

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

Tez Yöneticileri  
Prof. Dr. Ahmet ULUGÖL  
Prof. Dr. Ç. Hakan KARADAĞ

**SEFTRİAKSONUN UZAYSAL BELLEK ÜZERİNE  
ETKİSİNDE GLT-1 TRANSPORTER  
AKTİVASYONUNUN ROLÜ**

(Yüksek Lisans Tezi)

**İpek KARAMAN**

EDİRNE-2013

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

Tez Yöneticileri  
Prof. Dr. Ahmet ULUGÖL  
Prof. Dr. Ç. Hakan KARADAĞ

**SEFTRİAKSONUN UZAYSAL BELLEK ÜZERİNE**  
**ETKİSİNDE GLT-1 TRANSPORTER**  
**AKTİVASYONUNUN ROLÜ**

(Yüksek Lisans Tezi)

**İpek KARAMAN**

**Destekleyen Kurum: TÜBAP-2011/53**

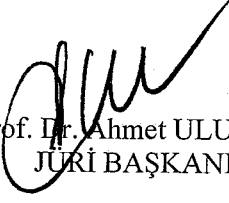
**Tez No :**

EDİRNE-2013

**T.C.**  
**TRAKYA ÜNİVERSİTESİ**  
**Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğü**

**ONAY**

Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde ve Prof. Dr. Ahmet ULUGÖL'ün danışmanlığında Yüksek Lisans öğrencisi İpek KARAMAN tarafından tez başlığı "Seftriaksonun Uzaysal Bellek Üzerine Etkisinde GLT-1 Transporter Aktivasyonunun Rolü" olarak teslim edilen bu tezin tez savunma sınavı 08/02/2013 tarihinde yapılarak aşağıdaki jüri üyeleri tarafından "Yüksek Lisans Tezi" olarak kabul edilmiştir.

  
Prof. Dr. Ahmet ULUGÖL  
JÜRİ BAŞKANI

Doç. Dr. Tevfik GÜLYAŞAR  
ÜYE

Yrd. Doç. Dr. Özge GÜNDÜZ  
ÜYE

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

Doç. Dr. Tammam SİPAHİ  
Enstitü Müdürü

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimimde emeği geçen, yardımlarını hiçbir zaman esirgmeden bana her konuda destek olan, değerli tez danışmanlarım, Farmakoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Ahmet ULUGÖL'e, Prof. Dr. Ç. Hakan KARADAĞ'a, Prof. Dr. Dikmen Dökmeci'ye, Doç. Dr. Gülnur KIZILAY ÖZFİDAN'a, ilgi ve dostluğunu her zaman yanımda hissettiğim arkadaşım Burcu ÇETİNKAYA'ya, araştırma görevlisi Yrd. Doç. Dr. Özgür GÜNDÜZ'e ve bugünlere gelmemde büyük destekleri olan aileme teşekkür ediyorum.

## İÇİNDEKİLER

|  |    |
|--|----|
| <b>GİRİŞ VE AMAÇ</b> .....             | 1  |
| <b>GENEL BİLGİLER</b> .....            | 3  |
| <b>GLUTAMİK ASİT</b> .....             | 3  |
| <b>GLUTAMATERJİK RESEPTÖRLER</b> ..... | 3  |
| <b>GLUTAMAT TAŞIYICILARI</b> .....     | 6  |
| <b>ÖĞRENME VE BELLEK</b> .....         | 9  |
| <b>SEFALOSPORİNLER</b> .....           | 17 |
| <b>GEREÇ VE YÖNTEMLER</b> .....        | 19 |
| <b>BULGULAR</b> .....                  | 24 |
| <b>TARTIŞMA</b> .....                  | 39 |
| <b>SONUÇLAR</b> .....                  | 45 |
| <b>ÖZET</b> .....                      | 46 |
| <b>SUMMARY</b> .....                   | 47 |
| <b>KAYNAKLAR</b> .....                 | 48 |
| <b>RESİMLEMELER LİSTESİ</b> .....      | 52 |
| <b>ÖZGEÇMİŞ</b> .....                  | 54 |
| <b>EKLER</b>                           |    |

## SİMGE VE KISALTMALAR

|               |   |
|---------------|---|
| <b>AMPA</b>   | : $\alpha$ -amino-3- hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropionik asit |
| <b>ALS</b>    | : Amyotrofik lateral sklerozis                                  |
| <b>BOS</b>    | : Beyin-omurilik sıvısı   |
| <b>EATTs</b>  | : Eksitatör amino asit transporters                             |
| <b>EK</b>     | : Entorinal korteks   |
| <b>GLAST</b>  | : Glutamat/aspartat transporters                                |
| <b>GLT-1</b>  | : Glutamat taşıyıcı-1   |
| <b>HSCORE</b> | : Histolojik skorlama   |
| <b>I</b>      | : Boyanma derecesi  |
| <b>IOD</b>    | : İntegral optik yoğunluk                                       |
| <b>i.p.</b>   | : İntraperitoneal   |
| <b>LDS</b>    | : Lityum dodesil sülfat   |
| <b>LEA</b>    | : Lateral entorinal bölge                                       |
| <b>LTP</b>    | : Long Term Potentiation  |
| <b>MEA</b>    | : Medyal entorinal bölge  |
| <b>NMDA</b>   | : N-metil D-aspartat  |
| <b>PC</b>     | : Her derecede boyanan hücrelerin yüzdesi                       |
| <b>PER</b>    | : Peririnal bölge   |
| <b>PH</b>     | : Parahipokampal bölge  |
| <b>POR</b>    | : Postrinal korteks   |
| <b>SCI</b>    | : Spinal kord injury  |
| <b>SOD</b>    | : Süperoksid dismutaz   |
| <b>SSS</b>    | : Santral Sinir Sistemi   |
| <b>VGLUTs</b> | : Veziküler glutamat taşıyıcıları                               |

## GİRİŞ VE AMAÇ

Son senelerde glutamat taşıyıcılarından glutamat taşıyıcı-1'in (GLT-1) aktivasyonunun bir çok santral sinir sistemi hastalığında rol oynadığı saptanmıştır. Bizim araştırmamızda da GLT-1 aktivasyonu yapan bir beta-laktam antibiyotik olan seftriaksonun uzaysal bellek üzerine etkisi olup olmadığı, varsa bu etkinin GLT-1 üzerinden gerçekleşip gerçekleşmediğini incelemek amaçlanmıştır.

Glutamat santral sinir sistemindeki en önemli eksitator amino asit nörotransmitter olup, ekstraselüler glutamat hemostazı primer olarak glutamat taşıyıcı sistemi tarafından regüle edilmektedir. Bugüne kadar, 5 tip eksitator amino asit taşıyıcısı belirlenmiştir: EAAT1 (GLAST), EAAT2 (GLT-1), EAAT3, EAAT4 ve EAAT5 (1,2). GLT-1 taşıyıcılarının glutamat uptake'inin %90'ına aracılık ettiği ve glutamatın sinaptik iletinin sonlandırılmasında büyük önem taşıdığı bilinmektedir (3).

Son senelerde beta laktam antibiyotiklerin glutamat uptake'ini artırdığı gösterilmiş olup, bu antibiyotikler arasında özellikle seftriakson üzerinde çalışılmıştır. Seftriaksonun GLT-1'i aktive ederek belirtilen etkiyi ortaya çıkarttığı ve bunun sonucunda opioidlerin hipotermik ve analjezik etkilerine tolerans gelişimini önlediği yakın zamanda gösterilmiştir (4). Tolerans gelişmesine mekanizma olarak önemli benzerlikleri bulunan nöropatik ağrı belirtilerine karşı da seftriaksonun etkili olduğu son dönemde sıçanlarda siyatik sinir zedelenmesi modelinde saptanmıştır (5). Akut ve inflamatuvar ağrıya karşı seftriaksonun etkisi, buna ek olarak nöropatik ağrı başladıktan sonra seftriaksonun analjezik etkisi ile ilgili çalışmalar da mevcuttur (6). Ayrıca, GLT-1 aktivasyonunun amyotrofik lateral skleroz, Parkinson hastalığı ve epilepsi nöbetlerinin oluşumunda da önemli rolü olduğu belirlenmiştir (7). Anabilim Dalımız laboratuvarında bu verilerden yola çıkarak yaptığımız bir çalışmada, streptozosin ile oluşan diyabetik nöropatide seftriaksonun anti-allodinik ve anti-hiperaljezik etkilerini göstermiştik (8).

Nöronal bozuklukları önleme açısından glutamat reseptörlerinin aktivasyonu önemlidir, hücre dışı glutamat konsantrasyonu glial hücrelerdeki ve nöronların plazma membranındaki glutamat taşıyıcıları tarafından kontrol edilmektedir (9). GLT-1 aktivasyonunun bir çok farklı mekanizmaya sahip farklı santral sinir sistemi hastalıklarında büyük önem taşıdığı, yukarıda özetlenen araştırmalar incelendiğinde görülebilir. Ancak, günümüze kadar bellek fonksiyonları üzerine GLT-1 aktivasyonunun etkilerini gösteren bir araştırma yapılmamıştır. Biz de araştırmamızda, bir beta-laktam antibiyotik olan, aynı zamanda GLT-1 aktivasyonu yapma özelliği de olan seftriaksonun uzaysal bellek üzerine etkilerini araştırmayı hedefledik.



## GENEL BİLGİLER

### GLUTAMİK ASİT

Eksitator bir nöromediyator olan glutamik asit; beyin ve omurilikte bulunur. Glutamik asit veya iyonize şekli olan glutamat iyonu,  $\alpha$ -oksoglutarik asit ve glutamin ile sinir uçlarında denge halindedir. Sinir ucu membranında, sinaptik aralığa salınan glutamik asidi içeri alan yüksek afiniteli bir geri-alım mekanizması (glutamat taşıyıcısı) vardır. Glutamik asit, glutaminaz enzimi aracılığı ile glutamaterjik sinir ucunda glutamin'in hidrolizi sonucunda oluşur. Az bir kısmı ise oksoglutarat'dan oksidasyon ve transaminasyon yolu ile glukozdan elde edilir. Sinir ucundan glutamat salınımı kalsiyuma bağlıdır (10).

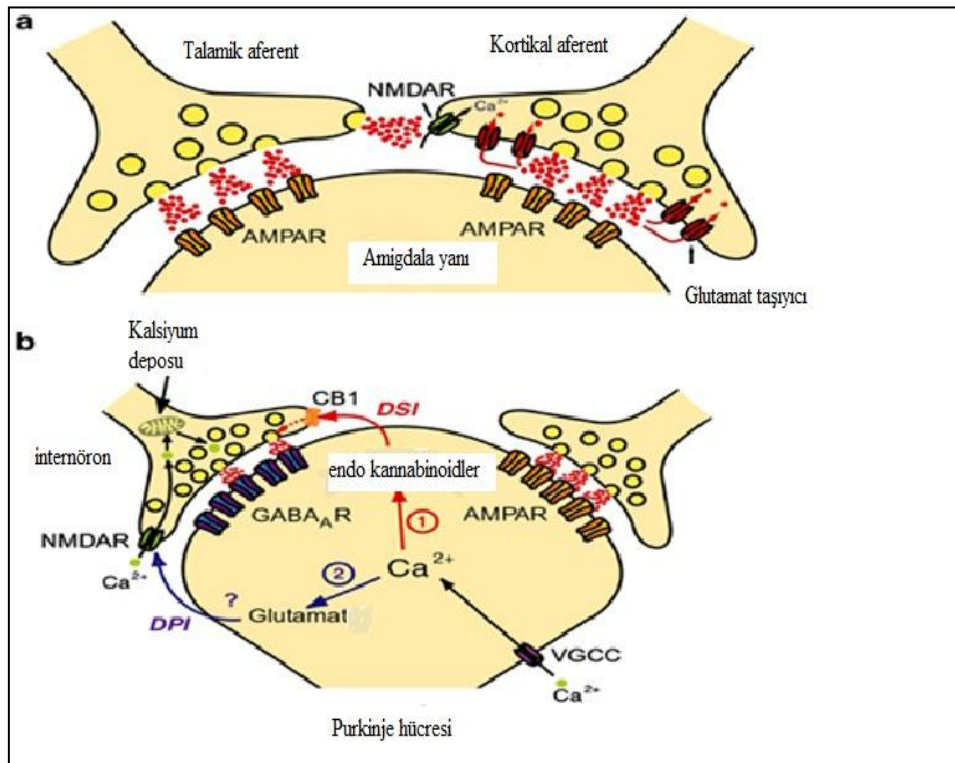
Glutamik asit, glutamin sentetaz enzimi yardımı ile glutamine dönüştürülür ve aktivitesi ortadan kaldırılır. Kainik asit (bir glutamik asit analogu), küçük dozlarda, glutamat gibi etki yapar; lokal olarak uygulanan yüksek dozlarda ise nörotoksik etki yapar ve o bölgedeki nöron somalarını olumsuz etkiler (10). Hipokampus veya striatuma yapılan glutamat infüzyonları öğrenme ve bellek üzerine olumlu yönde etki eder, glutamat, glutamaterjik reseptörleri aktive ederek bellek süreçlerine katkıda bulunabilir. Örneğin, AMPA reseptörlerini aktive eden ilaç olan ampakinler öğrenmeyi ve LTP'yi artırır (11).

### GLUTAMATERJİK RESEPTÖRLER (EKSİTATOR AMİNO ASİT RESEPTÖRLERİ)

Beyinde ve omurilikte, 4 tip glutamat reseptörü vardır. Glutamat reseptörleri, aspartat'a da afinite gösterdikleri ve onun tarafından da aktive edilebildikleri için, glutamat reseptörlerine eksitator amino asit (EAA) reseptörleri de denebilir. Bu reseptörlerin 4 alt tipi aşağıda belirtilmiştir. Bunlardan ilk üçü iyonotropik (iyon kanalına kenetli) reseptörlerdir:

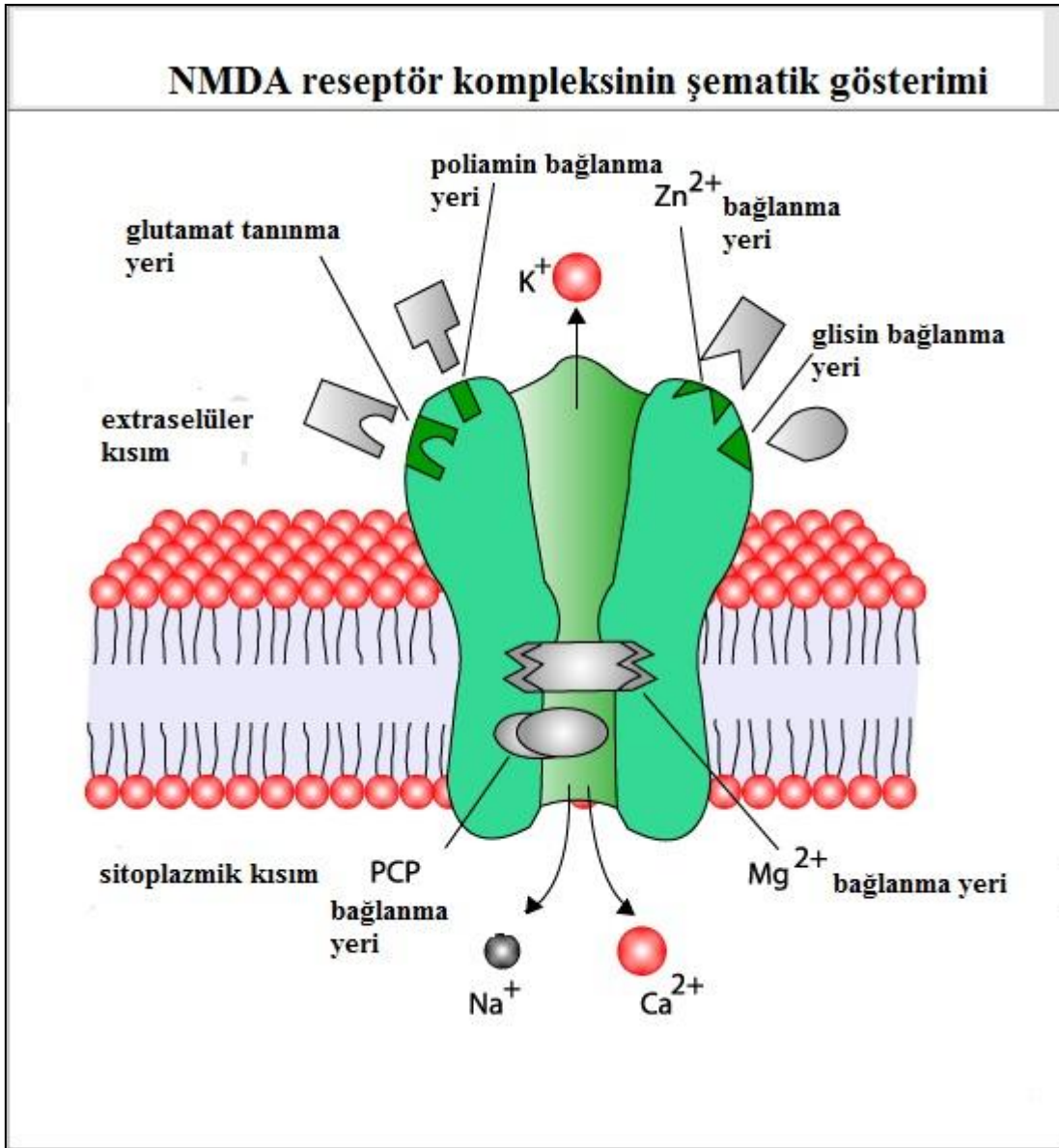
1. N-metil D-aspartat (NMDA) reseptörleri.
2.  $\alpha$ -amino-3- hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropionik asit (AMPA) reseptörleri (eski adıyla kiskalat reseptörleri).
3. Kainik asit tarafından selektif olarak aktive olan kainat reseptörleri.
4. G proteini ile kenetli presinaptik metabotropik glutamat reseptörleri (10). G proteini ile kenetli metabotropik glutamat reseptörleri sinaptik plastisitede görev alır, öğrenme ve bellek süreçlerine önemli katkıları vardır (12).

