  $p < 0,05$ , †:  $p < 0,01$ , ‡:  $p < 0,001$ , birinci gün değerine karşı, §:  $p < 0,05$ , aynı günde H grubu değerine karşı, her grup için  $n=10$ , 2 ynlü tekrarlayan analiz ANOVA, *post hoc Bonferroni*. Grafiklerdeki dikey çizgiler standart hatayı göstermektedir).

## SODYUM BÜTİRATIN UZUN DÖNEM BELLEK ÜZERİNE ETKİLERİ

*Probe* testinde; sıçanların, yüzme eğitimleri süresince platformun bulunduğu bölgede platformu aramaları beklenir. Bu uzun dönem belleğin oluştuğunun bir göstergesidir. Kontrol grupları (H ve I) ve sodyum bütirat grupları (J ve K) incelendiğinde platformun olması gereken bölgeye ortalama uzaklık açısından J ve K gruplarında minimal bir fark vardı ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi (Şekil 13A).

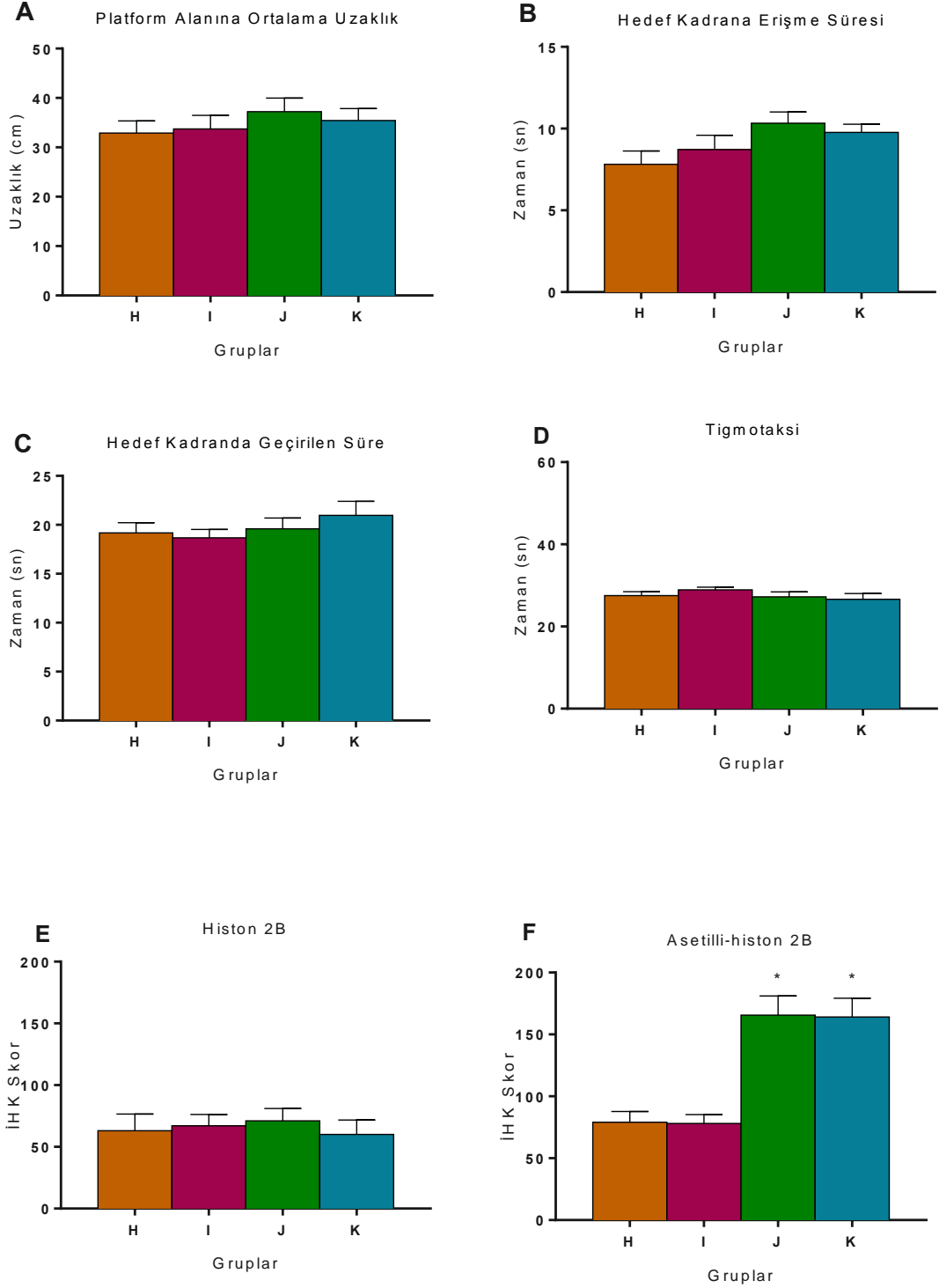
Yüzme eğitimleri süresince platformun bulunduğu kadranda, *probe* testinde hedef kadranda olarak tanımlanır. *Probe* testinde, platformun olması gerektiği kadrana ulaşana kadar geçen süre açısından değerlendirildiğinde kontrol grupları (H ve I) ve sodyum bütirat grupları (J ve K) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı (Şekil 13B).

*Probe* testinde sıçanların hedef kadranda geçirdikleri zaman bellek oluşumu için önemli bir göstergedir. Kontrol grupları (H ve I) ve sodyum bütirat grupları (J ve K) hedef kadranda geçirilen süre açısından değerlendirildiğinde sodyum bütirat gruplarında kısmi bir artış söz konusuydu, ancak bu artış da istatistiksel anlamlılığa sahip değildi (Şekil 13C).

*Probe* testinde sıçanların, duvara 10 cm uzaklıktaki alanda yüzdükleri süre açısından değerlendirilme yapıldığında, kontrol grupları (H ve I) ile sodyum bütirat grupları (J ve K) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu (Şekil 13D). Sodyum bütirat tigmotaksi süresini etkilemedi.

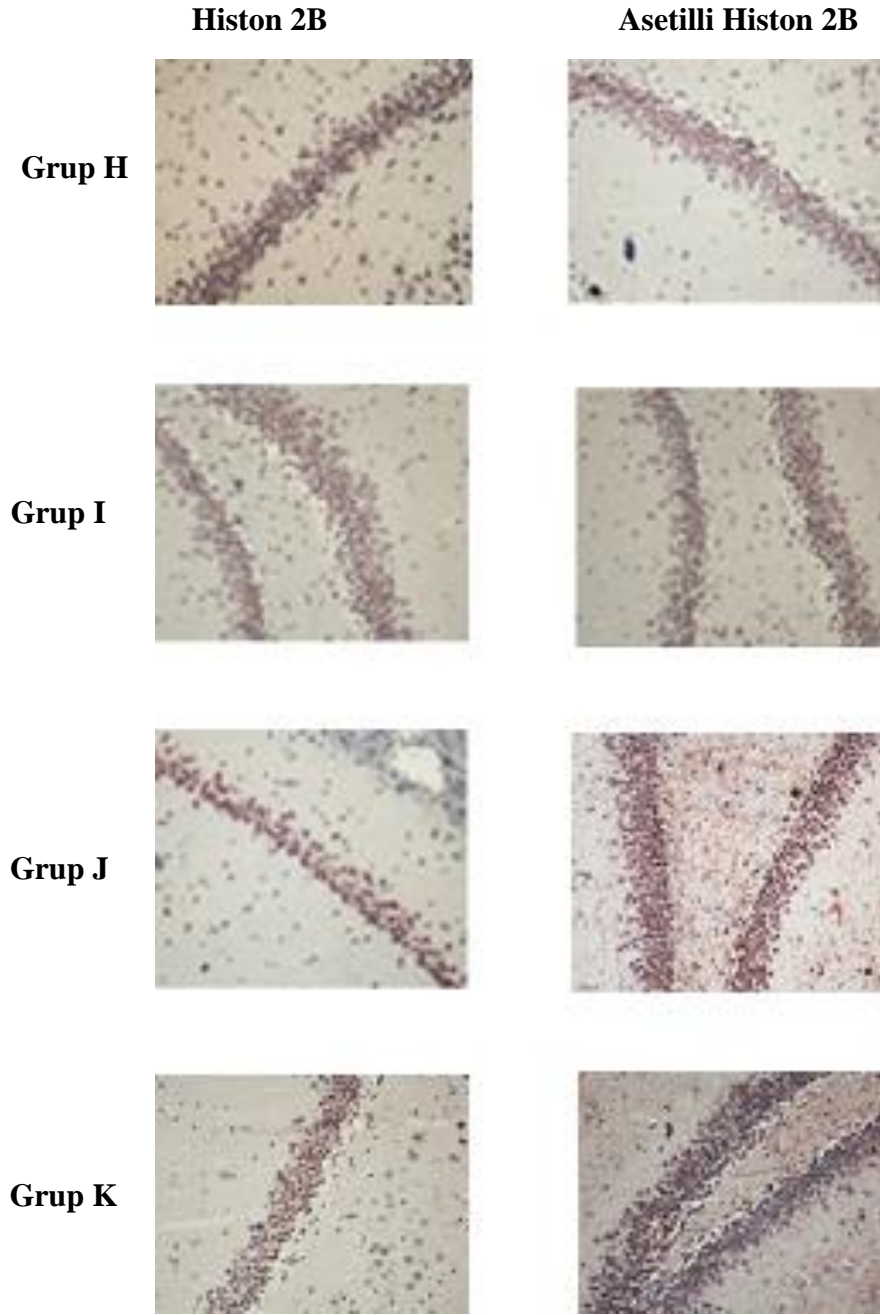
Yüzme hızı açısından değerlendirildiğinde *probe* testinde de grupların hiç birinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik görülmedi. Yüzme hızı açısından anlamlı bir fark olmaması elde edilen verilerin yüzme hızındaki herhangi bir değişiklikten kaynaklanmadığının göstergesiydi.

H, I, J, K gruplarından alınan beyin dokularında yapılan immunhistokimyasal inceleme sonuçları ise Şekil 13E ve Şekil 13F’de gösterilmiştir. Hipokampus CA1 bölgesinden alınan mikroskopik görüntüler Şekil 14’de verilmiştir. Yapılan skorlamada total histon 2B düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış söz konusu değildir. Asetilli-histon 2B düzeylerinde sodyum bütirat gruplarında kontrol gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış söz konusudur ( $p < 0,001$ ). Bu sodyum bütiratın asetilasyonu arttırdığı şeklinde yorumlanabilir. Total histon seviyesinde artış olmadan asetilli-histon düzeyindeki artış olması, bu değişimin total histon seviyesindeki değişime bağlı olmadığını gösterir.



**Şekil 13.** Sodyum bütiratın uzun dönem bellek ve histon 2B asetilasyonuna etkileri: **A-Platforma ortalama uzaklık, B-Hedef kadrana erişme süresi, C-Hedef kadranda geçirilen süre, D-Tigmotaksi, E-Histon 2B İHK skorları, F-Asetilli-histon 2B İHK skorları.**

(\*:  $p < 0,001$ , H ve I gruplarına karşı Asetilli-H2B düzeyleri, her grup için  $n=10$ , tek yönlü analiz ANOVA, *post hoc Bonferroni*. Grafiklerdeki dikey çizgiler standart hatayı göstermektedir).