Ortasında bir katyon kanalı içermesinden dolayı AMPA ve kainat reseptörleri NMDA reseptörlerine benzerler. Glutamatın eksitotoksik etkisine katkıda bulunabilirler, bunlara non-NMDA reseptörleri adı da verilir. Sinaptik membranın hızlı depolarizasyonunu sağlarlar ve NMDA reseptörünün çalışmasını kolaylaştırırlar. AMPA ve kainat reseptörleri bir kanal proteini (katyon kanalı diğer ismiyle  $Ca^{2+}/Na^{+}$  kanalı ) ile kenetlenmişlerdir (10). NMDA ve AMPA reseptörlerinin, glutamat taşıyıcılarının ve kalsiyum kanallarının yerleşimi Şekil 1’de gösterilmiştir.



**Şekil 1. NMDA, AMPA reseptörlerinin, glutamat taşıyıcılarının ve kalsiyum kanallarının yerleşimi.**

Bu reseptörlerden en çok üzerinde durulan glutamat reseptörleri, NMDA reseptörleridir. Beyin korteksi, hipokampus, striatum, septum ve amigdala gibi yapılarda fazlaca bulunurlar, nöronlar üzerinde postsinaptik yerleşim gösterirler. NMDA reseptörleri üzerinde çeşitli bağlanma yerleri vardır. NMDA reseptörü molekül kompleksi üzerinde NMDA reseptörünü allosterik şekilde etkileyen ve kanal fonksiyonunu düzenleyen bir poliamin bağlanma yeri ve glisin bağlanma yeri, voltaja bağımlı  $Mg^{2+}$  bağlanma yeri ile fensiklidin, ketamin gibi maddeleri bağlayan bir fensiklidin bağlanma yeri bulunur. Ayrıca  $Zn^{2+}$  iyonu da, NMDA reseptörü üzerinde kendine özgü bağlanma yerine bağlanarak glisin etkisini azaltır. Şekil 2’de NMDA reseptörüne bağlanma yerleri gösterilmiştir.



Şekil 2. NMDA reseptörü bağlanma yerleri.

NMDA reseptörü aktivasyonunun iyon kanalları üzerindeki etkisini elektriksel depolarizasyon artırır. Bu reseptörler, hipokampusteki sinapslarda kısa süren bir stimulasyondan sonra oluşan uzun süreli potansiyalizasyona ('long term potentiation', LTP) sebep olur, böylece bazı öğrenme ve bellek süreçlerine aracılık ederler. Beyin ya da omurilik travmalarına bağlı spinal iskemi ve buna bağlı inme sırasında iskemik bölgedeki sinir uçlarından çok fazla miktarda glutamat salınması sonucu, NMDA reseptörlerinin aşırı aktivasyonu ile reseptörlere bağlı iyon kanallarından nöronlar içine aşırı miktarda kalsiyum girmesi nöronlarda nekroza (eksitotoksositeye) neden olmaktadır. Bu varsayımdan hareketle iskemik beyin zedelenmesini önlemek için NMDA reseptör antagonisti dizosilpin (MK-801) denenmektedir (10).

### **GLUTAMAT TAŞIYICILARI**

Glutamat, SSS'deki en önemli eksitator amino asit nörotransmitterdir. Nöronlarda ve glia'da yerleşmiş yüksek afiniteli,  $\text{Na}^+$ -bağımlı glutamat taşıyıcıları tarafından sinaptik aralıktan alınmaktadır. Bugüne kadar, 5 tip eksitator amino asit taşıyıcısı belirlenmiştir: (Şekil 3) (13).

- **EAAT1** (GLAST)
- **EAAT2** (GLT-1)
- **EAAT3** (EAAC1)
- **EAAT4** ve **EAAT5** (nöronal yerleşim gösterir) (14).

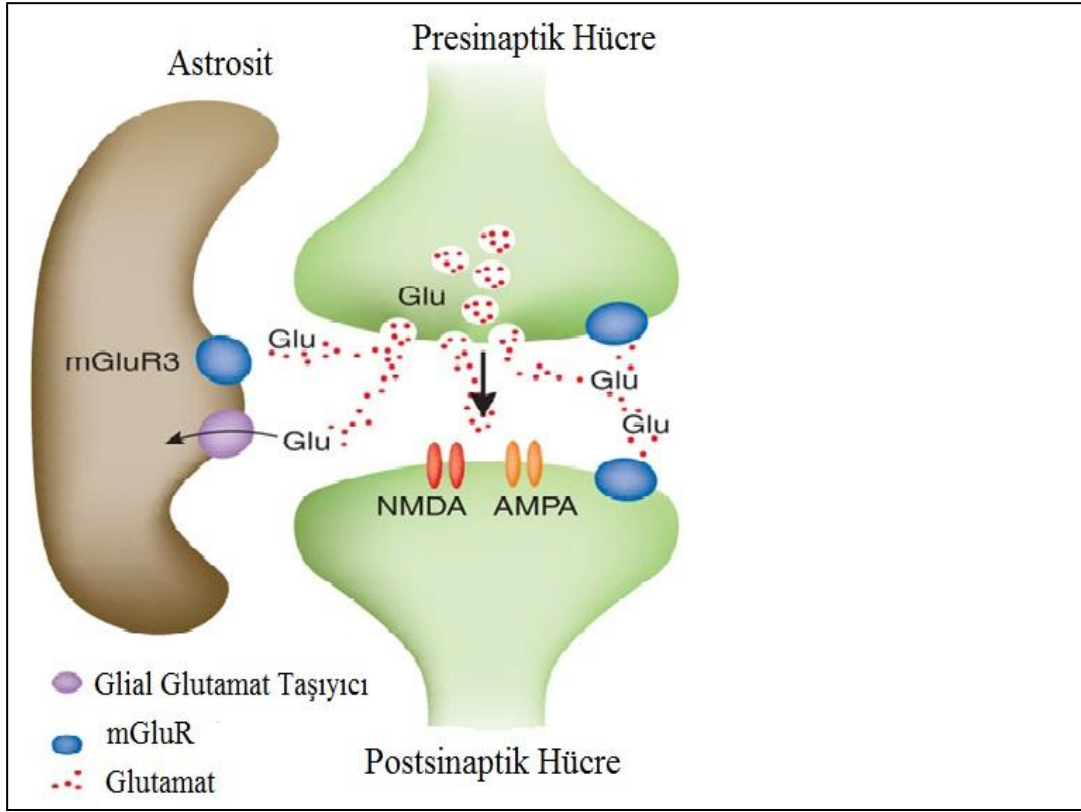
**EAAT1**; bazı nöronal olmayan hücrelerdeki ana glutamat taşıyıcısı olarak tanımlanabilir.

**EAAT2**; glial hücrelerdeki spesifik taşıyıcı proteini olarak tanımlanabilir.

**EAAT3**; hücrelerde ve bazı nöronların dendritlerinde bulunur.

**EAAT4**; purkinje nöronlarında;

**EAAT5** ; glia'da ve retinadaki nöronlarda bulunmaktadır (15).



**Şekil 3. Glutamat, reseptörleri ve taşıyıcıları.**

Glutamat taşıyıcıları; glutamat nörotoksisitesini önlemede kritik role sahiptirler. Glutamat taşıyıcılarının fonksiyonlarını yerine getirebilmesinde; membran kolesterolü, hücre içi sinyal molekülleri ve proteinler önemli rol oynar. Özellikle membran kolesterolü glutamat taşıyıcılarının fonksiyonlarını etkiler. Metil- $\beta$ -siklodekstrin tarafından membran kolesterolünün azalması; primer kortikal hücrelerde  $\text{Na}^+$ -bağımlı glutamat uptake'ini azaltır. EAAT2 aracılığı ile gerçekleşen glutamat uptake'i bu etkiye daha da duyarlıdır. Kolesterolden zengin lipid depoları EAAT2'nin fonksiyonları ve lokalizasyonları üzerinde etkilidir; kolesterol kaybı, EAAT2'nin plazma membranına olan etkisini olumsuz yönde değiştirir. Bu etkiler; nöronal glutamat taşıyıcıları olan EAAT1, EAAT2 ve EAAT3'de daha az görülür. Fare beyinlerinde de glutamat uptake'inin azalması kolesterol tükenmesinin glutamat taşıyıcıları üzerindeki direkt etkisi ile ilişkilendirilebilir (13).

Glutamat taşıyıcılarının fonksiyonları üzerinde proteinlerin de rolü vardır. GTRAP3-18 adlı protein, EAAT3 ile etkileşerek EAAT3-aracılı glutamat transportunu negatif bir şekilde etkilerken, GTRAP41 ( $\beta$ -spektrin-3) ve GTRAP48 (RhoGEF-11) adlı proteinler EAAT4-aracılı glutamat transportunu artırır (13).

Bunların içinde, memelilerin merkezi sinir sisteminde glutamat uptake'inin % 90'ına aracılık etmesi, sinaptik iletimin sonlandırılması ve glutamatın nörotoksisitesine karşı

nöronları koruması açısından, EAAT2 (GLT-1, astroglial protein) büyük önem taşımaktadır. Bu protein normal eksitator sinaptik iletimde önemli bir role sahiptir, fonksiyonunun bozukluğunda akut ve kronik nörolojik bozukluklar ortaya çıkmaktadır (16) (amyotrofik lateral skleroz-ALS, beyin tümörleri, epilepsi türleri-temporal lob epilepsisi, bunama, hepatik ensefalopati, Parkinson hastalığı, felç, vb.) (17-20). Özellikle ALS'li hastalarda glutamat taşıyıcısındaki ana eksiklik, EAAT2'nin aktivitesinin bozulmasından (21), motor korteks ve spinal kordtaki EAAT2 protein kaybından ileri gelmektedir (22). Bu durumun nedeni, GLT-1'i hücre yüzeyinden uzaklaştırıp yerleşimini bozarak down-regülasyonuna sebep olan süperoksid dismutaz (SOD1) enziminin kodlandığı gen üzerindeki mutasyondur (23). Bunun yanı sıra, EAAT2, travmatik omurilik zedelenmesinin neden olduğu hücre ölümlerinde de sınırlayıcı bir role sahiptir (24,25). Ayrıca, SOD1 mutasyonuna bağlı gerçekleşen ALS hastalığındaki patolojik mekanizma incelendiğinde, EAAT2'nin kaspaz-3 ile etkileşerek inaktif hale gelmesi düşünülmektedir (26,27).

Bunun yanı sıra, diabetes mellitus halk diliyle şeker hastalığı, merkezi sinir sistemi bozukluklarına (felç, kriz, bunama, çeşitli bilişsel bozukluklar) yol açan bir hastalıktır. Tam olarak hücrenel mekanizması anlaşılmasa da şeker hastalığının merkezi sinir sistemindeki glutamat taşıyıcıları ve proteinler üzerine olumsuz etkileri vardır. Bununla ilgili yapılan Western blotting ve immunohistokimya çalışmalarında serebral kortekste, hipokampusta veya serebellumda astrosit glutamat taşıyıcıları seviyesinde aralarında anlamlı farklılıklar bulunamamıştır (28). Bu yüzden beynin hangi bölgesini etkilediği konusunda tam bir fikir yürütemeyiz.

Ayrıca EAAT2 ve EAAT3 aktiviteleri; kortikal nöronlarda sistein uptake'ine aracılık ederek glutatyon sentezinde sınırlayıcı bir roldedir (sistein glutatyon sentezinde sınırlayıcı bir faktördür, dolayısıyla bu taşıyıcılar sistein uptake'ine aracılık ederek glutatyon sentezini sınırlandırır) (29).

EAAT2, insülin salgısının düzenlenmesinde de rol oynamaktadır. Glutamat veziküller glutamat taşıyıcıları (VGLUTs), özellikle VGLUT3, tarafından veziküller içine pompalanır, eksitator amino asit taşıyıcıları (EAATs), özellikle EAAT2, tarafından hücre dışı nöronlara ve glial hücrelere taşınır. Knock-out farelerde salgı granüllerindeki glutamat içeriği yaşayan farelere oranla daha yüksek bulunmuştur. Bu data yukarıdaki ifadeyi desteklemektedir (30). Önceki yıllarda, sinaptik aktivitedeki kritik önemine rağmen pratikte bu proteini modüle eden farmakolojik bir ajan yoktu. Son yıllarda yapılan çalışmalarda beta-laktam antibiyotiklerin glutamat uptake'ini artırdığı gösterilmiş olup, bu antibiyotikler arasında özellikle seftriakson üzerinde çalışılmıştır.

GLT-1 farmakolojisini açıklamakta kullanılan, GLT-1 aktivasyonu aracılığı ile glutamat uptake'ini arttıran ilaçlar olarak tanımlanan beta-laktam antibiyotikler GLT-1'i stimüle eder, ayrıca GLT-1 gen transkripsiyonunu artırır. Beta-laktamlar ve çeşitli yarı-sentetik türevleri, antibakteriyel etki de gösterirler. Hayvan çalışmaları, seftriaksonun GLT-1'in biyokimyasal ve fonksiyonel aktivitesini artırdığını göstermektedir. Ayrıca seftriakson; sıçanlarda morfine tolerans gelişmesini bloke eder (31,32), amfetamin veya kokain kaynaklı hiperaktivite ve duyarlılığı azaltmaya yardımcı olur (33,34), doğum öncesi uygulanan seftriakson henüz gelişmemiş beyinde nöroproteksiyona yardımcı olur, yeni doğmuş sıçanlarda ensefalopati riskini azaltır (35), opioid ve kannabinoidlerin analjezik ve hipotermik etkilerine tolerans gelişmesini önlemekte kullanılır. Burada önemli olan nokta, bütün bu önleyici etkiler GLT-1 aktivasyonu mekanizması üzerinden gerçekleşir (36). Seftriaksonun primer insan fetal astrositlerinde EAAT2 ekspresyonunu NF-κB sinyal yolu aracılığı ile artırdığı bildirilmiştir (19). Seftriaksonun *in vivo* ve *in vitro* koşullarda iskemik yaralanmalarda, motor nöron dejenerasyonunda, glutamat toksisitesine karşı nöroprotektif özelliği de vardır (37). Bu ilaç, ölümcül bir hastalık olan ALS'li hayvan modellerinde kullanıldığında kaslardaki zayıflığı önleyerek ve nöronların kaybını geciktirerek farelerin ölüm riskini azaltmıştır. Ayrıca, bu çalışmalar nöroterapötiklerin gen aktivasyonu yaparak glutamat taşıyıcılarını düzenlediğini göstermektedir (2).