**Şekil 14. Sıçan hipokampüsü CA1 bölgesi Histon 2B ve Asetilli Histon 2B'nin İHK fotoğrafları (X 200 büyütmede)**

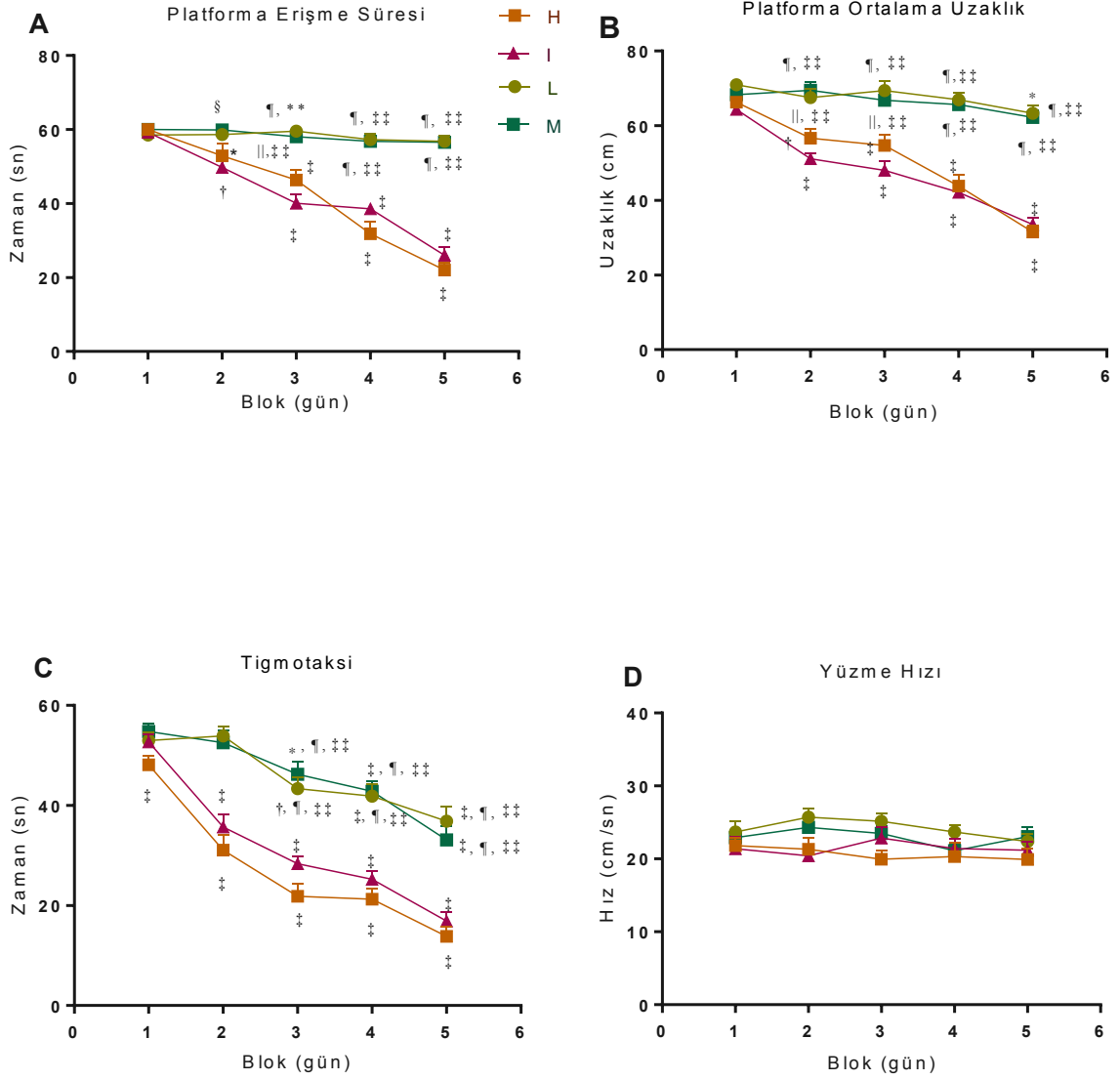
## SKOPOLAMİNİN UZAYSAL ÖĞRENME ÜZERİNE ETKİLERİ

H ve I gruplarında platforma erişme süresinde ikinci günden itibaren belirgin bir azalma gözlemlendi ve bu azalma beşinci günde en yüksek düzeydeydi ( $p<0,001$ ) ancak L ve M gruplarında platforma erişme süresi hemen hemen hep aynı seyretti. L ve M grubundaki sıçanlar eğitimlerin çoğunda platformu bulamadılar ya da çok geç buldular (Şekil 15A). Skopolamin alan gruplarla kontrol grupları arasında ikinci günden itibaren istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmeye başlandı. Bu azalma dördüncü ve beşinci günde en yüksekti ( $p<0,001$ ). Platforma erişme süresinde azalma olmaması, öğrenmenin bozulduğunun göstergesidir.

Yüzme eğitimleri öncesi skopolamin uygulanan gruplarda (L ve M) günler içinde platforma ortalama uzaklıkta belirgin bir azalma olmadı; sadece L grubunda beşinci günde birinci güne göre anlamlı bir fark vardı ( $p<0,05$ ). Kontrol grupları ve skopolamin grupları karşılaştırıldığında platforma ortalama uzaklıklarında 2. günden itibaren istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardı bu anlamlılık ( $p<0,001$ ) beşinci günde en yüksekti (Şekil 15B). Bu, skopolaminin öğrenmeyi bozduğunun bir göstergesidir.

Gruplar tigmotaksi açısından değerlendirildiğinde ise hem skopolamin grupları hem de kontrol gruplarında deneyin ikinci gününden itibaren azalma vardı. Deneyin son gününde bu azalma ( $p<0,001$ ) en belirgindi (Şekil 15C). Grupların tümü içinde buldukları durumu çözümlemişlerdi. Tigmotaksisteki azalma H ve I gruplarında L ve M gruplarına göre daha belirgindi ( $p<0,001$ ).

Yüzme hızı açısından değerlendirildiğinde kontrol grupları ve skopolamin grupları arasında bir fark görülmedi (Şekil 15D). Bu, skopolaminin sıçanların motor fonksiyonunu etkilemediğinin bir göstergesidir.



**Şekil 15. Skopolaminin uzaysal öğrenme üzerine etkileri: A- Platforma erişme süresi B-Platforma ortalama uzaklık, C-Tigmotaksi, D-Yüzme hızı.**  
 (\*: p<0,05, †: p<0,01, ‡: p<0,001; birinci gün değerine karşı, §: p<0,05, ‖: p<0,01, ¶: p<0,001; H grubunun aynı gün değerine karşı, \*\*: p<0,05, ††: p<0,01, ‡‡: p<0,001; I grubunun aynı gün değerine karşı, her grup için n=10, iki yönlü analiz ANOVA, *post hoc Bonferroni*. Grafiklerdeki dikey çizgiler standart hatayı göstermektedir).

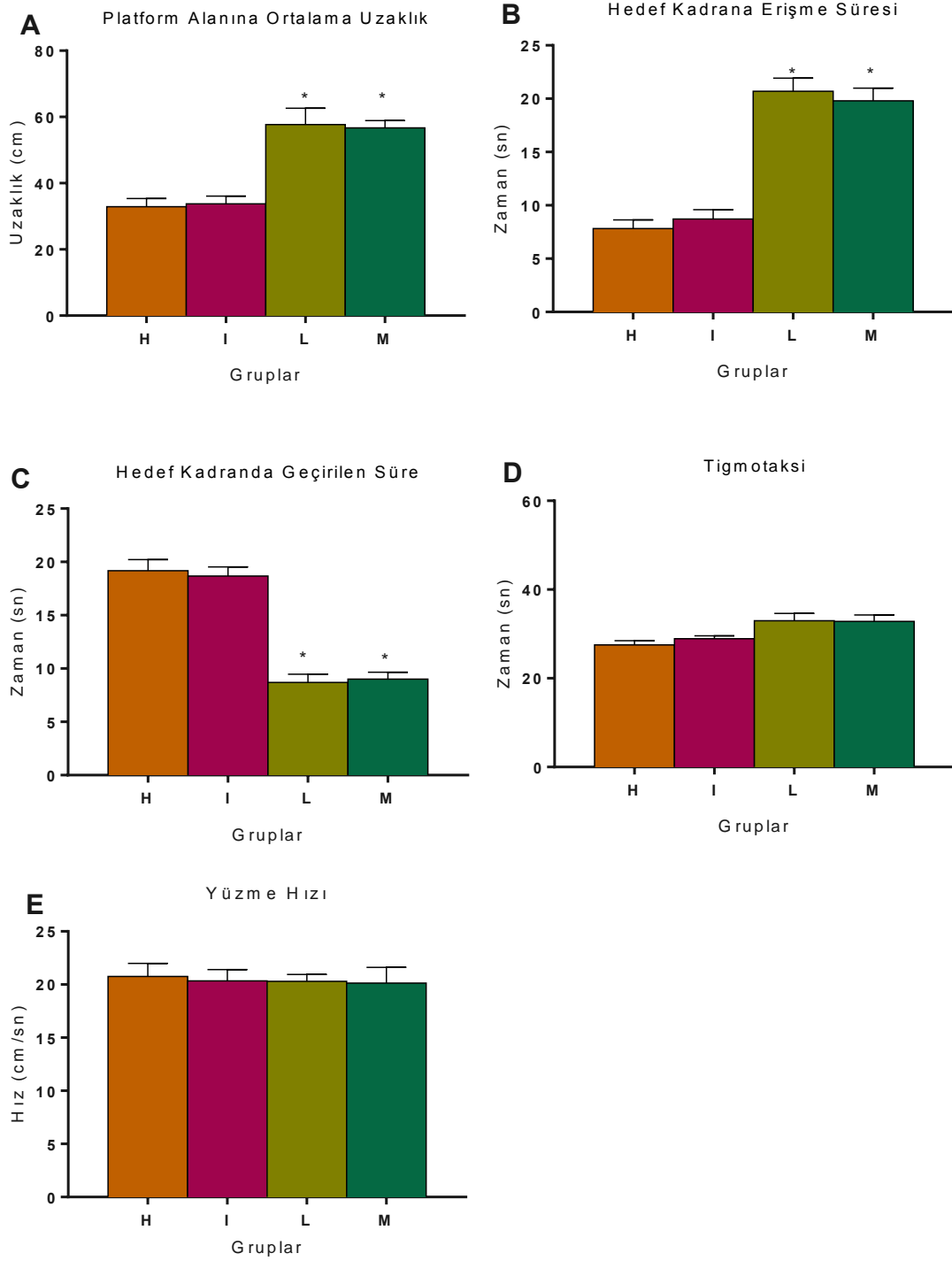
## SKOPOLAMİNİN UZUN DÖNEM BELLEK ÜZERİNE ETKİLERİ

Deneyin altıncı günü yapılan *probe* testinde, platformun olması gereken alana uzaklık, skopolamin gruplarında (L ve M), kontrol gruplarına (H ve I) göre istatistiksel olarak anlamlı ( $p<0,001$ ) yüksekti (Şekil 16A).

Hedef kadrana ulaşana kadar geçen süre, uzun dönem bellek oluşumu için önemli bir göstergedir. Hedef kadrana ulaşana kadar geçen süre skopolamin gruplarında (L ve M), kontrol gruplarına (H ve I) göre istatistiksel olarak anlamlı ( $p<0,001$ ) bir şekilde yüksekti (Şekil 16B). Bu, skopolaminin uzun dönem bellek oluşumunu bozduğunun göstergelerinden biridir.

Hedef kadranda geçirilen süre sıçanların, eğitimler boyunca platformun bulunduğu alanda platformu aradıklarının göstergesidir. Bu parametre açısından değerlendirildiğinde, skopolamin gruplarında (L ve M) kontrol gruplarına (H ve I) göre istatistiksel olarak anlamlı azalma ( $p<0,001$ ) mevcuttu (Şekil 16C).

Kontrol grupları ve skopolamin gruplarını *probe* testinde, tigmotaksi açısından değerlendirdiğimizde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu (Şekil 16D). *Probe* testinde grupların yüzme hızları açısından da, istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görüldü (Şekil 16E).



**Şekil 16.** Skopolaminin uzun dönem bellek üzerine etkileri: **A-Platforma ortalama uzaklık, B-Hedef kadrana erişme süresi, C-Hedef kadranda geçirilen süre, D-Tigmotaksi, E-Yüzme hızı** (\* $p < 0,001$ ; kontrol gruplarına karşı, her grup için  $n=10$ , tek yönlü analiz ANOVA, *post hoc* Bonferroni Grafiklerdeki dikey çizgiler standart hatayı göstermektedir).

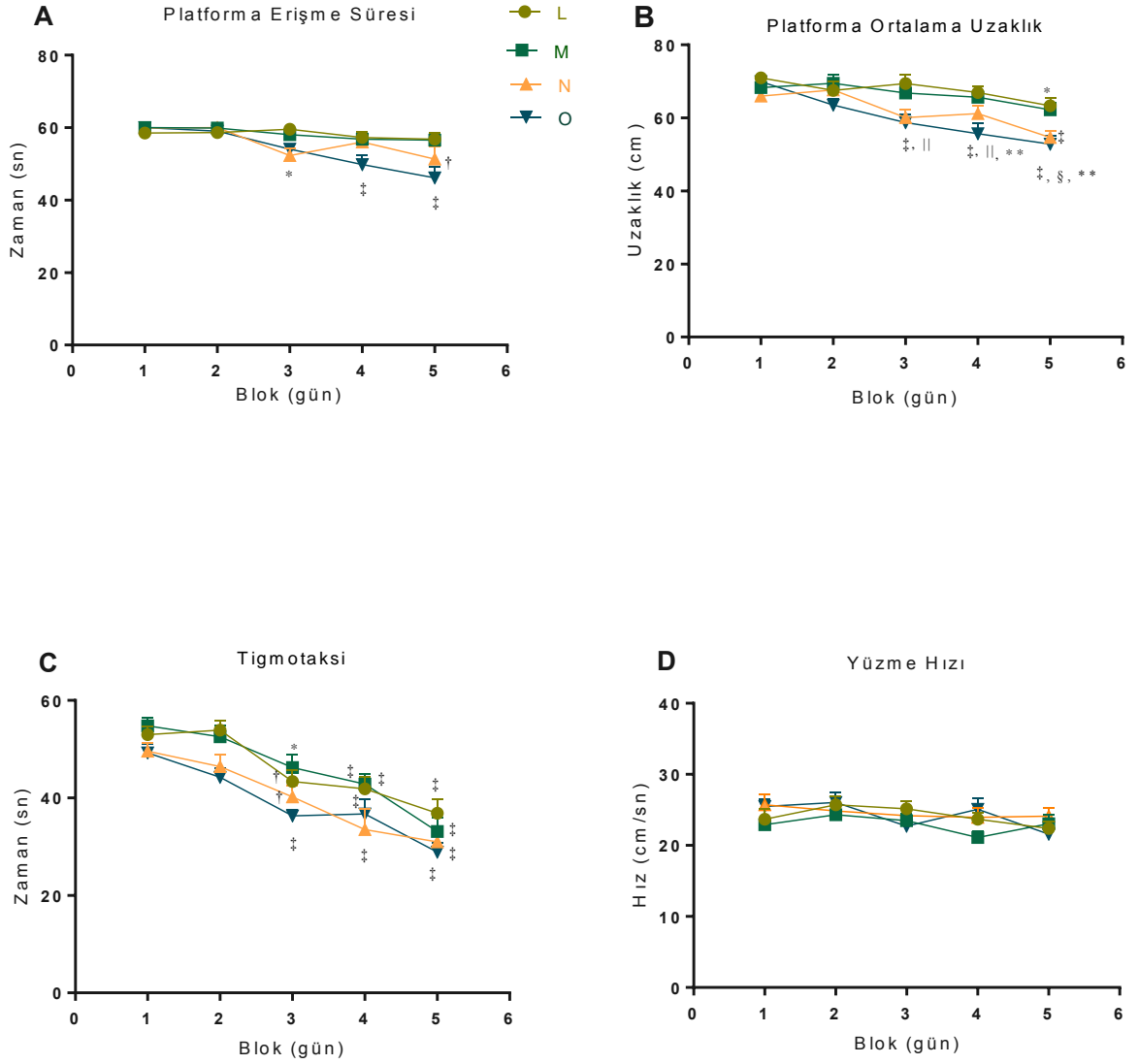


## **SODYUM BÜTİRATIN, SKOPOLAMİNLİ GRUPLARDA UZAYSAL ÖĞRENME ÜZERİNE ETKİLERİ**

Skopolamin ve yüzme öncesi sodyum bütirat (Grup N) ve yüzme sonrası sodyum bütirat alan (Grup O) gruplarda deneyin 5. gününde 1. güne göre platforma erişme sürelerinde istatistiksel anlamlı bir fark (sırasıyla  $p<0,01$  ve  $p<0,001$ ) vardı. Skopolamin alan hayvan gruplarına yüzme eğitimleri öncesi sodyum bütiratın uygulanmasında (Grup N) platforma erişme sürelerinde L ve M gruplarına göre anlamlı bir değişik gözlenmezken, sodyum bütirat eğitim sonrası uygulandığında (Grup O), sıçanların platforma ulaşma sürelerinde azalma oldu. O grubunda görülen platforma erişme süresindeki azalma sadece deneyin 5. gününde L grubuna göre ( $p<0,01$ ), M grubuna göre ( $p<0,05$ ) istatistiksel olarak anlamlı boyuttaydı (Şekil 16A).

Skopolamine ek olarak yüzme öncesi (Grup N) ve yüzme sonrası (Grup O) sodyum bütirat verilen gruplarda 5. günde 1. güne göre platforma ortalama uzaklıkta istatistiksel olarak anlamlı bir azalma ( $p<0,001$ ) mevcuttu. Skopolamin ve yüzme sonrası sodyum bütirat alan O grubunda, 4. ve 5. günde platforma olan ortalama uzaklıkta sadece skopolamin alan gruba göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark ( $p<0,05$ ) olduğu görülmektedir (Şekil 17B).

Tigmotaksi açısından değerlendirildiğinde grupların tümünde (L, M, N, O) deney ikinci günden itibaren istatistiksel anlamlı bir azalma vardı. Deneyin son gününde tüm gruplar için bu azalma ( $p<0,001$ ) en belirgindi. Ancak skopolamin ve sodyum bütirat gruplarında, sadece skopolamin verilen gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olmadı (Şekil 17C). Bu gruplarda yüzme hızı açısından da bir fark yoktu (Şekil 17D).



**Şekil 17. Sodyum bütiratın, skopolaminli gruplarda uzaysal öğrenme üzerine etkileri: A-Platforma erişme süresi B-Platforma ortalama uzaklık, C-Tigmotaksi, D-Yüzme hızı**

(\*:p<0,05, †: p<0,01, ‡: p<0,001; birinci gün değerine karşı, §: p<0,05, ‖: p<0,01, ¶: p<0,001; aynı gündeki L grubu değerine karşı, \*\*: p<0,05, aynı gündeki M grubu değerine karşı, her grup için n=10, iki yönlü analiz ANOVA, *post hoc Bonferroni*. Grafiklerdeki dikey çizgiler standart hatayı göstermektedir).

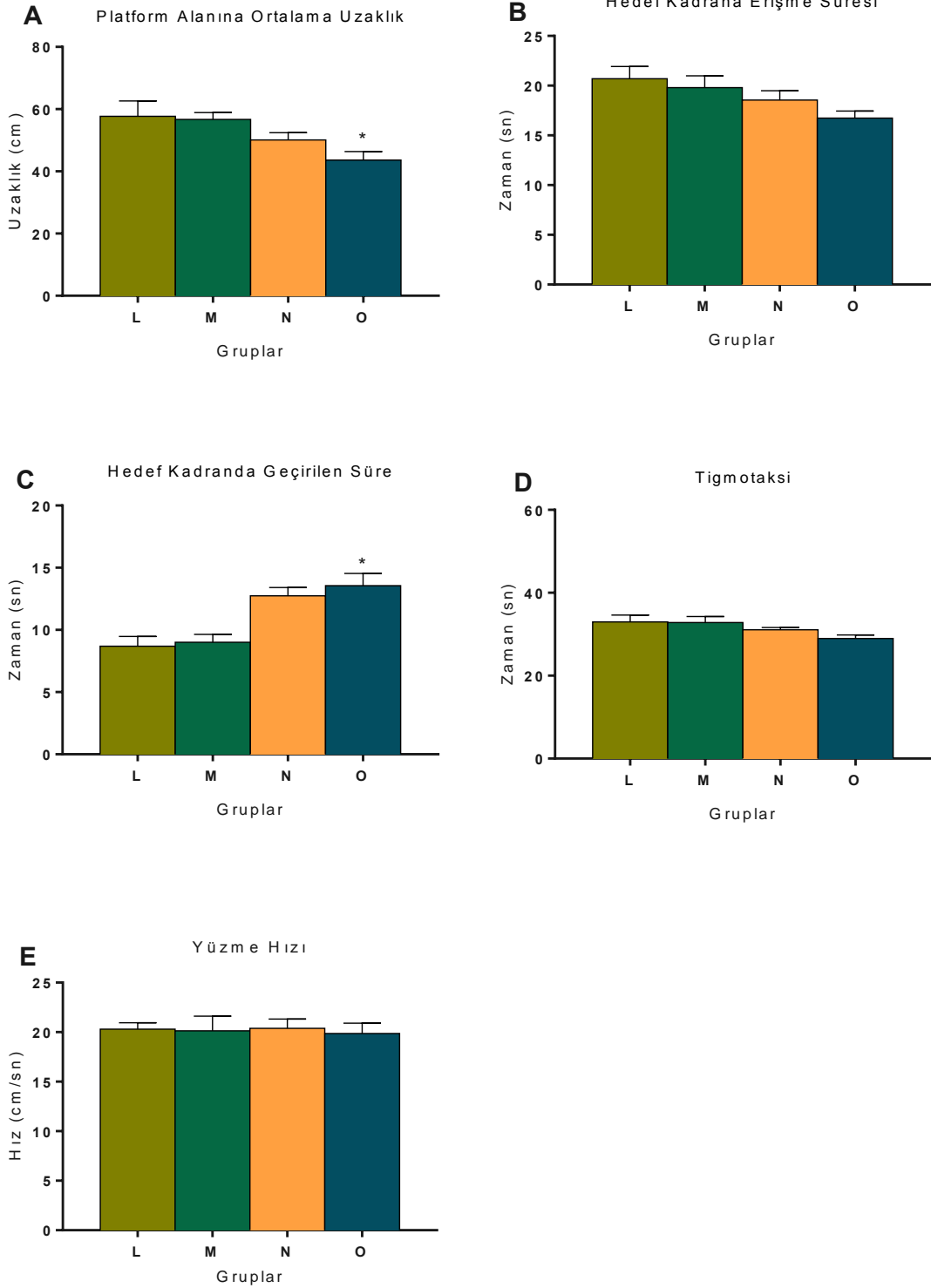
## **SODYUM BÜTİRATIN, SKOPOLAMİNLİ GRUPLARDA UZUN DÖNEM BELLEK ÜZERİNE ETKİLERİ**

*Probe* testinde, platform alanına ortalama uzaklık açısından skopolamin ve sodyum bütirat grupları incelendiğinde, yüzme öncesi sodyum bütirat uygulanan N grubunda sadece skopolamin verilen L ve M gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik olmadığı görüldü. Yüzme sonrası sodyum bütirat alan grupta ise (Grup O) istatistiksel olarak anlamlı bir azalma ( $p<0,05$ ) mevcuttu (Şekil 18A).

Hedef kadrana ulaşana kadar geçen süre açısından skopolamin grupları (L ve M), skopolamin ve sodyum bütirat grupları (N ve O) ile karşılaştırıldığında ise N ve O gruplarında istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir azalma vardı (Şekil 18B).

*Probe* testinde, hedef kadranda geçirilen süre açısından skopolamin grupları ile skopolamin ve sodyum bütirat gruplarının karşılaştırılması Şekil 18C'de görülmektedir. Skopolamin ve yüzme öncesi sodyum bütirat alan N grubunda anlamlı bir değişiklik yokken, yüzme sonrası sodyum bütirat alan O grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış ( $p<0,05$ ) görülmüştür.