## ÖĞRENME VE BELLEK

Beyin sinir hücrelerinden meydana gelir. Önceki bilgilerle, yeni bilgilerin birleşmesi sinir hücrelerinin oluşturduğu ağ ile olur. Beynin çevremizden, tecrübelerimizden elde edilen bilgileri depolama görevi vardır. Depolama olmasaydı çoğu bilişsel görev yerine getirilemezdi. Nöronal sistem tüm olayları algılayarak bir tepki verir. Bu olayları algılama duyu organlarımızla gerçekleşir. Duyu organları bilgileri omurilikteki sinir hücreleri sayesinde sinir sistemine iletirler (38).

Öğrenme; kişilerin bilinçli ya da bilinçsiz olarak etkileşimde buldukları yaşantılar neticesinde, sinir sistemi tarafından elde edilen bilgilerin ve davranıştaki değişikliklerin izlenmesi işlemidir. Bununla birlikte öğrenmenin nasıl meydana geldiği konusunda ortaya atılan çeşitli fikirler, farklı kuramların doğmasına sebep olmuştur. Öğrenmenin doğasını ve doğurduğu sonuçları açıklamaya yönelik ortaya atılan bu kuramlar;

- Davranışçı kuram

- Bilişsel kuram
- Duyuşsal kuram
- Nörofizyolojik ya da beyin temelli kuram olarak sıralanabilir.

**Davranışçı kuram;** öğrenmenin edimsel sonuçlarıyla ilgilenir. Uyarıcı ile davranış arasında kurulan bağ sonucu öğrenme gerçekleşir ve pekiştirme ile davranış değişimi meydana gelir. Davranıştaki gözlemlenen bir değişimdir.

**Bilişsel kuram;** öğrenmenin doğrudan gözlemlenemeyen zihinsel bir süreç olduğunu savunur ve öğrenmenin zihinsel süreçleriyle ilgilenir. Daha çok anlama, algılama, düşünme gibi olayları inceler.

**Duyuşsal kuram;** öğrenmenin sağlıklı benlik gibi duyuşsal sonuçları ile ilgilenir.

**Nörofizyolojik (beyin temelli) kuram;** öğrenme biyokimyasal bir değişim olarak açıklanmaktadır. Öğrenme süreci sonucunda nöronlarda yeni akson iplikçiklerinin oluştuğu açıklanır (39).

Beynimizin ana birimleri, nöronlar ve sinapslardır. Bilgi işleme sürecinin güçlü olması nöronların oluşturduğu ağ sayısının fazla oluşu ile orantılıdır.

Nörobilim alanında yapılan araştırmalara göre öğrenmeyi etkileyen etmenleri şöyle sıralayabiliriz; bellek, çevre, uyku süreci, motivasyon, dikkat, çeşitli duygular, beslenme alışkanlıkları (39).

**Bellek;** öğrenilen konuları, geçmiş yaşantıları, bilgileri ve bunların geçmişle ilişkisini bilinçli olarak zihinde saklama ve hatırlama yetisidir (38,40). Belleği hücresel boyutta incelediğimizde nöron demetlerinin ateşlenmesi olarak tanımlanabilir. Bellek; insanlar için önemli bir yetidir. Bellek kazanılan bilgileri kaydeder, inceler, biriktirir. İstenildiğinde geri çağırarak yararlanmaya imkan verir. Bellek, insanların dil, kültür ve bilimi geliştirmelerine neden olmuştur. Bellek olmasaydı, insanlar her bilgiyi yeniden öğrenmek zorunda olacaklardı.

### **Belleğin Sınıflandırılması**

İnsanların öğrendikleri bilgiler bazen hemen kaybolabilir, bazıları ise zihinde aylar, yıllar boyunca kalırlar. Bellekte başka bir objenin öğrenilmesi, ilk öğrenilen objenin tutulduğu belleği bozabilir. Günler ve haftalarca süren çalışmalarla sağlamlaşır. Bellekte bilgilerin uzun süre kalması tekrarlama ile mümkündür. Beynimiz kazanılan bilgileri belleğimize alırken; belirli, benzer özelliklerine göre sınıflandırır. Bu yüzden belleğin sınıflandırılması bilginin saklanma süresine ve saklanan bilginin tipine göre yapılır. Bilginin saklanma süresine göre bellek;



- kısa süreli bellek (*short-term memory*)
- uzun süreli bellek (*long-term memory*) olarak sınıflandırılır.

Saklanan bilginin tipine göre de;

- deklaratif bellek (*declarative memory, explicit memory*)
- non-deklaratif bellek (*non-declarative memory, implicit memory*) olarak sınıflandırılır (38,40).

**Kısa süreli bellek:** Bilginin geçici bir süre için (unutulana kadar) saklanmasından sorumludur. Sürekli çevre ile etkileşim halinde bulunan birey, duyu reseptörleri aracılığıyla uyarıcıları algılar. Bireyin gördüğü, işittiği, duyduğu, tattığı ya da hissettiği şeyler içeriğini oluşturmaktadır. İki bileşene ayrılır:

*Anlık bellek (Immediate memory):* Bilginin alındığı andan itibaren akılda aktif bir şekilde tutulmasından sorumludur. Şu anki dikkatimizin odaklandığı bilgiyi tutar. Kapasitesi çok azdır (7-10 birim), tekrarlama yapılmadığı takdirde 30 sn'den kısa sürelidir.

*Çalışan bellek (Working memory):* *Anlık bellek*'deki bilgi aktif bir şekilde tekrarlanırsa, tutulma süresi uzatılabilir (dakikalarca). *Anlık bellek*'in bu şekilde uzatılmış şekline çalışan bellek (*working memory*) adı verilir. Kısa süreli bellekteki bilgi sürekli tekrar edilirse, uzun süreli belleğe aktarılmış olur. Kısa süreli belleğin oluşumunda sinapslardaki kimyasal değişiklikler rol oynamaktadır. Kısa süreli bellekteki bilgiler bir süre hipokampüste saklandıktan sonra uzun süreli belleğe aktarılmaktadır (38,39,41).

CA1, CA2, CA3 ve gyrus dentatus olmak üzere anatomik olarak dört bölümden oluşan hipokampus; kavramsal bellek için önemli bir bölgedir (42). Hipokampus yön bulmak için deney düzeneğinin dışında, çevredeki ipuçlarını kullanır (uzaysal öğrenme). Bilindiği gibi hipokampus, uzaysal öğrenme ve belleğin merkezidir. Hipokampus spesifik uzaysal bilginin kodlanması işlevini yapar (42). Uzaysal öğrenme, hipokampusta NMDA reseptör aracılığı ile oluşan LTP sayesinde olur (43). Görünmez platformun bulunduğu su labirenti deneyinde denekler platformun yerini havuz dışı ipuçlarını kullanarak öğrenmektedirler. Bu öğrenme ve hatırlama sürecinde sağlam ve fonksiyonel bir hipokampusun bulunması gerektiği bilinmektedir. Hipokampal inaktivasyonun Morris Su Labirenti öğrenme sürecini uzattığı, deneklerin *probe* testinde amaçsızca yüzdükleri görülmüştür (42).

Fareler Morris su labirentinde görünmez platformun yerini öğrenmede;

- lokalizasyon merkezli
- rota merkezli olmak üzere iki mekanizma kullanırlar.

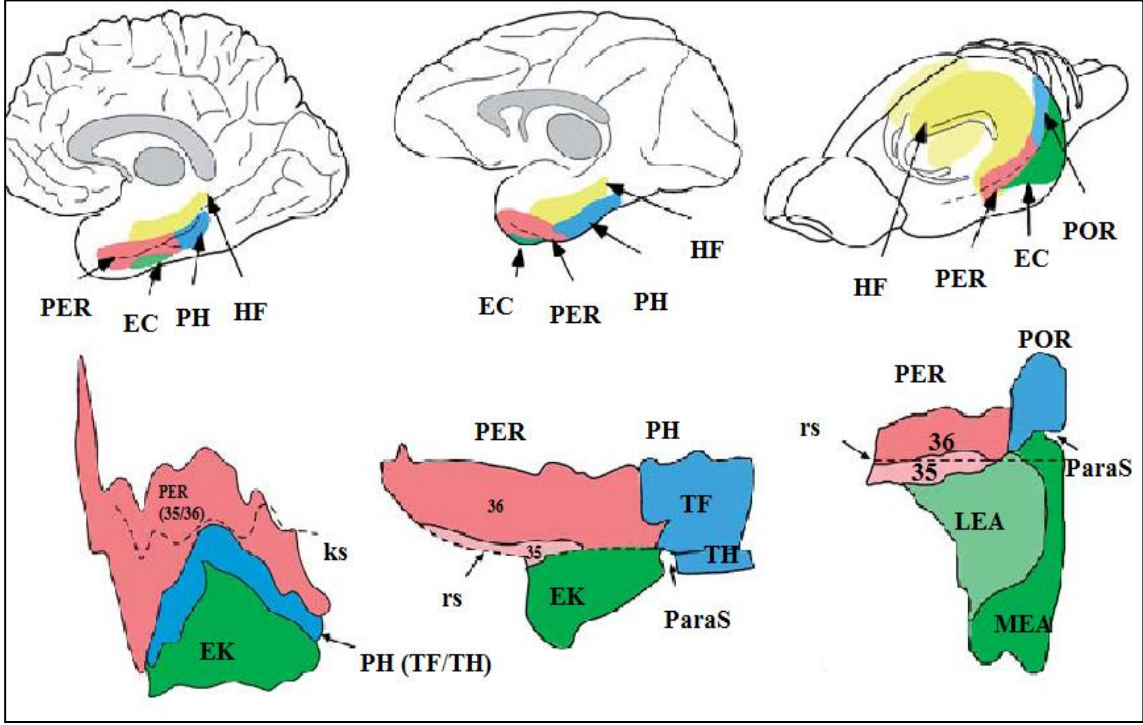
Bu iki mekanizma beş aşamadan oluşur; ilk iki basamak lokalizasyon merkezli, diğer üçü ise rota merkezlidir. İlk basamakta fare önce çevreyi araştırır, tanımaya çalışır. İkinci basamakta aynı ortama tekrar girdiğinde platforma göre kendini lokalize eder. Bu bilgi ile platforma ulaşmak için yüzme rotasını çizebilmektedir. Üçüncü basamak rotanın öğrenilmesidir, fare bu çizdiği rotada hareket ederken hipokampus CA3 bölgesindeki bağlantılar da depolanmaya başlar. Dördüncü basamakta rotanın uyku sırasında yeniden çizildiği görülür, böylece rotanın bilgisi CA3 bağlantılarında kalıcı hale getirilir. Sonuncu basamakta ise yerleşme, uykuda da çizilen rota uzun süreli belleğe transfer edilir. Doğru rotanın çizilmesi ve hedef kadranın bulunması için hipokampus CA3 bölgesindeki nöronlara ihtiyaç vardır.

Hipokampus CA1 bölgesi nöronları da uzaysal öğrenme ve bellek için gereklidir. CA1 bölge nöronları entorinal korteksten veya CA3 bölgesinden bilgileri alır ve işler. Hipokampus CA3 bölgesi lezyonlu ancak CA1 bölgesi sağlam farelerin su tankı deneyinde öğrenme sürecinde başarılı oldukları ancak bilginin geri çağırıldığı *probe* testinde amaçsızca yüzdükleri görülmüştür. Dolayısıyla sağlam bir CA3 ve CA1-CA3 bağlantısı referans bellek (*reference memory*) için şarttır (42). Yeni doğmuş farelerde hipokampal CA1 bölgesindeki nöronlar melamin maddesi tarafından inhibe edilebilmektedir. Melamin, glutamat salınımını (presinaptik) azaltarak, LTPyi olumsuz yönde etkiler, bu durum da uzaysal öğrenmede ve bellek süreçlerine olumsuz bir şekilde yansımaktadır. Morris Su Labirenti testlerine göre de; uzaysal öğrenme ve bellek süreçleri melamin maddesi tarafından olumsuz bir şekilde etkilenmektedir (44).

Hipokampus CA1 bölgesi; Schaffer kollateralleri döngüsü sayesinde CA3 bölgesi ile bağlantı kurabilir. CA1 bölgesinden çıkan bilgiler subikulum, entorinal korteks ve prefrontal kortekse kadar uzanır. CA1 bölgesi iki grup bilgi alabilir. Bu bilgilerin küçük bir kısmı entorinal korteksten gelirken, büyük kısmı CA3 bölgesinden gelmektedir. Araştırmalar entorinal korteksten gelen bilgilerin CA1'in uzaysal ateşlenmesi için yeterli olduğunu göstermektedir. CA1 bölgesi adeta bir "hata dedektörü" gibi çalışır, CA3 bölgesi ve entorinal korteksten aldığı bilgi arasındaki uyumsuzluğu arar ve depolanan bilgi düzeltilir (42). Hipokampus ile frontal korteks arasındaki bağlantılar bilgi işlem sürecinde ve bilişsel fonksiyonlarda önemli rol oynamaktadır (45). Örneğin; şizofrenli hastalarda gerektiği zaman prefrontal kortekste bazı alanları etkinleştiremedikleri kabul edilir (46). Dış çevreden gelen duyu bilgileri kortikal bağlantılar yardımı ile hipokampus ve amigdala'ya yönelir (45). Hipokampusun anatomik yapısının şekil olarak gösterimi bir sonraki bölümde anlatılacaktır.