*Probe* testinde, skopolamin grupları ile skopolamin ve sodyum bütirat grupları karşılaştırıldığında tigmotaksi ve yüzme hızı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik yoktu (Şekil 18D, Şekil 18E).



**Şekil 18. Sodyum bütiratın, skopolaminli gruplarda uzaysal öğrenme üzerine etkileri: A-Platforma ortalama uzaklık, B-Hedef kadrana erişme süresi, C-Hedef kadranda geçirilen süre, D-Tigmotaksi, E-Yüzme hızı.** (\*:  $p < 0,05$ ; L ve M grubuna karşı, her grup için  $n=10$ , tek yönlü analiz ANOVA *post hoc* Bonferroni Grafiklerdeki dikey çizgiler standart hatayı göstermektedir).

## TARTIŞMA

Öğrenme ve bellek beynin en önemli kognitif fonksiyonlarından. Öğrenme sürecinde beyinde meydana gelen değişiklikler, farklı öğrenme tipleri, kısa dönem ve uzun dönem bellek oluşumu, edinilen bilginin geri çağırılması ve unutmanın altında yatan moleküler mekanizmalar henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Bunun yanı sıra öğrenme ve bellek oluşumunun bireyin genetik yapısıyla, maruz kaldığı çevresel uyarılarla ne kadar ilgili olduğu hala büyük bir merak konusudur.

Genotipik olarak aynı olan hücrelerden nasıl fenotipik olarak farklı hücrelerin ortaya çıktığı sorusuna cevap bulmak için başlayan epigenetik çalışmalar günümüzde oldukça ilgi çekmektedir. Epigenetik mekanizmaların, hücresel farklılaşma, genomik *imprinting* ve özellikle kanserle ilgili süreçlerdeki rolü kabul edilmiştir. Bunun yanı sıra davranışsal ve gelişimsel nörobilim çalışmaları da, epigenomun çevresel uyarılara karşı çok hassas olduğuna ve epigenetik mekanizmaların gen-çevre etkileşimine tüm yaşam boyu aracılık ettiğine dikkat çekmeye devam etmektedir. Bu alanda histonların posttranslasyonel modifikasyonları ve DNA metilasyonu yoğun şekilde çalışılmaktadır. Beslenme, toksinler, stres ve diğer davranışsal uyarılar epigenetik mekanizmalar aracılığı ile gen aktivitesini değiştirmektedir (89-91).

Bugün artık bilinmektedir ki; epigenetik düzenlemelerle genomun bazı bölgeleri sessizleştirilirken bazı bölgeleri daha aktif konuma getirilebilmektedir. Örneğin histon modifikasyonlarından asetilasyon transkripsiyonel aktivasyonla sonuçlanırken, metilasyon bazen aktivasyona bazen de transkripsiyonel sessizliğe yol açar. DNA dizisinde CPG adalarında meydana gelen DNA metilasyonu ise daima ilgili gen bölgesini sessizleştirir

(2,50). Sinirbilim alanında yapılan bir çok çalışmada da DNA metilasyonu ve histon asetilasyonunun öğrenme ve bellek oluşumunda rol aldıkları vurgulanmaktadır (1,2,77,84). Biz de çalışmamızın ilk bölümünde uzaysal öğrenme ve bellek testi olan Morris su labirentinde eğitilen sıçanların beyin dokularında Histon 2B'nin asetilasyonunda ardışık günlerde meydana gelen değişimi incelemeyi amaçladık. Bu amaçla, artan gün sayısında yüzme eğitimine tabi tutulan (Grup B-F) ve altıncı gün probe testi yapılan G grubundan yüzme eğitimlerinden 90 dakika sonra beyin dokuları alındı. Çalışmadaki 90 dakika bekleme süresi daha önce yapılmış çalışmalara dayanılarak belirlendi (85).

Histon asetilasyonu, histon oktamerini oluşturan histonların (H2B, H2A, H3, H4), farklı pozisyonlarındaki lizin aminoasitleri üzerinde gerçekleşir. (63,92,93). Histon asetilasyonu hızlı ve geri dönüşümlü bir reaksiyondur (92,94). Levenson ve ark.'ları (77) sıçanlarda yaptıkları kavramsal korku koşullama testinden 1 saat sonra hipokampus CA1 bölgesinde H3 asetilasyonunun arttığını göstermişlerdir. Yine kavramsal korku koşullama modelinde sağlıklı genç fareler üzerinde yapılan bir çalışmada H3 (lizin 9 ve lizin 14) ve H4 (lizin 5, lizin 8 ve lizin 12)'ün asetilasyonunun arttığı gösterilmiştir (95). Sıçanların lateral amigdala bölgesinde yapılan başka bir çalışmada ise sesli Pavlovian korku koşullama modeli kullanılmıştır. Bu çalışmada sıçanlar eğitimlerden sonra 30, 60 ve 90. dakikalarda sakrifiye edilmiş ve 90. dakikada sakrifiye edilen grupta H3 asetilasyonunda tüm gruplara kıyasla anlamlı bir artış görülmüştür (85). Bu çalışmaya dayanarak biz de çalışmamızda Morris su labirenti yüzmelerinden 90 dakika sonra beyin dokularını aldık.

Öğrenme ve bellek oluşumunda histon asetilasyonunun etkisi daha önce hipokampus, prefrontal korteks, infralimbik alan, dentat girus, amigdala gibi birçok beyin bölgesinde gösterilmiştir (77,85,86,96). Öğrenme ve bellek sürecinde hipokampüsteki epigenetik düzenlemeleri incelemek için yapılan çalışmalarda daha çok kavramsal korku koşullama, nesne tanımalı bellek testleri kullanılmıştır ve daha çok H3 ve H4 üzerinde meydana gelen değişiklikler incelenmiştir. Uzaysal öğrenme ve bellek testlerinin en önemlilerinden biri olmasına rağmen, çalışma süresinin uzun ve zor olması nedeniyle Morris su labirentinde yapılan çalışmalar oldukça azdır; bu nedenle çalışmamızda Morris su labirenti modelini seçmemiz oldukça önemli gözükmektedir. Bousiges ve ark.'ları (83) tarafından Morris su labirentinde sıçanlarda yapılan çalışmada saklı platform kullanılan gruplarda H2B ve H4'ün asetilasyonunda artış olduğu; ancak H2A ve H3'ün asetilasyonunda bir değişim olmadığı gösterilmiştir. Bu çalışma uzaysal öğrenme ve bellek modellerinde H2B'nin asetilasyonun arttığını gösteren ilk çalışmadır. Bu çalışmadan sonra yine Bousiges ve ark.'ları (97) Morris

su labirentinde saklı platform kullanılan gruplarda kontrol grubu ve görünür platform gruplarına göre H2B (lizin 5 ve tetra asetilli) ve H4 (lizin 12) asetilasyonunun arttığını bildirmişlerdir. Aynı çalışmada araştırmacılar kavramsal korku koşullama testinde de H2B (lizin 5 ve tetra asetilli) ve H4 (lizin 12) asetilasyonunun arttığını göstererek hipokampal bellek testlerinde bir genellemeye varmışlardır.

Bu noktada çalışmamızı Morris su labirentinde H2B asetilasyonunu inceleyen diğer çalışmaların tekrarı olarak düşünmek yanlış olacaktır. Çünkü çalışmamız eğitim yüzmelerinin daha uzun olması, eğitimlerin sadece gizli platformla yapılması, probe testinin 1 gün sonra olması, her eğitim gününden sonra beyin dokularının alınması ve beyin dokularında immunohistokimyasal inceleme yapılmasıyla bu çalışmalardan ayrılmaktadır.

Biz çalışmamızda total H2B ve asetilli H2B5K düzeylerini immunohistokimyasal olarak inceledik. Total H2B seviyesinde günler arasında istatistiksel anlamlı bir farklılık yoktu. Bu bulgu zaten beklenen bir sonuçtur ve mevcut literatüre uygundur (83,97). Öğrenme ve bellek oluşumu sürecinde yeni sinapsların oluşumu, sinaptik plastisitenin güçlenmesi ve öğrenmeyle ilgili proteinlerin ekspresyonu görülür, ancak bunlar hücre bölünmesinden ve yeni DNA sentezinden farklı süreçlerdir. Total histon seviyesinin değişmesi ise sadece hücre bölünmesi sırasında yeni sentezlenen DNA'nın paketlenmesi amacıyla yeni histon proteinlerinin sentezlenmesi ile mümkün olabilir.

Asetilli-H2BK5 seviyelerinde ise B (bir gün yüzen) ve C (iki gün yüzen) gruplarda hiç yüzmeyen kontrol grubuna göre (Grup A) istatistiksel olarak anlamlı ( $p < 0,001$ ) bir artış vardı. Ancak D, E ve F gruplarında kontrol grubuna kıyasla istatistiksel anlamlı bir fark yoktu. Bu sonuç deney hayvanının havuza konulduğu anda içinde bulunduğu ortamı anlaması, platformun yerini öğrenmesi ve platformun havuzdan kurtulabilmek için bir çıkış yolu olduğunu ayırt etmesi gibi durumları öğrenmesinin H2BK5'in asetilasyonunu artırdığı şeklinde yorumlanabilir. D, E, F gruplarında H2BK5'in asetilasyonunda kontrol grubuna göre farklılık olmaması ise H2BK5'in asetilasyonunun uzun dönem bellek oluşumunun erken evreleriyle ilgili olduğu şeklinde yorumlanabilir. Altıncı gün *probe* testi uygulanıp beyin dokusu alınan G grubunda ise asetilli-H2B düzeyinde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ( $p < 0,05$ ) bir fark vardı. Bu sonuç, hayvanının platformun yerini öğrendikten sonra platformu alışık olduğu yerde bulamamasıyla yeni bir öğrenme sürecinin başlaması ve tekrar histon asetilasyonunda bir artış görülmesi şeklinde yorumlanabilir. Ayrıca epigenetik mekanizmaların her birini tek tek incelemek normal fizyolojik süreç hakkında tam doğru bir sonuç vermeyebilir. Çünkü aynı N-terminal uç üzerinde ya da farklı uçlar üzerinde oluşan

epigenetik işaretlerin birleşmesiyle bir '*histon kodu*' oluşmaktadır ve bu kod, histon kod okuyucuları (*reader*) tarafından yorumlanmaktadır. Bazı epigenetik işaretlenmeler bir diğer işaretlenmeyi kolaylaştırabilir ya da zorlaştırabilir. Örneğin H3'ün 10. pozisyonundaki serinin fosforilasyonu, H3K9'un metilasyonunu baskımlarken H3K14'ün asetilasyonunu artırmaktadır (98,99). Bu nedenle bütün epigenetik işaretlerin sinerjistik etkisinin gen ekspresyonu ve fizyolojik değişiklikler olarak yansıdığını unutmamak faydalı olur. Bousiges ve ark.'ları (97) da çalışmalarında hayvanlara 3 gün boyunca gizli platformla yüzme eğitimi uygulamış, 1. ve 3. gün histon asetilasyonu düzeylerini ölçmüşlerdir. Üçüncü günde hayvanların yüzdüğü toplam uzaklıkta azalma ve hedef kadranda geçirilen sürede 1. güne göre artış olmasını öğrenme şeklinde yorumlamışlardır ve H2BK5 ve tetra asetilli H2B düzeyinde artış olduğunu göstermişlerdir.

Çalışmamıza başlarken deney hayvanlarının öğrenme eğrilerine paralel bir histon asetilasyon grafiği elde edebileceğimiz öngörüsündeydik. Ancak çalışmada elde ettiğimiz sonuçlar, bize çalışmamızın eksik yönleri ve yeni çalışmaları nasıl planlamamız gerektiği konusunda ciddi katkılarda bulundu. Vecsey ve ark.'ları (82) tarafından intrahipokampal HDAC inhibitörü (*Trichostatin A, TSA*) uygulamasından 30 dk sonra hipokampüste histon asetilasyonunun arttığı ve 24 saat sonra asetilasyonun bazal seviyeye döndüğünün bildirilmesine karşın, sistemik uygulamalardan sonra histon asetilasyonunun tam olarak hangi sürede gerçekleştiği ya da ne kadar süre histonların asetilli kaldığı bilinmediği için, deneyler sonrasında beklenen 90 dakika sonunda asetilasyonun tam olarak yakalanamadığı düşünülebilir. Ayrıca sadece H2BK5 asetilasyonunu gösteren tek bir antikor kullanılması çalışmamızı zayıflatmaktadır. Aynı deney protokolünde farklı pozisyonlardaki lizin moleküllerinin asetilasyonlarının da gösterilmesi daha aydınlatıcı olabilirdi. Bunlara ek olarak histon asetilasyon düzeylerini öğrenme ve bellekle ilgili genlerin promotör bölgelerinde çalışmış olsaydık, elde ettiğimiz sonuçlar uzaysal öğrenme ve bellek oluşumu süreçlerine daha spesifik olurdu. Biz çalışmamızda hücredeki total asetilli H2BK5 düzeyini ölçtüğümüz için sonuçlar hayvanın anksiyetesinden, yüzme davranışından kaynaklanıyor olabilir. Mevcut literatürde H2B asetilasyonu ile ilgili çalışma sayısı oldukça azdır. Bu nedenle H2B asetilasyonunun öğrenme ve bellek oluşumunda bir belirteç olarak kabul edilmesi için farklı bellek modellerinde yapılacak çok yönlü çalışmalara ihtiyaç vardır.

Histon asetilasyonu aktive edilmiş gen transkripsiyonu ile yakından ilişkilidir ve yeni bellek oluşumu hipokampüste histon asetilasyonunu artırır (95). Asetilasyonda HAT ve HDAC enzimleri arasındaki denge belirleyicidir. HDAC enzimlerinin belli izoformlarının



özellikle bellek zayıflatıcı etkileri mevcuttur. Örneğin HDAC2 enziminin nöronlarda fazla ekspresyonu sinaptik plastisite ve bellek oluşumunu bozarken, HDAC1 enziminin fazla ekspresyonunun bellek bozucu etkisi daha zayıftır (100). Bu nedenle HDAC enzimlerinin inhibisyonunun belleği güçlendirebileceği düşünülmüştür.

Biz de çalışmamızın ikinci bölümünde sağlıklı erişkin sıçanlarda HDAC inhibitörü olan sodyum bütiratın uzaysal öğrenme ve bellek oluşumuna etkilerini incelemeyi amaçladık. Çalışmamızda HDAC inhibitörü olarak sodyum bütiratı tercih ettik, çünkü sodyum bütirat sınıf I ve IIA HDAC enzimlerini inhibe eder ve bu enzimlerin beyindeki ekspresyonları diğer HDAC enzimlerine göre daha fazladır (92). Sodyum bütiratı tercih etmemizdeki diğer bir neden intraperitoneal yolla uygulanabilmesiydi, böylelikle tekrarlayan ilaç uygulamaları deney hayvanları için daha az rahatsız edici olacaktı.

Yüzme eğitimlerinde (*trial*) çözücü olarak serum fizyolojik alan kontrol grupları ve sodyum bütirat enjeksiyonu yapılan grupların hepsinde platforma erişme süresi ve platforma ortalama uzaklık verilerinde deneyin ikinci gününden itibaren bir azalma oldu ve beşinci günde bu azalma en belirgindi ( $p<0,001$ ). Grupların tümünde tigmotakside de belirgin azalma mevcuttu ( $p<0,001$ ). Ancak bu parametrelerin hiçbirinde kontrol gruplarıyla sodyum bütirat grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu. Aynı grupların *probe* testlerinde platformun olması gereken bölgeye ortalama uzaklık, hedef kadrana ulaşma süresi, hedef kadranda geçirilen süre ve tigmotaksi verileri değerlendirildi. Tüm bu parametrelerde sodyum bütirat gruplarıyla kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu. Bu açıdan bakıldığında sodyum bütiratın sağlıklı erişkin sıçanlarda uzaysal öğrenme ve uzun dönem bellek oluşumunu etkilemediği sonucuna varılabilir.

Bu gruplardan alınan beyin dokularında hipokampus CA1 bölgesinde yapılan İHK incelemesinde total H2B düzeylerinde anlamlı istatistiksel bir fark yokken, sodyum bütirat alan gruplarda asetilli H2B düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı ( $p<0,001$ ) bir artış söz konusuydu. Bu sonuç sodyum bütiratın HDAC enzimini inhibe ettiği ve histonların hiperasetilasyonunu sağladığı şeklinde yorumlanabilir. Bu durum deneyin başında da beklediğimiz ve literatüre uyumlu bir sonuçtur (86).

Çalışmamızın bu bölümünden elde edilen sonuçlar sağlıklı hayvanlar üzerinde HDAC inhibitörleri ile yapılmış öğrenme-bellek çalışmalarının bir kısmıyla uyuşmasına karşın bir bölümüyle de çelişmektedir. Mevcut literatürde kronik sodyum bütirat uygulamasının yapıldığı ve Morris su labirenti modelinin kullanıldığı çalışmalar olmadığından çalışmamızda bulduğumuz sonuçları tek başına değerlendirmek gerekmektedir. Kemirgenler üzerinde

yapılan birçok çalışmada HDAC inhibitörlerinin uzun dönem bellek oluşumunu artırdığı vurgulanmıştır (77,85,101,102). Bu çalışmaların çoğunluğu hipokampus bağımlı modellerle (nesne tanımalı bellek, kavramsal korku koşullama) yapılmıştır. Hawk ve ark'ları (102) tarafından fareler üzerinde yapılan nesne tanımalı bellek testinde intrahipokampal kanül yoluyla TSA verilmiş ve uzun dönem bellek oluşumunun arttığı gösterilmiştir.

Ancak sağlıklı hayvanlar üzerinde sodyum bütiratın öğrenme ve bellek oluşumunda kolaylaştırıcı bir etkisi olmadığını vurgulayan çalışmalar da mevcuttur (103,104). Silva ve ark. (104) yaptıkları çalışmalarının ilk bölümünde sodyum bütirat verilen sıçanların nesne tanımalı bellek testlerinde sadece çözücü alan gruplara göre bir farklılık olmadığını göstermişlerdir. Genç sıçanlar üzerinde yapılan başka bir çalışmada da eğitimler sonrası sodyum bütiratın sistemik uygulanmasının nesne tanımalı bellek testi üzerine bir etkisi olmadığı vurgulanmıştır (103). Ancak bu iki çalışmada da sodyum bütirat tek doz olarak uygulanmıştır. Bizim çalışmamız sodyum bütiratın 6 gün boyunca hem yüzme eğitimleri öncesi hem de yüzme eğitimleri sonrası uygulanması ile ayrılmaktadır.

HDAC inhibitörleri ile yapılmış bir çok çalışmada, bellek bozukluğu olan (Alzheimer modeli, travmatik beyin hasarı, yaşlılığa bağlı demans modeli vb.) deney hayvanlarında, HDAC inhibitörlerinin bellek bozukluğunu düzelttiği yönünde sonuçlar bildirilmiştir (103,105,106). Bu bilgiler ışığında biz de bellek bozukluğu oluşturulmuş deney hayvanlarında HDAC inhibitörü sodyum bütiratın etkisini incelemek istedik. Bu amaçla öncelikle skopolamin kullanarak öğrenme ve bellek bozukluğu oluşturup oluşturamadığımızı inceledik.

Skopolamin, muskarinik reseptör antagonistidir ve vücutta yaygın parasempatolitik etki (ağız kuruluğu, taşikardi, midriyazis, barsak peristaltizminin azalması vb.) oluşturur. Bu etkilerin yanı sıra skopolamin santral sinir sistemine geçer ve depresyon, sedasyon ve amnezi yapar (107). Antikolinerjik ajanların insan ve sıçanda kognitif bozukluklara yol açtığı birçok çalışmada gösterilmiştir (3,4,108,109). Sağlıklı gönüllülerde yapılmış çalışmalarda skopolaminin yaşlılığa bağlı demans ve Alzheimer hastalığında görülen kognitif bozukluklara benzer bir tablo ortaya çıkardığı görülmüştür (3,4).

Çalışmamızda sıçanlara yüzme eğitimlerinden 30 dakika önce 0,5 mg/kg dozunda skopolamini intraperitoneal yolla 6 gün boyunca uyguladık. Skopolaminin öğrenme ve bellek üzerine etkilerinin incelendiği çalışmalar farklı sıçan türleri ve farklı bellek testleriyle yapılmış olduğundan uygun skopolamin dozuna karar vermek oldukça zordu. Bazı çalışmalar Morris su labirentinde 0,1 mg/kg dozunun öğrenmeyi bozduğunu gösterirken, bazı çalışmalar 0,8-1,0 mg/kg gibi yüksek dozların bile bu modelde öğrenmeyi bozmadığını gösteriyordu

(5,110-112). Biz de daha öncede farklı sıçan türlerinde Morris su labirentinde 0,5 mg/kg skopolamin dozunu kullanan çalışmaları temel alarak dozumuzu belirledik (113-115).

Yüzme öncesi skopolamin uygulanan gruplarda deney boyunca platforma erişme süresinde ve platforma ortalama uzaklıkta istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olmadı. Sadece L grubunda platforma ortalama uzaklıkta beşinci günde birinci güne göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma mevcuttu ( $p < 0,05$ ). Bu noktada yüzme öncesi skopolamin ve sırasıyla yüzme öncesi ve sonrası çözücü enjeksiyonu yapılan grupları (Grup L ve M), sadece yüzme öncesi (Grup H) ve yüzme sonrası (Grup I) çözücü enjeksiyonu yapılan gruplarla karşılaştırdığımızda yüzme eğitimleri boyunca skopolamin alan grupların performansları diğer iki gruba göre oldukça kötüydü. *Probe* testindeki veriler değerlendirildiğinde de hem hedef kadrana ulaşana kadar geçirilen süre hem de hedef kadranda geçirilen süre açısından L ve M grupları H ve I gruplarından istatistiksel olarak anlamlı ( $p < 0,001$ ) farklıydı. Hem yüzme eğitimlerindeki veriler hem de *probe* verileri birlikte düşünüldüğünde skopolaminin uzaysal öğrenme ve bellek oluşumunu bozduğu söylenebilir.

Çalışmamızın son bölümünde ise yüzme öncesi skopolamin uygulanan gruplara yüzme öncesi ve yüzme sonrası 1,2 mg/kg sodyum bütirat enjeksiyonu yaparak skopolaminle oluşturulan kognitif bozukluk üzerine sodyum bütiratın etkisini incelemeyi amaçladık. Daha önce birçok nedene bağlı olarak ortaya çıkmış kognitif bozukluk üzerinde HDAC inhibitörlerinin etkisi araştırılmıştı (103-106,116). Ancak skopolaminle oluşturulmuş kognitif bozuklukta sodyum bütiratın etkisini inceleyen bir araştırmaya rastlanmadı.

Çalışmamızın bu bölümünde öğrenmenin en önemli iki göstergesi olan platforma erişme süresi ve platforma ortalama uzaklık verileri açısından değerlendirildiğinde yüzme sonrası sodyum bütirat alan grupta deneyin beşinci gününde skopolamin ve çözücü alan gruba göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma vardı. Aynı grupların *probe* testinde de yüzme sonrası sodyum bütirat uygulanan O grubunda platforma ortalama uzaklıkta istatistiksel olarak anlamlı bir azalma mevcuttu. Aynı grubun hedef kadrana ulaşma süresi de minimal azalmıştı ve hedef kadranda geçirdiği sürede istatistiksel olarak anlamlı bir artış söz konusuydu. Yüzme eğitimleri öncesi skopolamin ve sodyum bütirat uygulanan N grubunda ise ne *trial* verilerinde ne de *probe* verilerinde skopolamin gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik yoktu. Bu veriler birlikte düşünüldüğünde skopolamine bağlı oluşan kognitif bozuklukları yüzme eğitimleri sonrası kronik sodyum bütirat uygulaması ile kısmi olarak düzelttiği, eğitimler öncesi sodyum bütirat uygulamasının ise bir etkisi olmadığı

sonucuna varılabilir. Daha benzer modelde yapılmış başka çalışmalar olmaması nedeniyle elimizdeki verilerle bunu tam olarak söylemek mümkün değildir.