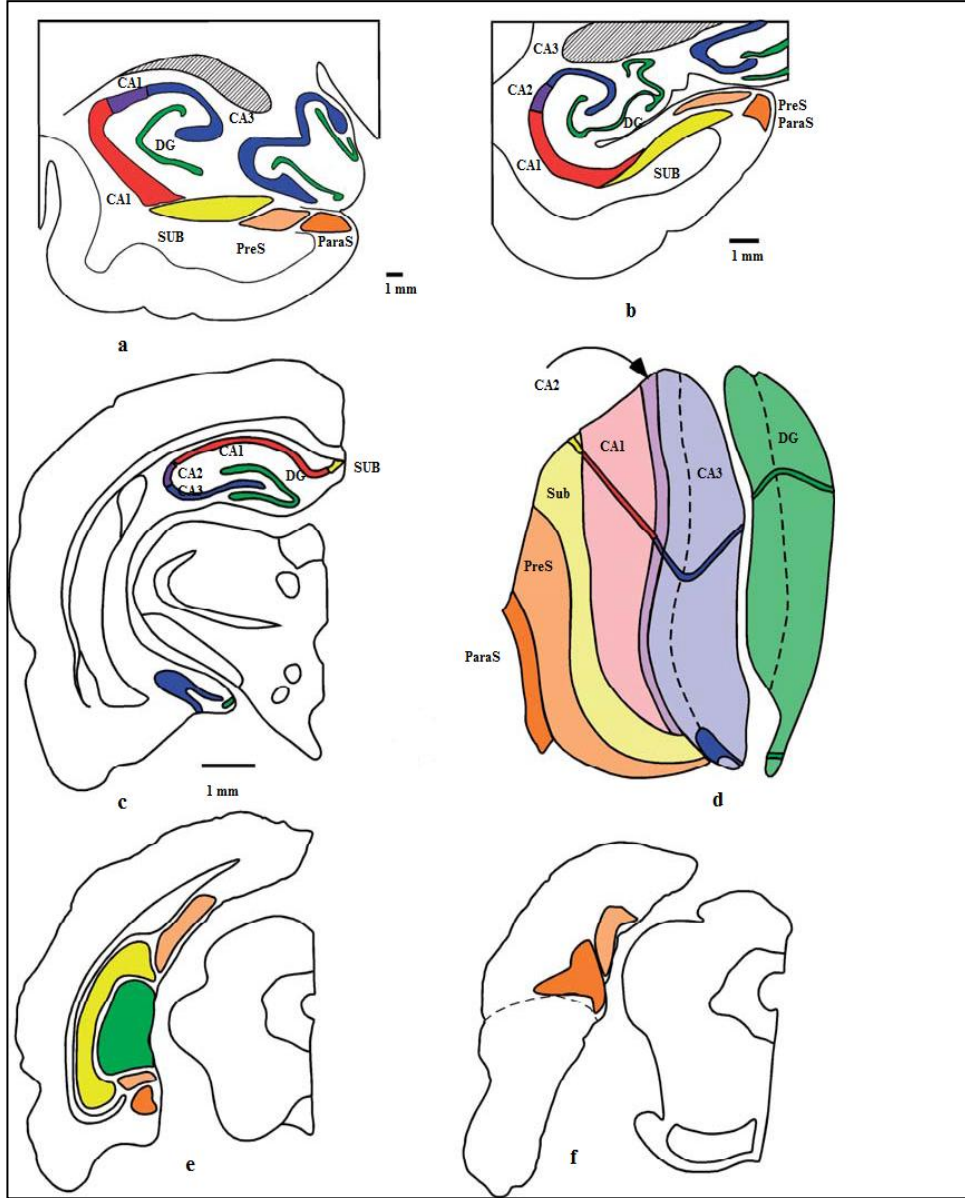
**Uzun süreli bellek:** Bu bellekte bilgiler kısa süreli bellek bilgilerinden, daha uzun süre saklanır, depolanır, istenildiğinde geri çağrılabilir. Uzun süreli bellekte sınırsız bir kapasite vardır. Belleğin oluşumunda sinapslardaki kimyasal mekanizmalar ve yapısal değişiklikler rol oynar. Bilgilerimizi ömür boyu saklayabiliriz ve potansiyel olarak bu bilgilere ulaşabiliriz, ancak her zaman geri çağıramayabiliriz. Genellikle uzun süreli bellekte sözcükler işitildikleri seslerle birlikte değil, taşıdıkları anlamları ile saklanmaktadır. Ayrıca uzun süreli bellekte ses, koku ve görüntülerin saklanması da mümkündür. Edinilen bilgilerin saklanması beynimizde nöral bağlantılardaki kalıcı fonksiyonel, biyokimyasal ve yapısal değişikliklerle mümkün olmaktadır (38,39,41).

**Deklaratif bellek:** Deklaratif bellek, *explicit memory* ya da bilinçli bellek olarak da adlandırılabilir. Olaylar, kavramlar, yüzler, müzik, kelime hatırlama deklaratif belleğe aittirler. Bunları hatırlarız ve söyleriz, bunu bilinçli bir şekilde yaparız. Deklaratif bellekte bilgi kodlanır, depolanır, geri çağrılır ve unutulur. Deklaratif belleğin uzun süreli saklanmasında medyal temporal lob önemli bir rol oynamaktadır. Bu lob, bilginin öğrenilmesinde ve uzun süreli belleğe yerleştirilmesinde büyük öneme sahiptir. Uzaysal öğrenme de deklaratif belleğin bir parçasıdır. Kısaca, bir ipucu ile bir obje arasındaki ilişkiyi öğrenmek olarak tanımlanabilir. Görüntüler ve uzaysal ilişkilere karşılık gelen bellek görsel-uzaysal bellek ya da sadece uzaysal bellek olarak adlandırılabilir. Bu tip belleğin sorumlu olduğu bir duruma araba ile yön bulma (navigasyon) örnek olarak verilebilir. Uzaysal bellek ve epizodik bellek (anısal bellek) hipokampus ve etrafındaki yapılarla ilgili olsa da, bazı teorisyenlere göre, uzaysal bellek; epizodik-deklaratif bellek ve diğer ilgili bellek türlerinden (semantik bellek) farklıdır, çünkü uzaysal bellek zihinsel haritaların oluşumuna ihtiyaç duyar. Mackintosh'a göre ise, uzaysal öğrenme çağrışımsal öğrenmelerden farklı değildir (49). Uzaysal öğrenmede, morris su labirenti ve sekiz kollu labirentlerden yararlanır.



**Şekil 4. İnsan (sol), maymun (orta), rat (sağ) beyinlerinin hipokampal sistemlerinin karşılaştırmalı görüntüleri. PER: peririnal bölge (35/36), EK: entorinal korteks, PH: parahipokampal bölge (TF/TH), POR: postrinal korteks, ks: kollateral sulkus, rs: rinal sulkus, ParaS: parasubikulum, LEA: lateral entorinal bölge, MEA: medyal entorinal bölge.**

Bilginin kısa süreli bellekten uzun süreli belleğe aktarılış şeklinde farklılıklar vardır. Buna göre, uzun süreli bellek; işlemsel bellek (*procedural memory*) ve deklaratif bellek (*declarative memory*) olarak sınıflandırılır. Deklaratif bellek, episodik epizodik bellek veya otobiyografik bellek olarak çeşitli şekillerde adlandırılabilir. Hayvan modellerinin kullanıldığı bellek araştırmalarında ise episodik epizodik bellek isminin kullanılması daha uygun olmaktadır (48).



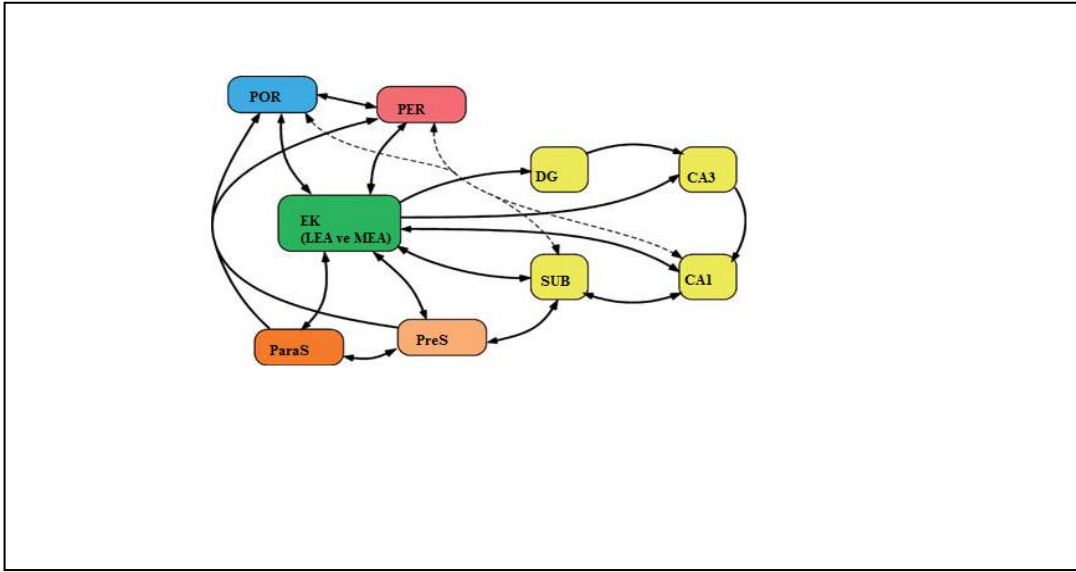
**Şekil 5. Pre- ve para-subikulum yapılarının karşılaştırmalı görüntüleri. a) insan beyni, b) maymun beyni, c) rat beyni. DG: dentate gyrus (yeşil), PreS: pre-subikulum (açık turuncu), ParaS: parasubikulum (koyu turuncu), Sub: subikulum (sarı). CA3: mavi, CA2: mor, CA1: kırmızı (d), LEA ve MEA (e), postrinal korteks (f).**

İşlemsel bellek örtük (*implicit*) bir süreçtir. Geçmişteki tecrübelerle dayanarak bireyin davranışlarını etkileyen bellektir. Ancak bilinçli olarak bu davranış değişikliklerinin farkına varılamaz. Bilinçsiz ve otomatiktir. Motor becerilerin edinilmesiyle ilgilidir. Araba kullanmak, bisiklete binmek, bir müzik aleti kullanmak işlemsel bellek ile ilgilidir. Bir kez öğrenildikten sonra davranışlar otomatik olarak gerçekleşir (41).

## Hipokampüs Anatomisi

Hipokampal sistem; hipokampal oluşumlar ve parahipokampal bölge olarak 2 kısımda incelenebilir (Şekil 4). Hipokampal oluşumlar dentate gyrus, hipokampüs hipokampus bölgeleri (CA1, CA2, CA3) ve subikulum (Şekil 5). Birbiri ile ve parahipokampal bölge ile olan bağlantıları da Şekil 6'da gösterilmiştir (48).

Parahipokampal bölge, retrohipokampal bölge olarak da isimlendirilebilir. Peririnal, postrinal, entorinal, presubikular ve parasubikular korteks gibi yapılardan oluşur (Şekil 4).



Şekil 6. Hipokampal sistemin basit şematik gösterilişi. Hipokampal oluşumlar (sarı), parahipokampal bölge (kırmızı, mavi, yeşil, turuncu). EK: entorinal korteks, LEA: lateral entorinal bölge, MEA: medyal entorinal bölge, ParaS: parasubikulum, PreS: pre-subikulum, DG: dentate gyrus, POR: postrinal bölge, PER: peririnal bölge, SUB: subikulum.

## SEFALOSPORİNLER

Beta laktam antibiyotik grubundan olan sefalosporinler, antibakteriyel etki mekanizmaları, kimyasal yapıları ve spektrumları yönünden penisilin benzeridirler.

Sefem türevi olan 7-aminosefalosporanik asit (7-ASA) sefalosporinlerin ana çekirdeğidir. *Cephalosporium acremonium* türü bir mantarın kültürlerinde oluşan bu madde sefalosporin C'den elde edilir. İlaç olarak kullanılan sefalosporinler, 7- ASA'dan türetilirler, bunlar yarı-sentetik ilaçlardır.

Penisilinlerden yaklaşık 20 yıl sonra ilk sefalosporin antibiyotik bulunmuştur. Günümüze kadar çok sayıda, çeşitli sefalosporin türevleri ilaç olarak çıkarılmıştır.

Penisilinler gibi sefalosporinler de, “toksik doz/terapötik doz oranları” yüksek olan ilaçlardır. Bu ilaçlardan birinci ve ikinci kuşaktakiler, esas olarak penisilinlerinkine benzer endikasyonlarda kullanılırlar, ancak etkinlikleri penisilinlere göre genellikle biraz düşük ve fiyatları daha yüksek olduğu için endikasyonların çoğunda penisilinlere tercih edilmezler. Üçüncü kuşaktakiler ise, belirli gram negatif ve pozitif bakteri enfeksiyonlarında önemli ilaçlar sayılmaktadırlar. Üçüncü kuşak sefalosporin olan seftriakson, antibakteriyel etkilerinin dışında, 2-4 gram/gün dozda az sayıdaki ALS'li olguda uygulanmıştır. Seftriaksonun kalsiyum bağlayıcı ve antioksidan olma özelliklerinin yanı sıra, glutamat taşıyan protein düzeyinde artışa yol açarak kronik glutamat toksisitesinden nöronları koruduğu bildirilmiştir.

Penisilinlere alerjisi olan kimselerde onlara alternatif olarak kullanılırlar; ancak, hastadaki penisilin alerjisi hemen başlayan tipte ise (bronkospazm, ürtiker, anjiyoödem ve anafilaktik reaksiyon gibi belirtilerle ortaya çıkıyorsa), sefalosporinlerin de alerjik reaksiyon yapma olasılığı fazladır.

Sefalosporinler, diğer antibiyotiklere göre pahalı ilaçlardır. Penisilinlerin aksine, solüsyonları pH değişikliklerine ve ısıya oldukça dayanıklıdır; oda sıcaklığında çabuk bozulmazlar (49).

### Seftriakson

*H. influenzae*, *N. gonorrhoeae*, meningokoklar ve pnömokoklara karşı etkili olan, gram negatif bakteriler üzerinde etkili olması açısından sefotaksim ve seftizoksim'e benzeyen üçüncü kuşak bir sefalosporindir. *P. aeruginosa*, *B. fragilis*, enterokoklar ve stafilokoklar üzerinde etkinliği pek yoktur. Plazma proteinlerine %90 oranında bağlanır, beyin-omurilik sıvısına (BOS) sefotaksim ve seftizoksim kadar iyi geçer. Sodyum tuzu gibi yüksek çözünürlüğü vardır, kalsiyum tuzuna oranla daha az çözünür (50). Karaciğerde kısmen

metabolize edilir, kısmen de böbreklerden glomerüler filtrasyonla elimine edilir. Eliminasyon yarılanma ömrü en çok olan sefalosporindir (yaklaşık 8 saat). Yetişkinlerde bir günde i.v. yolu ile 1-2 g dozunda uygulanır, çocuklarda 50 mg/kg'dır; bakteriyel menenjitte, alt solunum yolu enfeksiyonlarında, gonorede ve bakteriyel enfeksiyonu olan hastalarda tercih edilir. Tifoya karşı alternatif olan bir ilaçtır, diğer ilaçlarla karşılaştırıldığında daha sık diyare yaptığı görülmüştür; bunda barsak mikroflorasını bozmasının katkısı vardır. Sıkça safra kesesinde çökeltiye sebep olabilir (diğer adıyla psödolitiazis, "safra çamuru"), bu bazen semptomatiktir, (bulantı ve kusma gibi); tedavi bitince 2 ay içinde çökelti kaybolur (49).



## GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışma Trakya Üniversitesi Hayvan Denepleri Yerel Etik Kurulu tarafından 16.02.2011 tarih ve 2 no.lu oturumda 2011/02/03 karar no.su ile onaylandı. (Ek-1) Çalışmamız İyi Laboratuvar Uygulamaları Kılavuzu ve Hayvan Etiği Evrensel İlkelerine uygun olarak gerçekleştirildi. Bu çalışma Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından TÜBAP-2011/53 kayıt numarası ile desteklendi (Ek-2).

### ÇALIŞMA GRUBU

Çalışma ağırlıkları 20-25 g olan, 12 haftalık erkek Balb/c farelerle yapıldı. Toplam 60 adet fare kullanıldı. Her çalışma grubunda onikişer fare bulunan 5 farklı gruptaki hayvanlar, 7 gün süreyle günde 4 deneme ile Morris Su Labirentinde saklı platformu bulma konusunda eğitildi. Sekizinci gün *probe* denemeleri yapıldı. Uzaysal öğrenme ve bellek Morris Su Labirenti ile değerlendirildi. Morris Su Labirenti, Richard Morris tarafından geliştirilmiş, fare ve sıçanlarda uzaysal öğrenmenin değerlendirilebildiği bir düzenektir (42). Bu testlerdeki performanslarına dayanarak farelerin öğrenme ve bellek fonksiyonları değerlendirildi. Çalışmadaki farelere uygulanan seftriakson dozları aşağıdaki gibidir (her grup için n=12);

**Grup A:** kontrol grubu,

**Grup B:** 8 gün süreyle, yüzdürmeden 1 saat önce intraperitoneal yoldan 50 mg/kg dozunda seftriakson uygulaması,

**Grup C:** 8 gün süreyle, yüzdürmeden 1 saat önce intraperitoneal yoldan 100 mg/kg dozunda seftriakson uygulaması,

**Grup D:** 8 gün süreyle, yüzdürmeden 1 saat önce intraperitoneal yoldan 200 mg/kg dozunda seftriakson uygulaması,

**Grup E:** Sekizinci gün probe denemesinden 1 saat önce intraperitoneal yoldan tek doz 200 mg/kg akut seftriakson uygulaması,

**Grup F:** 7 gün süreyle, yüzdürmeden 1 saat önce intraperitoneal yoldan 200 mg/kg dozunda seftriakson + 10 mg/kg dihidrokainik asit uygulaması,

**Grup G:** 7 gün süreyle, yüzdürmeden 1 saat önce intraperitoneal yoldan 10 mg/kg dihidrokainik asit uygulaması,

**Grup H:** Sekizinci gün probe denemesinden 1 saat önce intraperitoneal yoldan tek doz 200 mg/kg akut seftriakson + 10 mg/kg dihidrokainik asit uygulaması,

**Grup I:** Sekizinci gün probe denemesinden 1 saat önce intraperitoneal yoldan tek doz 10 mg/kg akut dihidrokainik asit uygulaması.

Seftriaksonun etkilerini GLT-1 üzerinden yapıp yapmadığını anlayabilmek amacıyla, Grup F ve Grup H’da seftriakson ile birlikte GLT-1 inhibitörü olan dihidrokainik asit birlikte uygulanacaklardı. Ayrıca, dihidrokainik asitin kendisinin uzaysal bellek üzerine akut veya kronik etkilerinin olup olmadığını belirlemek için Grup G ve Grup I’da bu ilaç tek başına verilecekti. Ancak, seftriaksonun akut veya kronik herhangi bir dozunda uzaysal bellek ile ilgili hiçbir parametre üzerine etkili olmaması nedeniyle, bu gruplar deneyden çıkarıldılar.

Çalışmamızda kullanmış olduğumuz fareler Trakya Üniversitesi Deney Hayvanları Birimi’nden alındı. Enjeksiyonlar farelerin ağırlıkları tartılarak yapıldı, kuyruk ve kulakları daha önceden belirlenmiş olan renkli numaralandırma sistemine uygun olarak boyandı. Daha sonra da fareler önceden hazırlanan kafeslerine yerleştirildiler.

Çalışmada farelerin barınmasını ve beslenmesini sağlayacak özelliklere sahip, eni 36 cm, boyu 60 cm ve derinliği 36 cm olan, şeffaf PVC (polivinil klorür) özelliğinde, 10 adet kafes kullanıldı. Kafeslerin üzerine farelerin beslenebilmeleri için yem ve su konulabilecek özellikteki metal yemlikler yerleştirildi. Bu yemliklerdeki su ve yem miktarı her gün kontrol edilerek yenilendi. Kafeslere A, B, C, D, E şeklinde isimler verildi.

A grubu (kontrol) hariç, B,C,D gruplarına belirlenen dozda uzun süreli intraperitoneal yoldan ilaç uygulaması yapıldı. E grubuna ise tek doz intraperitoneal yoldan ilaç uygulaması yapıldı. Tek doz uygulamasının olmadığı diğer günlerde serum fizyolojik (%0,9 NaCl) uygulaması, kontrol grubuna ise deney süresince sadece serum fizyolojik uygulaması yapıldı. Grup B, C, D’ye sırasıyla 50, 100, 200 mg/kg dozunda seftriakson uygulandı. İlaç uygulamasından 1 saat sonra kafesler sırayla Morris su labirentinin bulunduğu laboratuvara alındı ve fareler sırayla su tankının içinde yüzdürülmeye başlandı.

## MORRİS SU LABİRENTİNDE ÖĞRENME VE BELLEĞİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Çapı 1,2 metre, derinliği 43 cm olan daire şeklinde bir su tankı içinde su yüzeyinin 2 cm altında saklı bulunan bir platformdan ibarettir. Çalışmada platform, eğitim yüzdürmelerinin (trials) yapıldığı 7 gün boyunca sabit bir noktada bırakıldı. Eğitim yüzdürmelerinde fareler her gün, günde 4 eğitim olmak üzere farklı yönlerden (Tablo 1) su tankının içine bırakıldılar ve böylece havuz içinde görünmez haldeki platformun yeri öğretildi. Farelerin 60 saniye içinde saklı platformu bulmaları beklendi. Platformu bulduktan sonra platform üzerinde 10 saniye kalmalarına izin verildi ve sonra su tankından alınıp, kurularak kafeslerine yerleştirildiler. Bir dakika içinde platformu bulamayan farelere yardım edilerek platformu bulmaları sağlandı ve 10 saniye platform üzerinde kalmalarına izin verildi. 7 gün boyunca deneklerin gösterdikleri performans hayvanların öğrenme eğrilerinin değerlendirilmesini sağladı. Sekizinci gün yapılan hatırlama testinde (probe test) platform su tankından çıkarıldı ve fareler daha önce hiç suya bırakılmadıkları yönden (kuzeydoğu) bırakılarak sadece bir kez 60 saniye süreyle yüzdürüldüler.

Su tankının bulunduğu odanın duvarlarında deneyler boyunca sabit olan çevresel ipuçları asılı bırakıldı ve farelerin bu ipuçlarına bakarak platformu bulmaları sağlandı. Su tankı üzerine yerleştirilmiş bir video kamera aracılığı ile deney verileri bilgisayara aktarıldı, Noldus Ethovision XT 7.0 yazılımı tarafından analiz edilerek aşağıdaki parametreler hesaplandı:

Eğitim yüzdürmeleri sırasında ölçülen parametreler: platformu bulana kadar geçen süre, platformu bulana dek hayvanın yüzdüğü mesafe, platforma olan ortalama uzaklık, yüzme hızı ve havuz duvarına 10 cm mesafede yüzme süresi.

Test (*probe*) yüzdürmeleri sırasında ölçülen parametreler: platformun olması gerektiği yere ilk kez ulaşana kadar geçen süre, hedef kadrana (güneybatı) ulaşana kadar geçen süre, hedef kadranda (güneybatı) geçirilen süre, platformun olması gereken bölgeye ortalama uzaklık, platformun olması gereken bölgeden geçiş sayısı ve havuz duvarına 10 cm mesafede yüzme süresi.

Platforma daha çabuk ulaşma veya daha kısa mesafe yüzerek platformu bulma, platformun yerinin öğrenildiğinin göstergesidir. 7 günlük bir eğitimde, her gün yapılan denemelerde elde edilen skorların toplanması da genel bir bellek parametresi olarak kullanılabilir.

Son olarak da, farelere immunohistokimya çalışmalarını etkileyebileceği düşüncesiyle anestezi verilmeksizin dekapitasyon ile ötenazi yapılarak beyin dokuları çıkarıldı ve

immunohistokimya örnekleri alındı. Tüm ilaçlar i.p. olarak uygulandı, teknikteki farklılıkları en aza indirmek için, davranış deneyleri aynı araştırmacı tarafından gerçekleştirildi.

**Tablo 1. Farelerin deney boyunca bırakıldıkları yönler**

| GÜN       | EĞİTİM 1 | EĞİTİM 2 | EĞİTİM 3 | EĞİTİM 4 |
|-----------|----------|----------|----------|----------|
| 1         | N        | E        | SE       | NW       |
| 2         | SE       | N        | NW       | E        |
| 3         | NW       | SE       | E        | N        |
| 4         | E        | NW       | N        | SE       |
| 5         | N        | SE       | E        | NW       |
| 6         | N        | E        | SE       | NW       |
| 7         | SE       | N        | NW       | E        |
| 8 (PROBE) | NE       |          |          |          |

(N: kuzey, E: doğu, S: güney, W: batı)

## İMMUNOHİSTOKİMYA

GLT-1; immunohistokimyasal olarak hipokampusta ne nükleer ne de sitoplazmik olmayan, diffüz bir boyanma gösterir.

İmmünohistokimyasal ve ışık mikroskopik rutin boyamalar için; hipokampus biyopsi materyalleri, %10'luk formaldehitle fikse edildikten sonra dokular yıkanarak, dehidratasyon işlemine geçildi. Dehidratasyon aşamasından sonra saydamlaştırma basamağı için dokular, toluol (Merck, Darmstadt, Germany) ile muamele edilmiş, önce yumuşak parafin (Merck), sonrasında sert parafine (Merck) alınarak, parafin bloklar elde edildi. Dokulardan histolojik ve morfometrik analizler için alınan 5 mikrometre ( $\mu\text{m}$ ) kalınlığındaki kesitlere, hipokampusun histolojik yapı özelliklerini ortaya koyacak Hematoksilen+Eozin boyaları uygulandı. Entellan ile kapatılarak daimi preparat haline getirildikten sonra, mikroskopta (Olympus BX51) incelendi ve değişik büyütmelerde fotoğrafları çekildi.

İmmünohistokimyasal olarak da; GLT-1 proteininin immünreaktivitelerinin değerlendirilebilmesi için; 5  $\mu\text{m}$  kalınlığındaki kesitler, poli-L-lisin kaplı lamlara alındı ve üretici firmanın önerileri doğrultusunda immunohistokimyasal işlemler uygulandı.

İmmünohistokimya prosedürü için; %10'luk formaldehitle fikse edilip, parafine gömülen biyopsi materyallerinden 5 $\mu\text{m}$ 'lik kesitler alındı ve antijen geri kazanımı için deparafinizasyon sonrası, lamlar 10 mM sitrik tamponunda (pH 6) kaynatıldı. Mevcut antijenleri bloklamak amacıyla GLT-1, tris tampon solüsyonu (TBS) ile hazırlanan normal

keçi serumunda (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) 30 dakika bekletildi. Sonra serum fazlası kesitlerin üzerinden alınarak, parçalar poliklonal tavşan anti-GLT-1 antikoru (Novus Biologicals, Littleton, CO, USA) 1:50 TBS içinde seyreltildi ve gece boyunca +4°C'de bekletildi. Bunu takiben TBS ile yıkamaların ardından, biotinylated anti-tavşan antikoru (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) 1:400 dilasyonunda uygulanarak, 30 dakika oda ısısında inkübe edildi. Parçalar TBS ile yıkandıktan sonra, avidin-biotin-peroksidaz kitle (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) 30 dakikalık muamele sonrasında, DAB (3,3-Dia-minobenzidine tetrahydrochloride dihydrate; Vector Laboratories) kullanılarak kromojenize edildi. Parçalara hematoksilenle zıt boyama uygulanarak, alkol ve toluol serilerinden geçirilmek suretiyle preparatlar kapatıldı.

Yapılan tüm immuhistokimyasal işlemlerin sonuçları; histolojik skorlama (HSCORE) yöntemi ile değerlendirildi. Değerlendirmeler; preparatların hangi grup hayvana ait olduğunu bilmeyen ve bilen birer değerlendirici tarafından, her preparatta rastgele seçilen beş alanda, x20 objektif kullanılarak yapıldı. Skorlama, kesitlerde immünreaktivite gösteren hücrelerin yüzdesi ve boyanma derecesinin (I x PC; I: boyanma derecesi, PC: her derecede boyanan hücrelerin yüzdesi) ölçüt olarak alındığı, semikantitatif bir yöntemle gerçekleştirildi. Boyanma derecesi: 0 (boyanma yok), 1 (zayıf boyanma), 2 (orta boyanma), 3 (güçlü boyanma) olarak değerlendirildi.

### **İSTATİSTİKSEL ANALİZ**

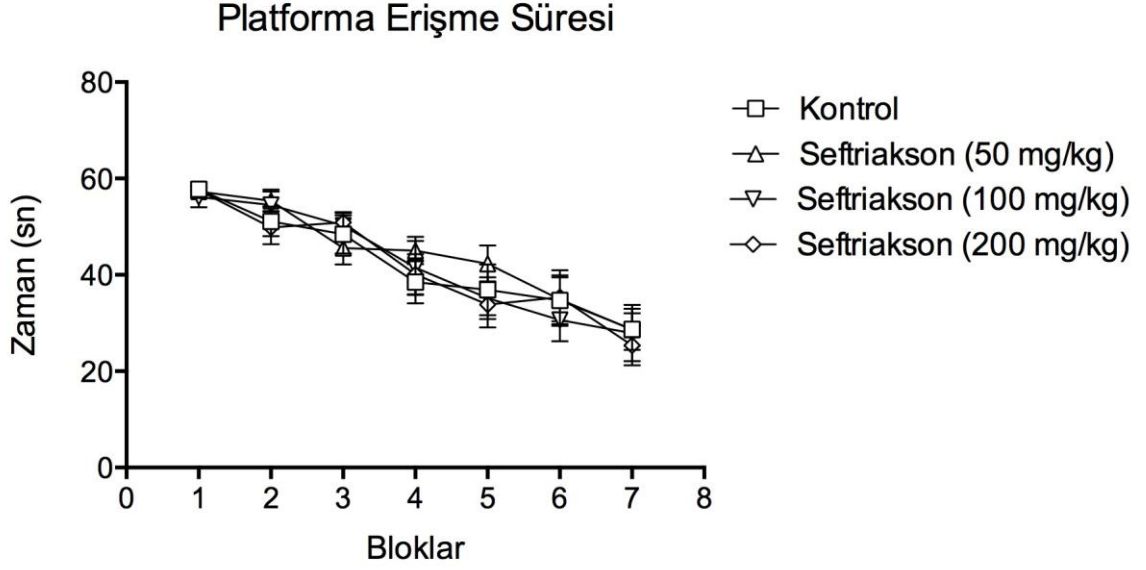
Verilerin sunulmasında tanımlayıcı istatistik kullanıldı. Eğitim yüzdürmelerinde elde edilen verilerin analizinde gruplararası karşılaştırmalar için tekrarlanan ölçümler iki yönlü varyans analizi ve *post hoc* Bonferroni testi, probe yüzdürmelerinden elde edilen verilerin ve immunohistokimya sonuçlarının karşılaştırılmasında ise tek yönlü varyans analizi ve *post hoc* Bonferroni testi kullanıldı. Analizler Graphpad Prism 6.0 for Mac OS X yazılımında gerçekleştirildi ve  $p < 0.05$  anlamlı kabul edildi.

## BULGULAR

Fareler, havuzdaki saklı platformun yerini öğrenmeleri için 7 gün süreyle her gün günde 4 kez yüzdürüldüler. Bir gün içinde uygulanan 4 deneme ile elde edilen verilerin ortalamaları hesaplandı ve böylece veriler günlük bloklar haline dönüştürüldü. Yedi gün süreyle yapılan bu eğitim amaçlı yüzdürme seanslarından elde edilen veriler grafikler haline getirilerek öğrenme eğrileri elde edildi. Yedi günlük eğitim döneminin ardından, sekizinci günde platform havuzdan çıkarılarak hayvanlar bir kez 60 saniye süreyle yüzdürüldüler (probe test, *retention*). Bu testte elde edilen parametreler de, farelerin uzun süreli uzaysal bellek performanslarını göstermektedir. Çalışmamızda saptanan bulgular, önce ilk 7 günlük döneme ait veriler (öğrenme üzerine etkiler, a-e) ve 8. gün yapılan bellek testine ait veriler (f-l) şeklinde 2 ana alt grupta sunulmuştur.