Eğitimler öncesi sodyum bütirat uyguladığımız grupta elde ettiğimiz veriler mevcut literatürden farklıdır. Daha önce yapılan çalışmalarda eğitim öncesi sodyum bütirat uygulanması bellek oluşumunu artırmış (77) ve akut beyin hasarında oluşan bellek bozukluğunu azaltmıştır (105,106). Ancak buradaki farklılık bizim çalışmamızda ilacın kronik uygulanmasına ve kognitif bozukluğun etyolojisine bağlı olabilir.

Eğitimler sonrası sodyum bütirat uyguladığımız gruptan elde ettiğimiz veriler ise bellek bozukluk modellerinde HDAC inhibitörlerinin etkisini gösteren çalışmalarla uyumludur. Silva ve ark. (104) Neonatal dönemde demir verilmiş erişkin sıçanlarda demir yüklenmesine bağlı olarak oluşan bellek bozukluğu modelinde sodyum bütiratın etkisini incelemişlerdir. Bu çalışmada nesne tanımalı bellek testinde sodyum bütirat alan gruplarda kontrol gruplarına göre tanıma indeksini istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artırmış ve bellek bozukluğunu azaltmıştır. Yaşa bağlı kognitif bozukluklarda sodyum bütiratın etkisini inceleyen başka bir çalışmada da, sodyum bütirat nesne tanımalı bellek testinde yaşa bağlı oluşan değişiklikleri azaltmıştır (103). Ancak bu çalışmada sodyum bütirat bizim çalışmamızdan farklı olarak tek doz halinde uygulanmıştır. Bu noktada sodyum bütiratın akut ve kronik etkilerini gösterecek yeni çalışmalar yapılmalıdır.

Yapılan tüm bu çalışmalara ve kendi çalışmamıza dayanarak histon asetilasyonun öğrenme ve bellek çeşitlerinin tümünde önemli rol oynadığı ve HDAC inhibitörlerinin çeşitli etyolojilere bağlı kognitif bozuklukları düzeltmek amacıyla kullanılabileceği söylenebilir. Bu amaçla farklı modellerde yapılacak çalışmalara ihtiyaç vardır.

## SONUÇLAR

Öğrenme ve bellek oluşumunun moleküler mekanizmasını aydınlatmak için yapılan çalışmalar hızla devam etmektedir. Bugünkü bilgilere dayanarak sinaptik güçlenme, ilgili genlerin ekspresyonu ve protein sentezinin öğrenme ve bellek yapılanmasında önemli rol aldığı düşünülmektedir. Özellikle son yıllarda epigenetik işaretlenmelerin de bu süreçleri etkileyebileceğine dikkat çekilmektedir. Çalışmalar, en önemli epigenetik değişikliklerden olan histon asetilasyonu ve DNA metilasyonunun öğrenme ve bellek oluşumunu birlikte düzenlediğini göstermektedir.

Çalışmamızın ilk iki bölümünde uzaysal öğrenme ve bellek modeli olan Morris su labirentinde yüzme eğitimleri ile Histon H2B'nin asetilasyonunda meydana gelen değişimi ve HDAC inhibitörlerinin etkisini, son bölümünde ise skopolaminin öğrenme ve bellek oluşumunda meydana getirdiği etkiyi ve HDAC inhibitörlerinin bu gruptaki etkisini inceledik.

Çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlara dayanarak uzaysal öğrenme ve bellek modelinde eğitimlerle H2B'nin asetilasyonunun hipokampus CA1 bölgesinde arttığı söylenebilir. Ancak HDAC inhibitörü sodyum bütirat normal erişkin sıçanlarda öğrenme ve bellek oluşumunu etkilememiştir. Bu grupta yapılan immunohistokimyasal incelemelerle de H2B'nin asetilasyonu gösterilmiştir. Skopolaminle belirgin bir kognitif bozukluk oluşturulmuş ve bu modelde eğitimler sonrası HDAC inhibitörü uygulanması kognitif bozukluğu kısmi olarak düzeltmiştir.

Elde ettiğimiz sonuçlar hipokampal bir test olan Morris su labirentinde sağlıklı ve kognitif bozukluğu olan sıçanlarda HDAC inhibitörlerinin kronik kullanımının etkisini ortaya koymakta fikir vericidir. Ancak bu alanda yapılacak çok sayıda çalışmaya ihtiyaç vardır.

## ÖZET

Son yıllarda, epigenetik değişikliklerin öğrenme ve bellek oluşumunu etkilediğine dikkat çekilmektedir. Özellikle histon asetilasyonu ve DNA metilasyonunun öğrenme ve bellek oluşumunu birlikte düzenlediği gösterilmiştir. Bu çalışmada Morris su labirentindeki eğitimler sırasında sıçanların hipokampüsünde meydana gelen H2B asetilasyon değişiminin ve histon deasetilaz inhibitörü sodyum bütiratın öğrenme ve bellek üzerine etkisinin incelenmesi amaçlandı. İmmunhistokimyasal incelemede hipokampüs CA1 bölgesinde H2B asetilasyonunun, yüzme eğitimlerinin erken evrelerinde (1. ve 2. günler) arttığı saptandı. Sodyum bütiratın normal sıçanlarda öğrenme ve bellek performansını etkilemediği, ancak skopolamin verilerek performansı bozulan sıçanlarda bu bozulmayı kısmi olarak düzelttiği saptandı. Elde edilen sonuçlar H2B'nin asetilasyonunun öğrenmenin ilk evrelerinde rol oynadığını ve deasetilasyonun inhibe edilmesinin öğrenme ve bellek üzerine kısmi bir etkisi olduğunu göstermektedir.

**Anahtar kelimeler:** histon asetilasyonu, HDAC inhibisyonu, uzaysal bellek, skopolamin

# **EFFECT-S OF HIPPOCAMPAL HISTONE ACETYLATION AND HDAC INHIBITION ON SPATIAL LEARNING AND MEMORY IN THE MORRIS WATER MAZE IN RATS**

## **SUMMARY**

In recent years, it has been pointed out that epigenetic changes effect learning and memory formation. Particularly, it has been shown that histone acetylation and DNA methylation work in concert to regulate learning and memory formation. We aimed to examine whether in acetylation of H2B within rat hippocampus alters by trainings in the Morris water maze test and the histone deacetylase inhibitor, sodium buytrate, effects on learning and memory performance. In the immunohistochemical examination, it was found that H2B acetylation in area CA1 of hippocampus increased during the early stage of swimming trials (first and second days) Sodium butyrate did not effect learning and memory performance of normal rats; however, it partially ameliorated learning and memory disruption induced by scopolamine. Our results show that acetylation of H2B plays role in the early stage of learning and inhibition of deacetylation partially ameliorated learning and memory performance.

**Keywords:** histone acetylation, HDAC inhibition, spatial memory, scopolamine.

## KAYNAKLAR

1. Guan JS, Xie H, Ding XL. The role of epigenetic regulation in learning and memory. *Exp Neurol* 2015;268:30-36.
2. Levenson JM, Sweatt JD. Epigenetic mechanisms in memory formation. *Nat Rev Neurosci* 2005;6(2):108-18.
3. Ebert U, Kirch W. Scopolamine model of dementia: electroencephalogram findings and cognitive performance. *Eur J Clin Invest* 1998;28(11):944-9.
4. Ebert U, Siepmann M, Oertel R, Wesnes KA, Kirch W. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of scopolamine after subcutaneous administration. *J Clin Pharmacol* 1998;38(8):720-6.
5. Klinkenberg I, Blokland A. The validity of scopolamine as a pharmacological model for cognitive impairment: a review of animal behavioral studies. *Neurosci Biobehav Rev* 2010;34(8):1307-50.
6. Sweatt DJ. The Basics of Psychological Learning and Memory Theory. In: Sweatt DJ (Eds.). *Mechanism of Memory*. 2<sup>th</sup> ed. Slovenia: Elsevier; 2010. p.2-23.
7. Schacter DL, Wagner AD. Learning and Memory. In: Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, Siegelbaum SA, Hudspeth AJ.(Eds) *Principles of Neural Science*. 5<sup>th</sup> ed Newyork:The McGraw-Hill Companies;. 2013. p.1441-60.
8. Gasparini L, Govoni S, Battaini F. A review on the neurobiological basis of memory. *Arch Gerontol Geriatr* 1998;26:225-34.
9. Özen Erberk N, Rezaki M, Prefrontal Korteks: Bellek İşlevi ve Bunama ile İlişkisi. *Türk Psikiyatri Derg* 2007;18(3):262-9.



10. Roediger HL, III, Zaromb FM, Goode MK. A Typology of Memory Terms. In: Byrne JH. (Eds). Concise Learning and Memory: The Editor's Selection. 1<sup>th</sup> ed. Slovenia: Elsevier; 2009. p.1-13.
11. Gathercole SE. Working Memory. In: Byrne JH. (Eds). Concise Learning and Memory: The Editor's Selection. 1<sup>th</sup> ed. Slovenia: Elsevier; 2009. p.149-64
12. Kandel ER, Pittenger C. The past, the future and the biology of memory storage. *Philos Trans R Soc of Lond Biol Sci* 1999;354(1392):2027-52.
13. Albright TD, Kandel ER, Posner MI. Cognitive neuroscience. *Curr Opin Neurobiol* 2000;10(5):612-24.
14. Squire L. R. SY. Declarative Memory System: Amnesia. In: Byrne JH. (Eds). Concise Learning and Memory: The Editor's Selection. 1<sup>th</sup> ed. Slovenia: Elsevier; 2009. p.15-25.
15. Dere E, Kart-Teke E, Huston JP, De Souza Silva MA. The case for episodic memory in animals. *Neurosci Biobehav Rev* 2006;30(8):1206-24.
16. Squire LR, Zola SM. Episodic memory, semantic memory, and amnesia. *Hippocampus* 1998;8(3):205-11.
17. Knowlton BJ, Squire LR. Remembering and knowing: two different expressions of declarative memory. *J Exp Psychol Learn Mem Cogn* 1995;21(3):699.
18. Shimamura AP, Squire LR. A neuropsychological study of fact memory and source amnesia. *J Exp Psychol Learn Mem Cogn* 1987;13(3):464-73.
19. FioravanteD. EG. Antzoulatos, Byrne JH. Sensitization and Habituation: Invertebrate. In: Byrne JH. (Eds). Concise Learning and Memory: The Editor's Selection. 1<sup>th</sup> ed. Slovenia: Elsevier; 2009. p. 373-87.
20. Nudo RJ. Neurophysiology of Motor Skill Learning. In: Byrne JH. (Eds). Concise Learning and Memory: The Editor's Selection. 1<sup>th</sup> ed. Slovenia: Elsevier; 2009. p. 527-41.
21. Squire LR. Memory and brain systems: 1969-2009. *J Neurosci* 2009;29(41):12711-6.
22. Wiggs CL, Martin A. Properties and mechanisms of perceptual priming. *Curr Opin Neurobiol* 1998;8(2):227-33.
23. Moldakarimov SB, Sejnowski TJ. Neural Computation Theories of Learning. In: Byrne JH. (Eds). Concise Learning and Memory: The Editor's Selection. 1<sup>th</sup> ed. Slovenia: Elsevier; 2009. p. 317-28.

24. Sweatt DJ. Long-Term Potentiation: A Candidate Cellular Mechanism for Information Storage in the CNS. In: Byrne JH. (Eds). Concise Learning and Memory: The Editor's Selection. 1<sup>th</sup> ed. Slovenia: Elsevier; 2009. p. 210-38.
25. Mayford M, Siegelbaum SA, Kandel ER. Synapses and memory storage. Cold Spring Harb Perspect Biol 2012;4(6).
26. Bliss TV, Lomo T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. J Physiol 1973;232(2):331-56.
27. Lüscher C, Malenka RC. NMDA receptor-dependent long-term potentiation and long-term depression (LTP/LTD). Cold Spring Harb Perspect Biol 2012;4(6)
28. 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.5<sup>th</sup> ed Newyork:The McGraw-Hill Companies; 2013. p. 1487-519.
29. Kayaalp OS, Uzbay T. Santral Sinir Sistemi Farmakolojisinin Temelleri. Kayaalp OS, (Editör). Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji'de. Ankara: Pelikan Yayıncılık; 2009. s.623-60.
30. Sweatt JD. Hippocampal function in cognition. Psychopharmacology 2004;174(1):99-110.
31. O'Keefe J, Conway DH. Hippocampal place units in the freely moving rat: why they fire where they fire. Exp Brain Res 1978;31(4):573-90.
32. Songur A, Özen OA, Sarsılmaz M. Hipokampus. Türkiye Klinikleri J Med Sci 2001;21(5):427-31.
33. Uysal N, Ayfer D, Yalaz G, Tugyan K. Development of spatial memory during adolescent period in rats. Journal of Neurological Sciences (Turkish) 2010;27(4):407-13.
34. Sweatt DJ. Hippocampal Function in Cognition. . In: Sweatt DJ (Eds.). Mechanism of Memory.2<sup>th</sup> ed. USA: Elsevier; 2010. p. 129-49.
35. Goldberg AD, Allis CD, Bernstein E. Epigenetics: a landscape takes shape. Cell 2007; 128(4):635-8.
36. Levenson JM, Wood MA. Epigenetics – Chromatin Structure and Rett Syndrome. In: Byrne JH. (Eds). Concise Learning and Memory: The Editor's Selection. 1<sup>th</sup> ed. Slovenia: Elsevier; 2009. p. 781-95.

37. Pray LA. Epigenetics: Genome, meet your environment. *The scientist* 2004;18(13):14-20.
38. Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature* 2004;429(6990):457-63.
39. Rakyan VK, Preis J, Morgan HD, Whitelaw E. The marks, mechanisms and memory of epigenetic states in mammals. *Biochem J* 2001;356(Pt1):1-10.
40. İzmirli M. Epigenetik Mekanizmalar ve Kanser Tedavisinde Epigenetik Yaklaşımlar *Van Tıp Dergisi* 2013;20(1): 48-51.
41. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Keith R ,Walter P. DNA, Chromosomes and Genomes. *Molecular Biology of The Cell*. 5<sup>th</sup> ed. USA: Garland science, Taylor & Francis Group; 2008. p. 195-262.
42. Klug WS, Cummings MR. Kromozom yapısı ve DNA dizisinin organizasyonu.Öner C (çeviri editörü). *Genetik Kavramlar'da*. Ankara: Palme Yayıncılık;2002. s. 531-51.
43. Kamakaka RT, Biggins S. Histone variants: deviants? *Genes Dev* 2005;19(3):295-310.
44. Marino-Ramirez L, Kann MG, Shoemaker BA, Landsman D. Histone structure and nucleosome stability. *Expert Rev Proteomics* 2005;2(5):719-29.
45. Zovkic IB, Guzman-Karlsson MC, Sweatt JD. Epigenetic regulation of memory formation and maintenance. *Learn Mem* 2013;20(2):61-74.
46. Bannister AJ, Kouzarides T. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res* 2011;21(3):381-95.
47. Wu J, Grunstein M. 25 years after the nucleosome model: chromatin modifications. *Trends Biochem Sci* 2000;25(12):619-23.
48. Szerlong HJ, Hansen JC. Nucleosome distribution and linker DNA: connecting nuclear function to dynamic chromatin structure. *Biochem Cell Biol* 2011;89(1):24-34.
49. Jenuwein T, Allis CD. Translating the histone code. *Science* 2001;293(5532):1074-80.
50. Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell* 2007;128(4):693-705.
51. Brownell JE, Allis CD. Special HATs for special occasions: linking histone acetylation to chromatin assembly and gene activation. *Curr Opin Genet Dev* 1996;6(2):176-84.

52. Tanner KG, Trievel RC, Kuo MH, Howard RM, Berger SL, Allis CD, et al. Catalytic mechanism and function of invariant glutamic acid 173 from the histone acetyltransferase GCN5 transcriptional coactivator. *J Biol Chem* 1999;274(26):18157-60.
53. Grant PA. A tale of histone modifications. *Genome biology* 2001;2(4).
54. Kouzarides T. Histone methylation in transcriptional control. *Curr Opin Genet Dev* 2002;12(2):198-209.
55. Zhang Y, Reinberg D. Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Dev* 2001;15(18):2343-60.
56. Pickart CM. Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem* 2001;70:503-33.
57. Hicke L. Protein regulation by monoubiquitin. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;2(3):195-201.
58. Nickel BE, Davie JR. Structure of polyubiquitinated histone H2A. *Biochemistry* 1989;28(3):964-8.
59. Melchior F. SUMO--nonclassical ubiquitin. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2000;16:591-626.
60. Shio Y, Eisenman RN. Histone sumoylation is associated with transcriptional repression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(23):13225-30.
61. Bradbury EM, Inglis RJ, Matthews HR, Sarnier N. Phosphorylation of very-lysine-rich histone in *Physarum polycephalum*. Correlation with chromosome condensation. *Eur J Biochem* 1973;33(1):131-9.
62. Narlikar GJ, Fan HY, Kingston RE. Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription. *Cell* 2002;108(4):475-87.
63. Shahbazian MD, Grunstein M. Functions of site-specific histone acetylation and deacetylation. *Annu Rev Biochem* 2007;76:75-100.
64. Küçüköğlü K. Histonların Asetilasyonu ve Histon Deasetilaz İnhibitörleri. *Türkiye Klinikleri J of Pharmacy Sci* 2013;2(2):55-73.
65. Mizzen CA, Yang XJ, Kokubo T, Brownell JE, Bannister AJ, Owen-Hughes T, et al. The TAF(II)250 subunit of TFIID has histone acetyltransferase activity. *Cell* 1996;87(7):1261-70.

66. Shiama N. The p300/CBP family: integrating signals with transcription factors and chromatin. *Trends Cell Biol* 1997;7(6):230-6.
67. Spencer TE, Jenster G, Burcin MM, Allis CD, Zhou J, Mizzen CA, et al. Steroid receptor coactivator-1 is a histone acetyltransferase. *Nature* 1997;389(6647):194-8.
68. Kuo MH, Allis CD. Roles of histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation. *BioEssays* 1998;20(8):615-26.
69. Marmorstein R. Structure and function of histone acetyltransferases. *Cell Mol Life Sci* 2001;58(5-6):693-703.
70. Glozak MA, Sengupta N, Zhang X, Seto E. Acetylation and deacetylation of non-histone proteins. *Gene* 2005;363:15-23.
71. Dokmanovic M, Clarke C, Marks PA. Histone deacetylase inhibitors: overview and perspectives. *Mol Cancer Res* 2007;5(10):981-9.
72. Ververis K, Hiong A, Karagiannis TC, Licciardi PV. Histone deacetylase inhibitors (HDACIs): multitargeted anticancer agents. *Biologics* 2013;7:47-60.
73. Marks PA, Richon VM, Miller T, Kelly WK. Histone deacetylase inhibitors. *Adv Cancer Res* 2004;91:137-68.
74. Giannini G, Cabri W, Fattorusso C, Rodriguez M. Histone deacetylase inhibitors in the treatment of cancer: overview and perspectives. *Future Med Chem* 2012;4(11):1439-60.
75. Koprinarova M, Botev P, Russev G. Histone deacetylase inhibitor sodium butyrate enhances cellular radiosensitivity by inhibiting both DNA nonhomologous end joining and homologous recombination. *DNA Repair (Amst)* 2011;10(9):970-7.
76. Martin SJ, Grimwood PD, Morris RG. Synaptic plasticity and memory: an evaluation of the hypothesis. *Annu Rev Neurosci* 2000;23:649-711.
77. Levenson JM, O'Riordan KJ, Brown KD, Trinh MA, Molfese DL, Sweatt JD. Regulation of histone acetylation during memory formation in the hippocampus. *J Biol Chem* 2004;279(39):40545-59.
78. Atkins CM, Selcher JC, Petraitis JJ, Trzaskos JM, Sweatt JD. The MAPK cascade is required for mammalian associative learning. *Nat Neurosci* 1998;1(7):602-9.
79. Fanselow MS, Kim JJ, Yipp J, De Oca B. Differential effects of the N-methyl-D-aspartate antagonist DL-2-amino-5-phosphonovalerate on acquisition of fear of auditory and contextual cues. *Behav Neurosci* 1994;108(2):235-40.

80. Korzus E, Rosenfeld MG, Mayford M. CBP histone acetyltransferase activity is a critical component of memory consolidation. *Neuron* 2004;42(6):961-72.
81. Wood MA, Kaplan MP, Park A, Blanchard EJ, Oliveira AM, Lombardi TL, et al. Transgenic mice expressing a truncated form of CREB-binding protein (CBP) exhibit deficits in hippocampal synaptic plasticity and memory storage. *Learn Mem* 2005;12(2):111-9.
82. Vecsey CG, Hawk JD, Lattal KM, Stein JM, Fabian SA, Attner MA, et al. Histone deacetylase inhibitors enhance memory and synaptic plasticity via CREB:CBP-dependent transcriptional activation. *J Cogn Neurosci* 2007;27(23):6128-40.
83. Bousiges O, Vasconcelos AP, Neidl R, Cosquer B, Herbeaux K, Panteleeva I, et al. Spatial memory consolidation is associated with induction of several lysine-acetyltransferase (histone acetyltransferase) expression levels and H2B/H4 acetylation-dependent transcriptional events in the rat hippocampus. *Neuropsychopharmacology* 2010;35(13):2521-37.
84. Miller CA, Sweatt JD. Covalent modification of DNA regulates memory formation. *Neuron* 2007;53(6):857-69.
85. Monsey MS, Ota KT, Akingbade IF, Hong ES, Schafe GE. Epigenetic alterations are critical for fear memory consolidation and synaptic plasticity in the lateral amygdala. *PloS one* 2011;6(5):e19958.
86. Stafford JM, Raybuck JD, Ryabinin AE, Lattal KM. Increasing histone acetylation in the hippocampus-infralimbic network enhances fear extinction. *Biol Psychiatry* 2012;72(1):25-33.
87. Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. New York: Academic, 1986
88. D'Hooge R, De Deyn PP. Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Res Brain Res Rev* 2001;36(1):60-90.
89. Fagiolini M, Jensen CL, Champagne FA. Epigenetic influences on brain development and plasticity. *Curr Opin Neurobiol* 2009;19(2):207-12.
90. Roth TL, Sweatt JD. Annual Research Review: Epigenetic mechanisms and environmental shaping of the brain during sensitive periods of development. *J Child Psychol Psychiatry* 2011;52(4):398-408.
91. Zhang TY, Meaney MJ. Epigenetics and the environmental regulation of the genome and its function. *Annu Rev Psychol* 2010;61:439-66.