### a) Platforma Erişme Süresi

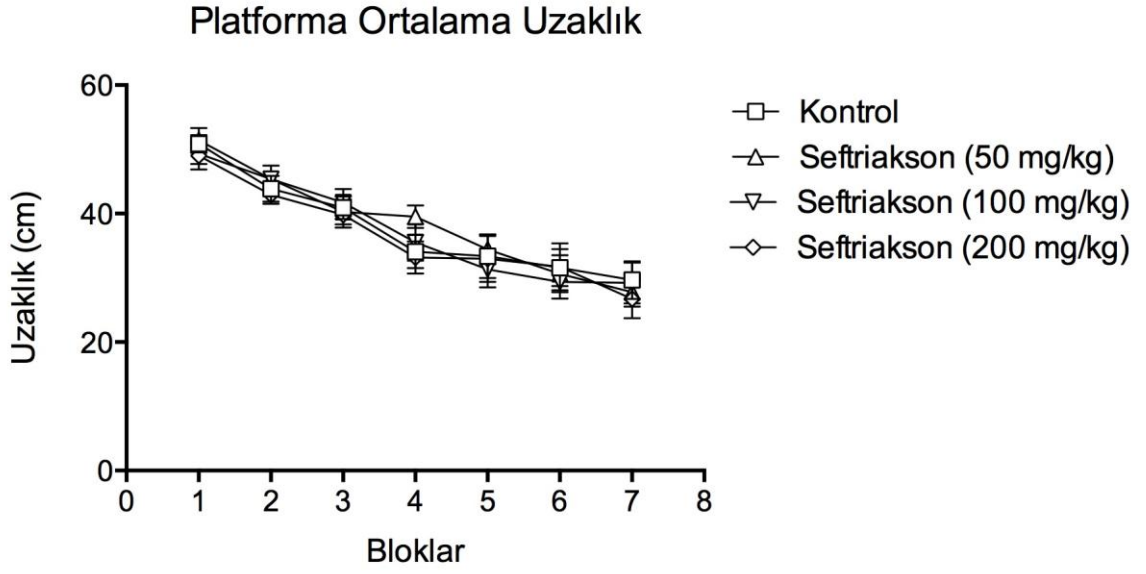
Kontrol grubundaki fareler 7 gün süreyle (özellikle 5., 6. ve 7. bloklarda) giderek daha kısa bir sürede platforma eriştiler (Şekil 7). Platforma erişme süresi açısından seftriaksonun öğrenme üzerine istatistiksel yönden önemli sayılabilecek etkisi bulunmadı.



Şekil 7. Günlük 4 yüzdürme eğitiminin ortalaması (blok) olarak farelerin platforma erişme süresi.

### b) Platforma Ortalama Uzaklık

Farelerin platforma olan ortalama uzaklıkları eğitimleri süresince giderek azalma gösterdi (Şekil 8). Seftriakson uygulanan farelerin bu parametre yönünden performansları arasında istatistiksel yönden anlamlı bir fark görülmedi. Seftriakson farelerin öğrenme fonksiyonunu bozmadı.

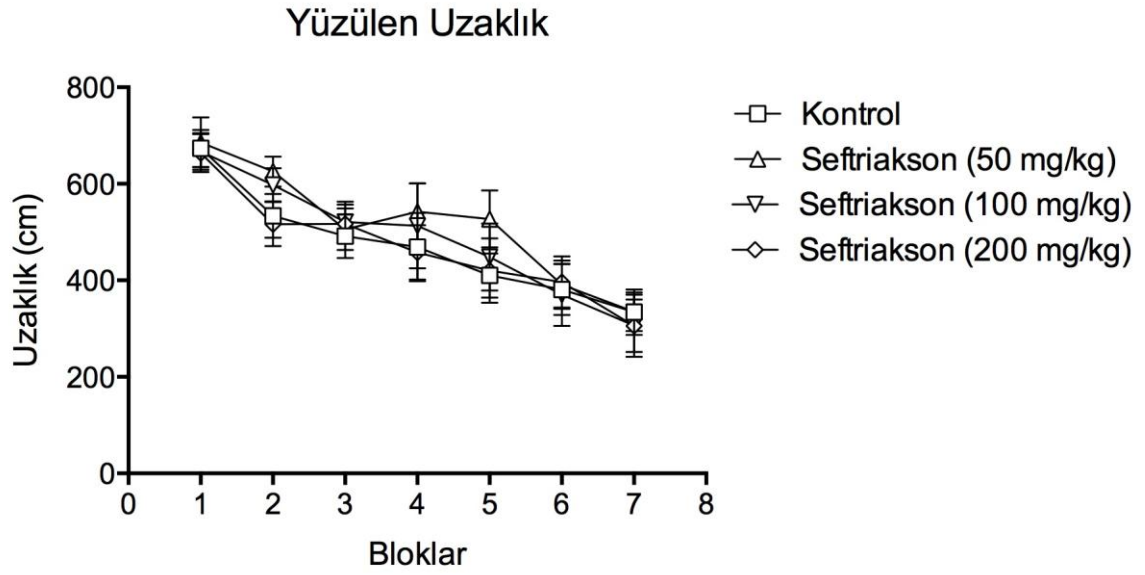


**Şekil 8. Günlük 4 yüzdürme eğitiminin ortalaması (blok) olarak farelerin platforma ortalama uzaklıkları.**



### c) Platforma Ulaşana Kadar Yüzülen Uzaklık

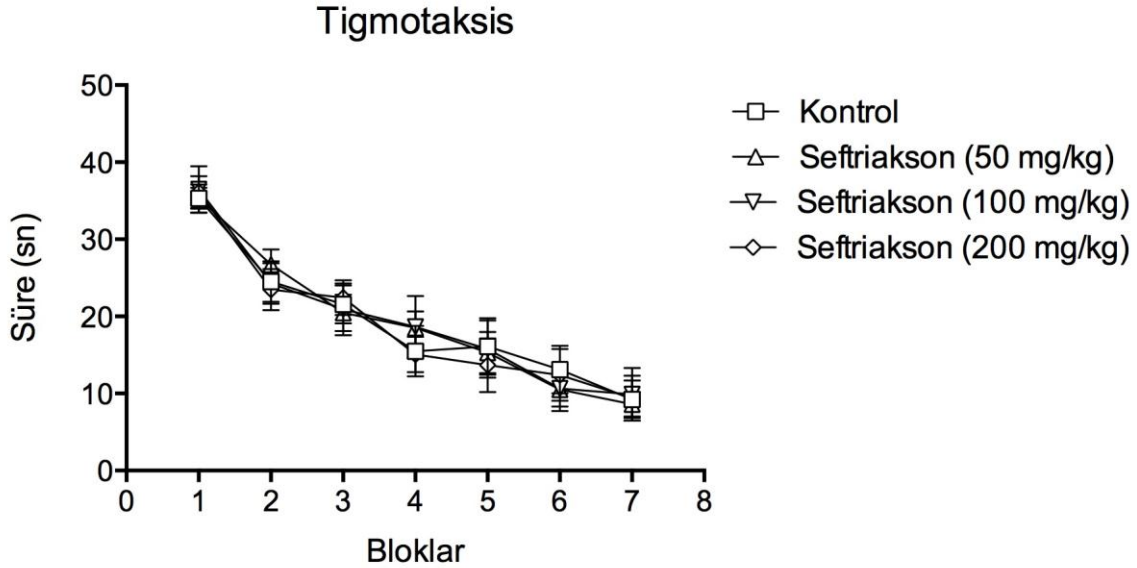
Şekil 9’da görüldüğü gibi, farelerin platforma ulaşana kadar yüzdükleri uzaklıklar, eğitimleri süresince giderek azalma gösterdi. Yani fareler platforma ulaşmak için giderek daha kısa bir mesafe yol almaya başladılar. Bu durum onların öğrendiklerini göstermektedir. Seftriakson bu uzaklığın artmasına veya azalmasına neden olmadı. Seftriakson verilen farelerdeki değerler kontrol grubundaki değerlerden istatistiksel yönden anlamlı farklı değildi.



Şekil 9. Günlük dört yüzdürme eğitiminin ortalaması (blok) olarak farelerin platforma erişene kadar yüzdükleri mesafe.

#### d) Farelerin Duvara 10 cm Uzaklıktaki Alanda Yüzdükleri Süre

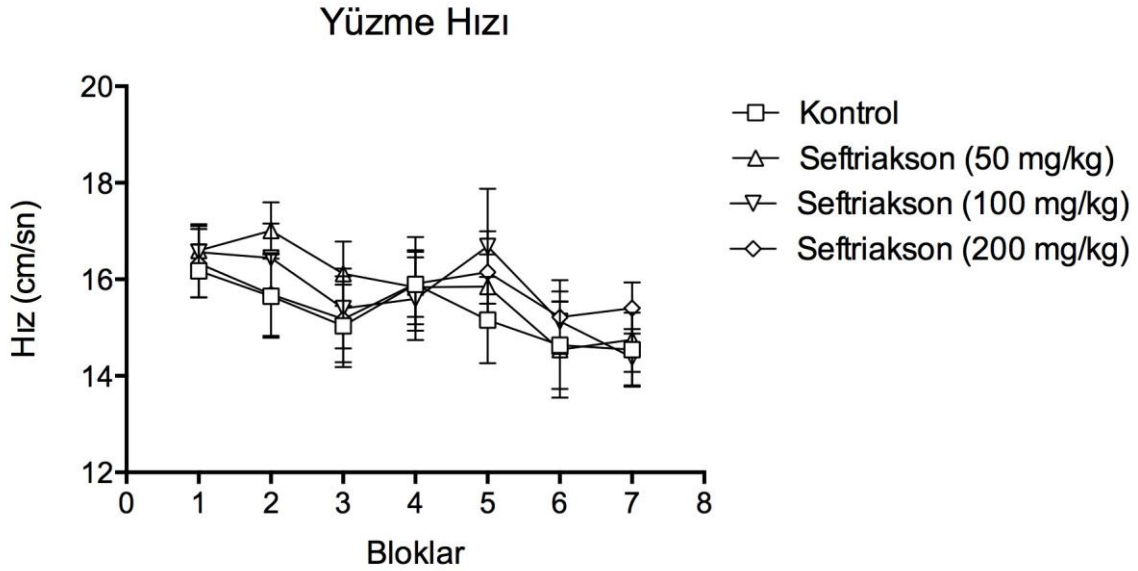
Fareler ilk eğitim yüzdürmelerinde labirentin duvarında kaçacak bir yer ararlar ve bu şekilde kaçamayacaklarını anladıktan sonra duvardan uzaklaşmaya başlarlar. Platformu bulduktan sonra, platform üzerinde kalmak yerine tekrar suya dalarlar. Bu davranışlar, hayvanın platformu havuzdan kurtulma seçeneği olarak görmediğini göstermektedir ve tigmotaksis (*thigmotaxis*) olarak adlandırılır. İlk eğitim yüzdürmelerinde tigmotaksis daha siktir ve giderek azalır. Sıçanlar daha az tigmotaksis gösterirken, farelerde daha sık görüldüğü bildirilmektedir (51). Hayvanların havuzun 10 cm'lik perimetresinde yüzme verileri ele alındığında (Şekil 10) tigmotaksis, kontrol grubundaki farelerde giderek azaldı. Bu durum, farelerin giderek içinde buldukları problemi kavramaya başladıklarını göstermektedir. Seftriakson verilen gruplarda elde edilen değerler kontrol grubunda elde edilen değerlerden istatistiksel yönden anlamlı derecede farklı değildi. Seftriaksonun 50, 100 ve 200 mg/kg dozlarında uygulandığı gruplarda elde edilen öğrenme eğrilerinin kontrol grubunda elde edilenle çok benzer olduğu Şekil 10'da görülmektedir.



Şekil 10. Günlük dört yüzdürme eğitiminin ortalaması (blok) olarak farelerin duvara 10 cm uzaklıktaki alanda yüzdükleri süre.

### e) Yüzme Hızı

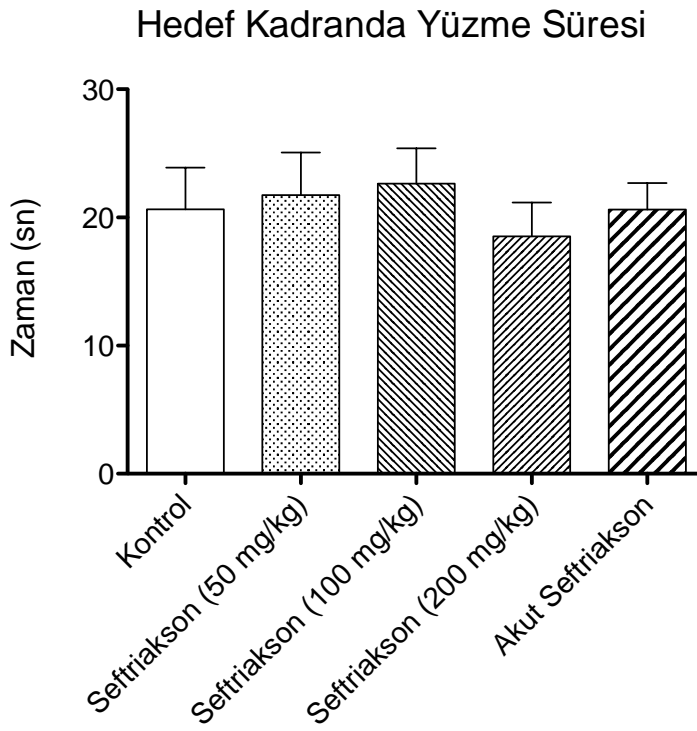
Testler sırasında hayvanların yüzme hızları gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık göstermedi. Farelerin testler sırasında kaydedilen yüzme hızları belirgin bir etki farkını düşündürecek bir seyir göstermedi (Şekil 11). Bazı zaman noktalarında gruplar arasında farklılıklar gözlenmekle birlikte, bunlar belirli istatistiksel yönden anlamlı değildi. Yüzme hızlarının gruplar arasında anlamlı bir fark göstermemesi, öğrenmenin değerlendirilmesi için elde edilen sonuçların yüzme hızı farkından kaynaklanmadığının gösterilmesi açısından önemlidir.



**Şekil 11. Günlük dört yüzdürme eğitiminin ortalaması (blok) olarak farelerin yüzme hızları.**

#### f) Hedef Kadranda Geçirilen Süre

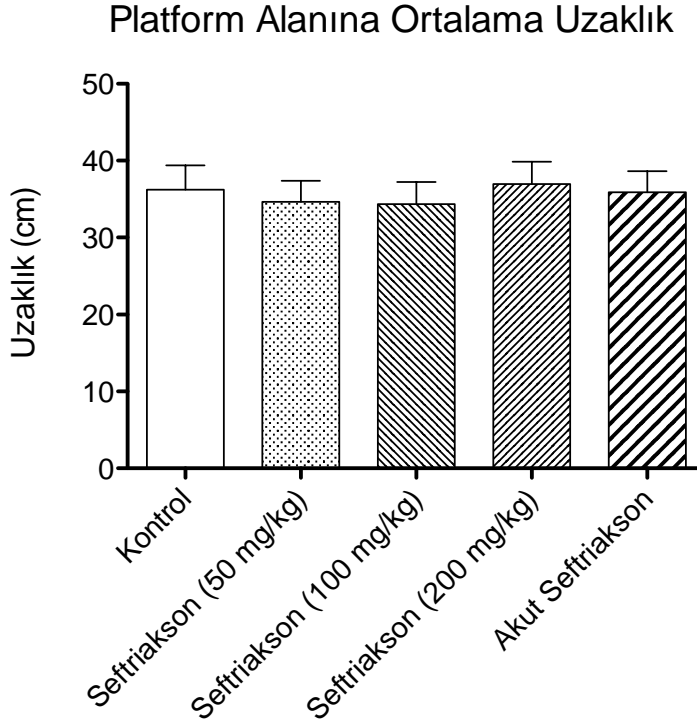
Probe testinde farelerin, eğitim yüzdürmeleri sırasında platformun bulunduğu kadranda (hedef kadranda) geçirdikleri süre kaydedildi. Farelerin hedef kadranda geçirdikleri süreye yönünden gruplar arasında istatistiksel yönden anlamlı bir fark saptanmadı (Şekil 12). Bu veriler, kronik ve akut seftriaksonun farelerin hedef kadranda geçirdikleri süreyi etkilemediğini göstermektedir.



Şekil 12. Probe testinde (8. gün) hedef kadranda geçirilen süre.