92. Peixoto L, Abel T. The role of histone acetylation in memory formation and cognitive impairments. *Neuropsychopharmacology* 2013;38(1):62-76.
93. Suganuma T, Workman JL. Signals and combinatorial functions of histone modifications. *Annu Rev Biochem* 2011;80:473-99.
94. DeLange RJ, Smith EL. Histones: structure and function *Annu Rev Biochem* 1971;40:279-314.
95. Peleg S, Sananbenesi F, Zovoilis A, Burkhardt S, Bahari-Javan S, Agis-Balboa RC, et al. Altered histone acetylation is associated with age-dependent memory impairment in mice. *Science* 2010;328(5979):753-6.
96. Reul JM, Hesketh SA, Collins A, Mécinas MG. Epigenetic mechanisms in the dentate gyrus act as a molecular switch in hippocampus-associated memory formation. *Epigenetics* 2009;4(7):434-9.
97. Bousiges O, Neidl R, Majchrzak M, Muller MA, Barbelivien A, Pereira de Vasconcelos A, et al. Detection of histone acetylation levels in the dorsal hippocampus reveals early tagging on specific residues of H2B and H4 histones in response to learning. *PloS one* 2013;8(3).
98. Cheung P, Tanner KG, Cheung WL, Sassone-Corsi P, Denu JM, Allis CD. Synergistic coupling of histone H3 phosphorylation and acetylation in response to epidermal growth factor stimulation. *Mol Cell* 2000;5(6):905-15.
99. Day JJ, Sweatt JD. Epigenetic mechanisms in cognition. *Neuron* 2011;70(5):813-29.
100. Guan JS, Haggarty SJ, Giacometti E, Dannenberg JH, Joseph N, Gao J, et al. HDAC2 negatively regulates memory formation and synaptic plasticity. *Nature* 2009;459(7243):55-60.
101. Bredy TW, Barad M. The histone deacetylase inhibitor valproic acid enhances acquisition, extinction, and reconsolidation of conditioned fear. *Learn Mem* 2008;15(1):39-45.
102. Hawk JD, Florian C, Abel T. Post-training intrahippocampal inhibition of class I histone deacetylases enhances long-term object-location memory. *Learn Mem* 2011;18(6):367-70.
103. Reolon GK, Maurmann N, Werenicz A, Garcia VA, Schroder N, Wood MA, et al. Posttraining systemic administration of the histone deacetylase inhibitor sodium butyrate ameliorates aging-related memory decline in rats. *Behav Brain Res* 2011;221(1):329-32.

104. Silva PF, Garcia VA, Dornelles Ada S, Silva VK, Maurmann N, Portal BC, et al. Memory impairment induced by brain iron overload is accompanied by reduced H3K9 acetylation and ameliorated by sodium butyrate. *Neuroscience* 2012;200:42-9.
105. Dash PK, Orsi SA, Moore AN. Histone deacetylase inhibition combined with behavioral therapy enhances learning and memory following traumatic brain injury. *Neuroscience* 2009;163(1):1-8.
106. Kilgore M, Miller CA, Fass DM, Hennig KM, Haggarty SJ, Sweatt JD, et al. Inhibitors of class 1 histone deacetylases reverse contextual memory deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neuropsychopharmacology* 2010;35(4):870-80.
107. Kayaalp OS, Uzbay T. Santral Sinir Sistemi Farmakolojisinin Temelleri. Kayaalp OS, (Editör). Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji'de. Ankara: Pelikan Yayıncılık; 2009. p. 961-71.
108. Murray TK, Cross AJ, Green AR. Reversal by tetrahydroaminoacridine of scopolamine-induced memory and performance deficits in rats. *Psychopharmacology* 1991;105(1):134-6.
109. Rupniak NM, Samson NA, Tye SJ, Field MJ, Iversen SD. Evidence against a specific effect of cholinergic drugs on spatial memory in primates. *Behav Brain Res* 1991;43(1):1-6.
110. Buresova O, Bolhuis JJ, Bures J. Differential effects of cholinergic blockade on performance of rats in the water tank navigation task and in a radial water maze. *Behav Neurosci* 1986;100(4):476-82.
111. Decker MW, Gill TM, McGaugh JL. Concurrent muscarinic and beta-adrenergic blockade in rats impairs place-learning in a water maze and retention of inhibitory avoidance. *Brain Res* 1990;513(1):81-5.
112. Riekkinen P Jr, Sirvio J, Aaltonen M, Riekkinen P. Effects of concurrent manipulations of nicotinic and muscarinic receptors on spatial and passive avoidance learning. *Pharmacol Biochem Behav* 1990;37(3):405-10.
113. Bejar C, Wang RH, Weinstock M. Effect of rivastigmine on scopolamine-induced memory impairment in rats. *Eur J Pharmacol* 1999;383(3):231-40.
114. Cozzolino R, Guaraldi D, Giuliani A, Ghirardi O, Ramacci MT, Angelucci L. Effects of concomitant nicotinic and muscarinic blockade on spatial memory disturbance in rats are purely additive: evidence from the Morris water task. *Physiol Behav* 1994;56(1):111-4.
115. Sharma D, Puri M, Tiwary AK, Singh N, Jaggi AS. Antiamnesic effect of stevioside in scopolamine-treated rats. *Indian J Pharmacol* 2010;42(3):164-7.



116. Govindarajan N, Agis-Balboa RC, Walter J, Sananbenesi F, Fischer A. Sodium butyrate improves memory function in an Alzheimer's disease mouse model when administered at an advanced stage of disease progression. *J Alzheimers Dis* 2011;26(1):187-97.

## ŞEKİLLER LİSTESİ

### ŞEKİLLER

Şekil 1. Uzun dönem bellek yapılanması ve beyinde ilişkili olduğu bölgeler .....	5
Şekil 2. LTP oluşumunda nöral ağ .....	9
Şekil 3. Epigenetik değişikliklerin sınıflandırılması .....	12
Şekil 4. Kromozom yapısı ve DNA paketlenmesi .....	13
Şekil 5. Histon oktameri ve nükleozom yapısı .....	14
Şekil 6. Histon oktameri ve N terminal uçları .....	16
Şekil 7. Heterokromatin ve ökromatin yapılar .....	17
Şekil 8. Histon asetilasyonu ve deasetilasyonu .....	19
Şekil 9. Deney planı .....	26
Şekil 10. G grubunun ilk beş gündeki öğrenme verileri ve A-G gruplarının İHK skorları....	32
Şekil 11. Sıçan hipokampusu CA1 bölgesinde Histon 2B ve Asetilli Histon 2B'nin immunhistokimya fotoğrafları .....	33
Şekil 12. Sodyum bütiratın öğrenme üzerine etkileri .....	35
Şekil 13. Sodyum bütiratın uzun dönem bellek ve histon 2B asetilasyonuna etkileri. ....	37
Şekil 14. Sıçan hipokampusu CA1 bölgesi Histon 2B ve Asetilli Histon 2B'nin İHK fotoğrafları .....	38
Şekil 15. Skopolaminin uzaysal öğrenme üzerine etkileri .....	40
Şekil 16. Skopolaminin uzun dönem bellek üzerine etkileri .....	42
Şekil 17. Sodyum bütiratın, skopolaminli gruplarda uzaysal öğrenme üzerine etkileri .....	44
Şekil 18. Sodyum bütiratın, skopolaminli gruplarda uzaysal öğrenme üzerine etkileri .....	46

## **TABLolar**

<b>Tablo 1.</b> Bellek alt tipleri ve ilişkili oldukları beyin bölgeleri .....	10
<b>Tablo 2.</b> Histon ana tiplerinin özellikleri.....	15
<b>Tablo 3.</b> Sıçanları havuza bırakıldıkları yönler .....	28

## ÖZGEÇMİŞ

1980 yılında İzmir’de doğdum. İlk, orta ve lise öğrenimi İzmir’de tamamladıktan sonra 1998 yılında Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi’nde lisans eğitimime başladım. 2005 yılında tıp fakültesinden mezun oldum. 2007 ve 2008 yıllarında çeşitli özel hastanelerin acil servislerinde hekimlik yaptım. 2010 yılında Kırklareli ili Lüleburgaz ilçesi Ovacık Sağlık Ocağı’na pratisyen hekim olarak atandım. 2010 yılı Şubat ayında Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Farmakoloji Doktora programına başladım. 2010 yılı Ekim ayından itibaren Edirne İl Ambulans Servisi Başhekimliği’ne bağlı Komuta Kontrol Merkezinde görevime devam etmekteyim.

## **EKLER**

Ek-1

T.C.


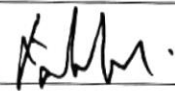


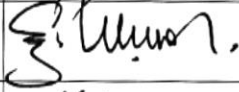

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ  
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARLARI

EDİRNE

Oturum Sayısı: 05  
KARAR NO: 2012.05.10

Karar Tarihi: 03.07.2012

Yürütücülüğünü Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi öğretim üyesi Prof. Dr. Çetin Hakan KARADAĞ'ın yaptığı Doktora Öğr. Dr. Ruhan Deniz TOPUZ'un tezi olarak planlanan TÜHDYEK-2012/59 protokol nolu "Morris su labirenti uzaysal öğrenme ve bellek modelinde, sıçan hipokampusünde histon asetilasyonu ve histon deasetilaz inhibitörünün etkisi" başlıklı çalışma hakkında görüşüldü; araştırmanın amaç, yaklaşım, gereç ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmesi sonucunda; Hayvan Hakları Evrensel Bildirgesi ve etik kurallara uygun olarak hazırlandığına ve çalışmanın yapılabileceğine mevcudun oy birliği ile karar verilmiştir.

Ünvanı/Adı/Soyadı	Araştırma ile İlişki	Toplantı Katılımı	İmza
Yrd.Doç.Dr. Burhan AKSU 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 type="checkbox"/> yok	<input 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 Sivi Üye	<input type="checkbox"/> var <input type="checkbox"/> yok	<input 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 checked="" type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Yrd.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. Enis ULUÇAM 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  
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARLARI

EDİRNE

Oturum Sayısı: 2014/07

Karar Tarihi: 27.06.2014


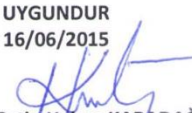
KARAR NO: 2014.07.04

Yürütcülüğünü Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi öğretim üyesi Prof. Dr. Çetin Hakan KARADAĞ'ın yaptığı Doktora Öğrencisi Dr. Ruhan Deniz TOPUZ'un Doktora tezi olarak planlanan TÜHDYEK-2014/25 protokol nolu "Morris su labirenti uzaysal öğrenme ve bellek modelinde, sıçan hipokampüsünde histon asetilasyonu ve histon deasetilaz inhibitörünün etkisi" başlıklı çalışma 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 checked="" type="checkbox"/> yok	<input checked="" type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Yrd. Doç. Dr. Hayati ARDA Fen-Edebiyat Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input type="checkbox"/> yok	<input 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 type="checkbox"/> yok	<input 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 checked="" type="checkbox"/> yok	<input checked="" type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Doç. Dr. Tefik 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-3**[Belgeden yaptığınız güzel bir alıntıyla okurlarınızın dikkatini çekin veya önemli bir noktayı vurgulamak için bu alanı kullanın. Bu metin kutusunu sayfada herhangi bir yere yerleştirmek için sürüklemeniz yeterlidir.]

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

Öğrencinin Adı Soyadı: Ruhan Deniz TOPUZ										
Numarası:1098306251										
Anabilim Dalı: Tıbbi Farmakoloji										
Programı: <input type="radio"/> Yüksek Lisans <input checked="" type="radio"/> Doktora										
Tez başlığı/Konusu: MORRIS SU LABİRENTİ UZAYSAL ÖĞRENME VE BELLEK MODELİNDE, SIÇAN HİPOKAMPÜSÜNDE HİSTON ASETİLASYONU VE HİSTON DEASETİLİZ İNHİBİTÖRÜNÜN ETKİSİ										
<b>Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne</b>										
<p>Yukarıda açık adı bulunan tezimin "Kapak Sayfası, Giriş ve Amaç, Genel Bilgiler, Bulgular, Tartışma, Sonuçlar, Özet ve Summary" bölümlerinden oluşan toplam 54 sayfalık kısmına ilişkin 16/06/2015 Tarihinde tez danışmanım tarafından <i>TURNİTİN</i> adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanmış olan orijinallik raporuna göre tezimin benzerlik oranı % 4 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.16 / 06 /2015</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 Ruhan Deniz TOPUZ 										
<b>UYGUNDUR</b> 16/06/2015  Prof. Dr. Çetin Hakan KARADAĞ Danışman Adı Soyadı, İmza										