### g) Platformun Olması Gereken Bölgeye Ortalama Uzaklık

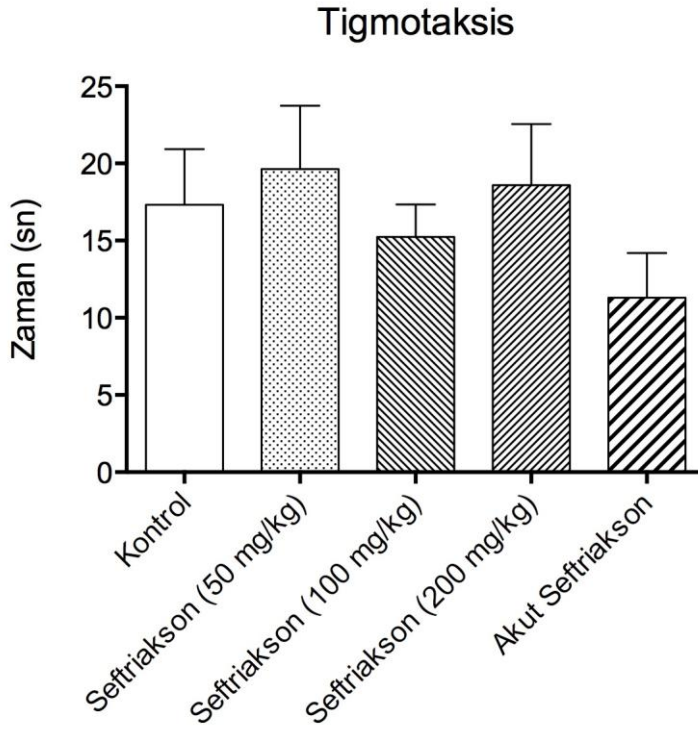
Probe testinde farelerin platformun olması gereken bölgeye ortalama uzaklıkları incelendiğinde gruptaki verilerin birbirlerine çok yakın olduğu gözlemlendi. Bu parametre yönünden gruplar arasında istatistiksel yönden anlamlı farklılık saptanmadı (Şekil 13).



Şekil 13. Probe testinde (8. gün) platformun olması gereken bölgeye ortalama uzaklık.

#### h) Farelerin Duvara 10 cm Uzaklıkta Yüzme Süreleri

Probe testinde farelerin duvara 10 cm uzaklıkta yüzme süreleri gruplar arasında istatistiksel yönden anlamlı derecede farklı değildi (Şekil 14). Sefriakson 50 mg/kg ve sefriakson 200 mg/kg uygulanan fareler kontrol grubundaki farelere oranla daha çok *tigmotaksis* gösterirken, kronik sefriakson 100 mg/kg ve akut sefriakson uygulanan fareler kontrol grubuna göre daha az süre *tigmotaksis* gösterdiler. Ancak bu farklılıkların hiçbiri istatistiksel anlamlılığa sahip değildi. Sonuç olarak, akut veya kronik sefriakson uygulaması farelerde *tigmotaksisi* değıştirmedii.

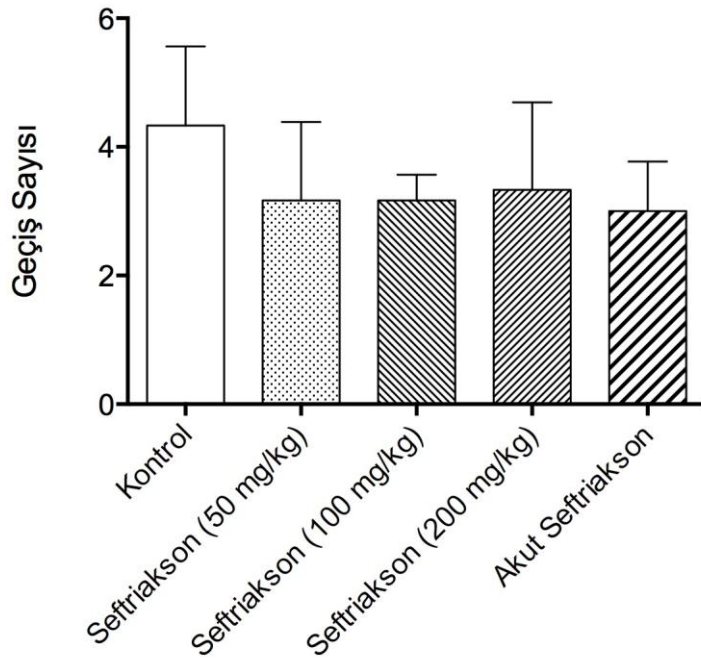


Şekil 14. Probe testinde (8. gün) farelerin duvara 10 cm uzaklıkta yüzme süreleri.

### i) Platformun Olması Gereken Bölgeden Geçiş Sayısı

Retansiyon testinde farelerin platformun olması gereken bölgeden geçiş sayıları gruplar arasında istatistiksel yönden anlamlı değildi (Şekil 15). Akut ve kronik Seftriakson uygulanan farelerde bu sayının istatistiksel yönden anlamlı olmayan bir azalma gösterdiği saptandı.

### Platformun Olması Gereken Bölgeden Geçiş Sayısı

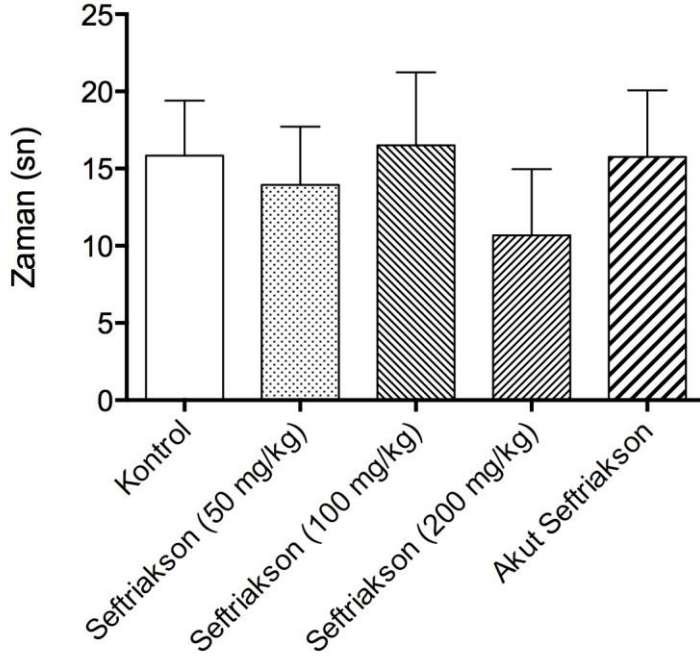


Şekil 15. Probe testinde (8. gün) platformun olması gereken bölgeden geçiş sayısı.

### j) Platformun Olması Gerektiği Yere Erişene Kadar Geçen Süre

Probe testinde platformun olması gerektiği yere erişene kadar geçen süre için gruplar arasında istatistiksel yönden anlamlı bir farklılık yoktu (Şekil 16). Seftriakson 50 mg/kg uygulanan farelerde platform alanına ulaşma süresinde istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir azalma gözlemlendi, seftriakson 100 mg/kg uygulanan farelerde süre bakımından istatistiksel yönden anlamlı olmayan bir artma gözlemlenirken, seftriakson 200 mg/kg uygulanan farelerde süre bakımından istatistiksel yönden anlamlı olmayan bir azalma gözlemlendi. Akut seftriakson uygulamasının bu parametreyi değiştirmediği saptandı.

### Platformun Olması Gerektiği Yere Ulaşma Süresi

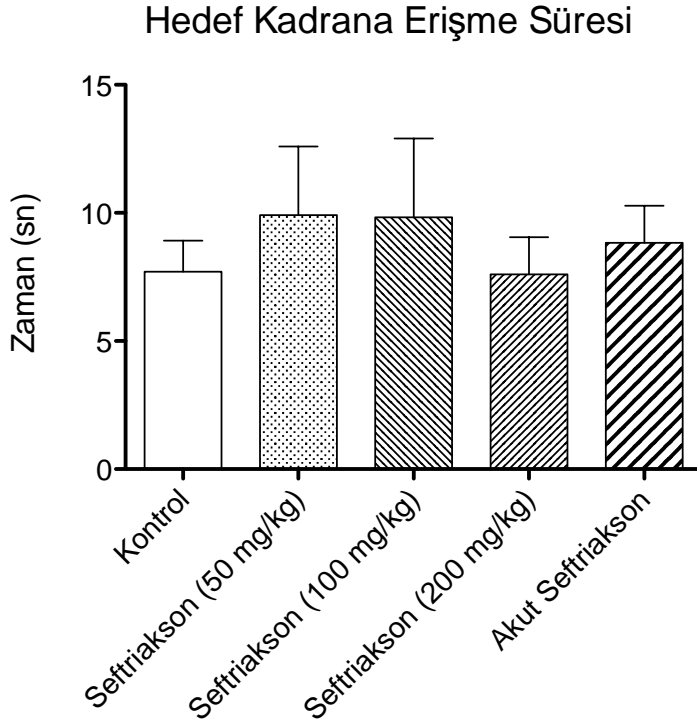


Şekil 16. Probe testinde (8. gün) platform bölgesine erişene kadar geçen süre.



### k) Hedef Kadrana Erişene Kadar Geçen Süre

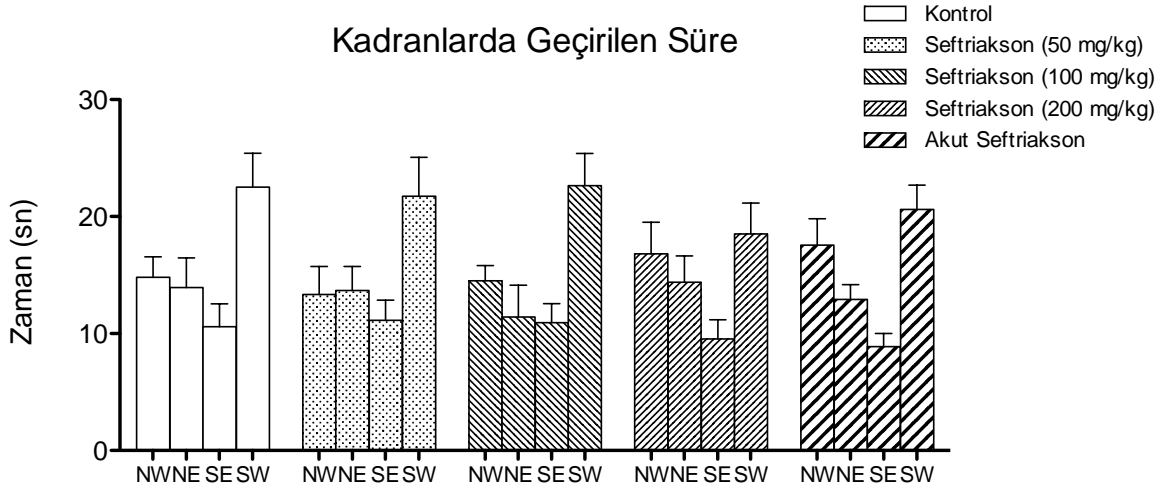
Probe testinde hedef kadrana erişene kadar geçen süre gruplar arasında istatistiksel yönden anlamlı derecede farklılık göstermedi (Şekil 17). Seftriakson 50 ve 100 mg/kg uygulanan farelerde sürenin uzadığı görülmekle birlikte, bu artış istatistiksel yönden anlamlı değildi..



Şekil 17. Probe testinde (8. gün) hedef kadrana erişene kadar geçen süre.

### D) Kadranlarda Geçirilen Süre

Probe testinde kadranlarda geçirilen süre gruplar arasında istatistiksel yönden anlamlı bir şekilde farklılık göstermedi (Şekil 18). Platformun olduğu kadran güneybatı (SW) bölgesi olduğu için, bütün gruplarda hedef kadranda geçirilen süre daha fazla idi. Kontrol ile karşılaştırıldığında seftriakson 200 mg/kg uygulanan farelerde süre bakımından istatistiksel yönden anlamlı olmayan bir azalma gözlemlendi, buna karşılık seftriakson 50 mg/kg ve seftriakson 100 mg/kg uygulanan farelerde, seftriakson 200 mg/kg uygulanan farelere göre süre bakımından istatistiksel yönden anlamlı olmayan bir artış gözlemlendi, kontrol grubuyla arasında bir farklılık gözlemlenmedi.

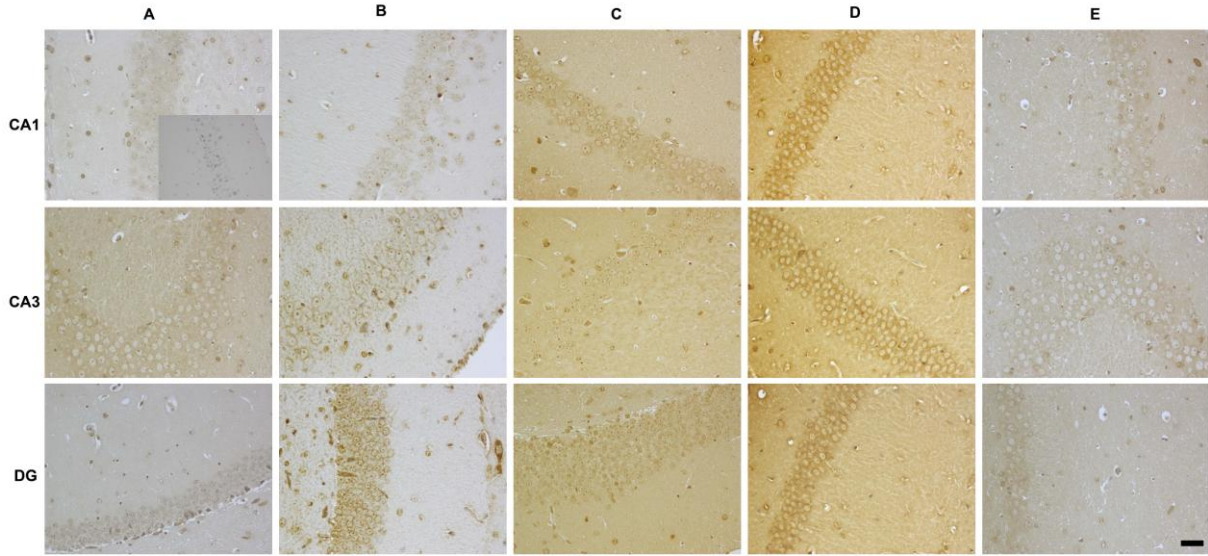


Şekil 18. Probe testinde (8. gün) kadranlarda geçirilen süre.

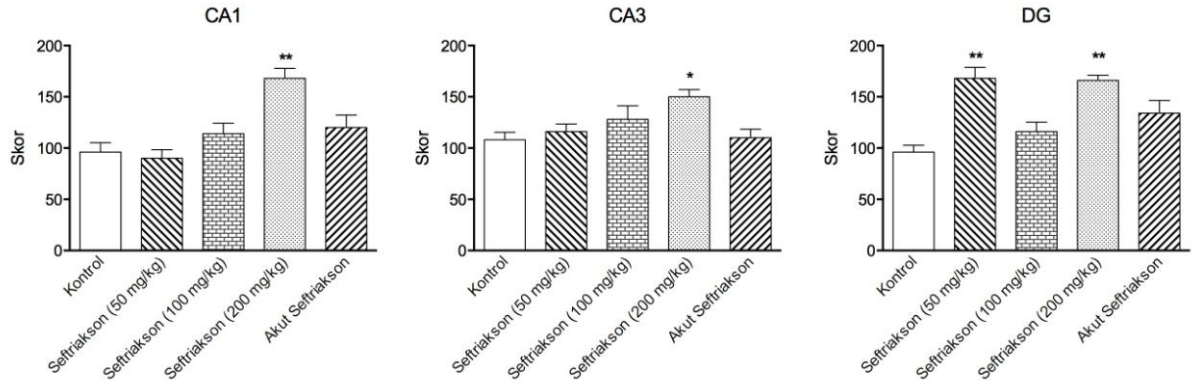
### m) İmmunohistokimya sonuçları

Fare hipokampusünün immunohistokimyasal analizi, kronik olarak 200 mg/kg seftriakson uygulanan gruplarda immunoreaktivitenin en fazla olduğunu gösterdi (Şekil 19, 20). Hipokampusün CA1 ve CA3 bölgelerinde seftriakson sadece 200 mg/kg dozunda etkinlik gösterdi; dentat girusta (DG) ise 200 mg/kg dozun yanı sıra seftriaksonun 50 mg/kg dozunda da istatistiksel olarak anlamlı bir etkinlik gözlemlendi (Şekil 19, 20).

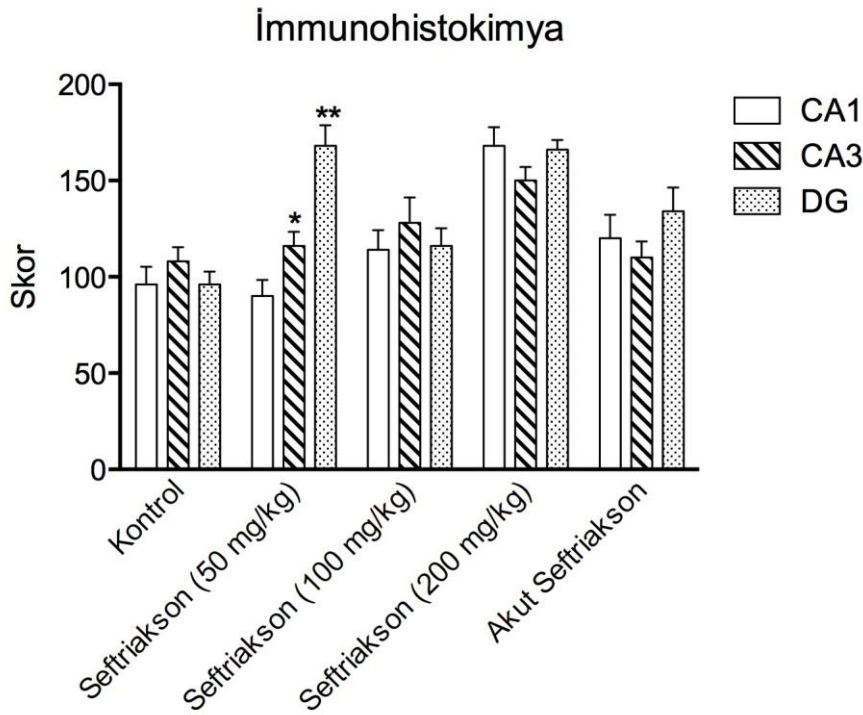
İmmunohistokimyasal analiz hipokampustaki bölgelere göre değerlendirildiğinde ise; seftriakson 50 mg/kg dozunda uygulandığında CA3'deki etkinliği CA1'e göre anlamlı derecede fazlaydı, DG'deki etkinlik ise diğer iki bölgeden de belirgin olarak fazla idi (Şekil 21). 100 mg/kg ve 200 mg/kg seftriakson dozlarında ise CA1, CA3 ve DG bölgeleri arasında herhangi bir farklılık görülmedi (Şekil 21). Akut olarak 200 mg/kg seftriakson uygulandığında da immunoreaktivitede anlamlı bir değişiklik gözlenmedi (Şekil 19-21).



**Şekil 19. Fare hipokampusünün farklı bölgelerinde (CA1, CA3, dentat girus-DG) kronik ve akut seftriakson uygulaması sonucu GLT-1 ekspresyonu. (A) kontrol grubu, (B) kronik seftriakson-50 mg/kg, (C) kronik seftriakson-100 mg/kg, (D) kronik seftriakson-200 mg/kg, (E) akut seftriakson-200 mg/kg; bar: 50 µm.**



**Şekil 20. Fare hipokampusünün farklı bölgelerinde (CA1, CA3, dentat girus-DG) kronik ve akut seftriakson uygulamasının GLT-1 ekspresyonu üzerine immuno-histokimya analizi (\* p<0.005, \*\* p<0.001).**



**Şekil 21. Seftriakson dozlarına göre fare hipokampusünün farklı bölgelerindeki (CA1, CA3, dentat girus-DG) GLT-1 ekspresyonunun kendi içinde karşılaştırılması (\* p<0.001, \*\* p<0.0001).**

## TARTIŞMA

Son zamanlarda yapılan çalışmalar, beta laktam antibiyotik grubundan olan seftriaksonun glutamat taşıyıcı-1 (GLT-1) ekspresyonunu uyardığını göstermektedir. Yeni elde edilen bu bulgular, beta laktam antibiyotiklerin bu mekanizmayla nöroprotektif etkisi olduğunu ortaya koymaktadır. Biz de bu çalışmada; glutamatın uzaysal öğrenme ve bellekte rol oynayan önemli bir mediyatör olması nedeniyle, seftriaksonun öğrenme ve bellek üzerine etkilerini incelemeyi amaçladık. Çalışmamızda, seftriakson, 200 mg/kg gibi yüksek dozlarında daha belirgin olmak üzere, hipokampüsün CA1, CA3 ve DG bölgelerinde GLT-1 ekspresyonunu belirgin derecede artırdı. Buna karşın, farelerde Morris Su labirentinde gerek öğrenme gerekse retansiyon fazlarında araştırılan herhangi bir parametre, yani uzaysal bellek fonksiyonları, üzerine etkinlik göstermedi.

Beta laktam antibiyotikler glutamat uptake'ini artırır (17). Santral sinir sisteminde glutamat uptake'in %90'ından sorumlu olan GLT-1, glutamatın sinaptik iletiminin sonlandırılmasında büyük rol oynar (2,17). GLT-1 fonksiyonlarındaki bozukluklar; amyotrofik lateral sklerozis (ALS), nörotoksisite, beyin tümörleri, felç, Parkinson hastalığı, opioid bağımlılığı ve nöbet gibi birçok ciddi hastalıklara yol açmaktadır (2,17). Ayrıca, deney planımıza uygun bir şekilde, Mookerjee ve ark. (52) glutamat taşıyıcı fonksiyonundaki bozuklukların Alzheimer hastalığına eşlik eden patojenik süreçlerde rolü olabileceğini ve Alzheimer hastalığının deneysel hayvan modelinde kognitif bozuklukların başlangıcını hızlandırabildiğini göstermişlerdir. Dolayısıyla, GLT-1 taşıyıcılarının Morris Su labirentinde öğrenme ve bellek üzerinde de önemli etkiye sahip olması beklenebilir.

Son senelerde beta laktam antibiyotiklerin glutamat uptake'ini artırdığı gösterilmiş olup, bu antibiyotikler arasında özellikle seftriakson üzerinde çalışılmıştır. Seftriakson kan-beyin bariyerini geçip santral sinir sistemine etki ederek GLT-1 ekspresyonunu ve fonksiyonlarını aktive eder. Seftriaksonun GLT-1'i aktive ederek belirtilen etkiyi ortaya

çıkarttığı ve nöroprotektif olduğu birçok araştırmada gösterilmiştir. ALS'li farelerde, seftriakson kullanımı nöron kaybını geciktirerek kasları güçlendirir ve farenin hayatta kalma süresini uzatmaktadır (2). Opioidlerin hipotermik ve analjezik etkilerine tolerans gelişimini önlediği yakın zamanda gösterilmiştir (4). Tolerans gelişmesine mekanizma olarak önemli benzerlikleri bulunan nöropatik ağrı belirtilerine karşı da seftriaksonun etkili olduğu son dönemde sıçanlarda siyatik sinir zedelenmesi modelinde saptanmıştır (5). Bir diğer çalışmada ise, streptozosin ile oluşan diyabetik nöropatide seftriaksonun anti-allodinik ve anti-hiperaljezik etkileri gösterilmiştir (8). Bu araştırmalara ek olarak, GLT-1 aktivasyonunun sadece opioidlerin değil, aynı zamanda son zamanlarda üzerinde yoğun araştırmalar yapılan kannabinoidlerin de bazı etkilerine aracılık ettiği düşünülmektedir (18,36,53). Bu çalışmalar, ağrı deneylerinde seftriaksonun spesifik GLT-1 aktivatörü olarak kullanılmasına ilişkin yeni kapılar açmaktadır. Bütün bu araştırmalardan yola çıkarak, biz de, seftriaksonun nöroprotektif etkisinden ve önemli bir GLT-1 aktivatörü olmasından dolayı uzaysal öğrenme ve belleğe etki edip etmediğini, ediyorsa hangi şekilde etki edebileceğini araştırdık.

Öğrenme ve bellek parametreleri olarak ele alınan verilere göre; bu konuyla ilgili çeşitli varsayımlar çıkarılabilir. Ölçülen parametrelerden biri olan hayvanların yüzme hızları, testin gerek öğrenme gerekse retansiyon fazlarında farklılık göstermedi. Benzer şekilde, çalışmada incelenen parametrelerden bir diğeri olan tigmotaksis açısından da her iki fazda da değişiklik görülmedi. Bu parametreye göre; deney esnasında hayvandan beklenen davranış, havuzun içinde gizlenmiş platformu bulması ve hangi yönden bırakılırsa bırakılsın havuzun iç kısmına doğru yönelmesidir. Ancak, bu durumu kavrayamayan fare havuz içinde amaçsızca dolaşmaktadır. Bu parametre bize özellikle hayvanın içinde bulunduğu ve çözmesi gerekli problemin ne kadar farkında olduğunu gösterir. Tigmotaksisin artması hayvanın içinde bulunduğu problemin farkına varmadığını göstermektedir. Elde ettiğimiz verilere göre seftriakson tigmotaksisi anlamlı derecede değiştirmedir. Bu durum seftriaksonun sıçanların araştırma oryantasyonunu etkilemediğini göstermektedir. Bechtholt-Gompf ve ark. (54), bir GLT-1 inhibitörü olan dihidrokainik asit uygulanan sıçanların zamanlarının çoğunu havuzun dış kısmında geçirdiklerini, buna karşılık, kontrol grubu deneklerin iç kısımları araştırmayı tercih ettiklerini belirtmişlerdir. Bu bulgu, sinaptik aralıkta aşırı glutamat birikiminin hayvanın araştırma stratejisini bozduğunun göstergesi olabilir.

Çalışmada fareler havuzun içindeki saklı platformun yerini öğrenmeleri amacıyla 7 gün süreyle günde dört kez yüzdürüldüler (öğrenme testi), 8. günde platform havuzdan çıkarıldı ve fareler bir kez 60 saniye süreyle yüzdürüldüler (probe testi). İlk yedi gün yapılan eğitimlerde platforma erişim süresi, platforma ortalama uzaklık ve platforma ulaşana dek

yüzülen uzaklık parametreleri değerlendirildi. Kontrol grubundaki fareler, incelenen bu parametreler yönünden, her gün giderek daha iyi performans gösterdiler ve platformun yerini öğrendiler. Kronik seftriakson uygulanan farelerde de benzer performanslar elde edildi; yani bu hayvanların öğrenme grafleri kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı bir farklılık göstermedi. Elde ettiğimiz bulgular, seftriaksonun öğrenmeyi olumlu veya olumsuz yönde etkilemediğini göstermektedir.

Platformsuz yüzdürmede bakılan parametrelerden ikisi hedef kadrana erişme süresi ve hedef kadranda geçirilen süre idi. İçinde bulunduğu problemin farkına varan farenin hedef kadrana ulaşma süresi kısa, hedef kadranda geçirdiği süre ise uzun olmalıdır. Deneylerimizde bu parametrelerin kontrol grubu farelere oranla anlamlı bir değişiklik göstermediğini belirledik. Ölçümü yapılan bir başka önemli parametre de; platformun olması gereken yere ortalama uzaklığı. Öğrenme-bellek süreci oluşumunu tamamlamış olan hayvanın platformun yerini hatırlayarak platform çevresinde yüzmesi beklenir. Elde ettiğimiz sonuçlar, akut veya kronik seftriaksonun bu parametreyi istatistiksel anlamlı derecede etkilemediğini ortaya koymuştur.

Probe testinde elde edilen kayıtlarda, hayvanın hedef kadranda ne kadar süre yüzdüğü de incelendi. Hayvanın hedef kadranda daha uzun süre yüzmesi, onun bu bölgede birşeyi aradığı şeklinde yorumlanabilir, bir başka deyişle, hayvan bize platformun buralarda bir yerde olduğunu ifade etmektedir. Belleği bozan ilaçların, hedef kadranda geçirilen süreyi azaltması beklenir. Bulgularımız akut ya da kronik seftriaksonun hedef kadranda geçirilen süreyi artırıcı ya da azaltıcı yönde bir etkisi olmadığını ortaya koymuştur. Yani, seftriakson, hayvanların platformun yerini anımsamalarını olumlu ya da olumsuz yönde etkilememektedir.

Hayvanın özellikle platformun yerini hatırlayıp aradığı, o bölgede daha fazla yüzdüğü, platform alanından geçiş sayısı ile ilgili parametre verilerine bakarak yorumlanabilir. Platformun olduğu yerde geçiş sayısı ne kadar artarsa, hayvanın o kadar platformu arayıp bulmaya çalıştığı yorumu yapılabilir. Özellikle platform yokken (probe testi) hayvanın hedef bölgede dolaşması en azından öğrenmenin gerçekleştiğini gösterebilir. Bizim verilerimize göre, akut ve kronik seftriakson bu parametreyi olumlu ya da olumsuz yönde etkilememektedir.

Probe testinde incelediğimiz çeşitli parametrelerde elde ettiğimiz sonuçlar birbirleriyle tutarlıdır ve göstermektedir ki, fareler eğitim yüzdürmelerinde platformun yerini öğrenmektedirler ve probe testinde platformun yerini hatırlamaktadırlar. Akut veya kronik seftriakson uygulaması farelerin bu parametrelerde gösterdikleri performansı etkilememektedir. Bir başka deyişle, akut ve kronik seftriaksonun bellek üzerine artırıcı veya bozucu bir etkisi bulunmamaktadır. Glutamatın öğrenme ve bellekte rol oynadığı düşünülür

ve seftriaksonun glutamat taşıyıcılarının aktivitesini artırdığı göz önünde bulundurulursa, seftriakson verilmesi ile öğrenme ve bellek fonksiyonunda olumlu veya olumsuz bir değişikliğin ortaya çıkması beklenebilir. Gerçekte, bu düşünce, bu çalışmanın planlanmasında yola çıkılan nokta idi. Ancak, elde edilen verilerin bu beklentiye karşılamaması, seftriaksonun aktivitesini artırdığı glutamat uptake'ının normal farelerdeki öğrenme ve bellek süreçlerinde önemli bir rol oynamadığı şeklinde yorumlanabilir. Bu modelde, farelerin zaten öğrenebilecekleri kadar öğrendikleri, belleklerini daha fazla geliştiremeyecekleri ve bu nedenle, herhangi bir ilaç ile belleğin daha fazla artırılmayacağı söylenebilir. Eğer bu geçerliyse, seftriaksonun belleği daha fazla artıramamasına mantıklı bir açıklama getirilmiş olabilir. Bu görüşü test etmenin bir yolu, bellek fonksiyonları bozulmuş hayvanlarda seftriaksonun bellek üzerindeki aktivitesini incelemektir. Bunlar, daha sonra ki yapılacak çalışmaların konusu olabilir.

Glutamat taşıyıcılarının uptake aktivitesi genellikle immunohistokimyasal ve western blotting gibi tekniklerle belirlenebilmektedir. Araştırmamızda yararlanmış olduğumuz immunohistokimya tekniği, antikor kullanarak dokulardaki proteinleri analiz etmemizi sağlamaktadır. Bulgular kısmında da belirttiğimiz gibi, fare hipokampusünün immunohistokimyasal analizinde, kronik olarak 200 mg/kg uygulanan grupta immunoreaktivite en fazladır. Hipokampusün CA1 ve CA3 bölgelerinde, seftriakson sadece araştırmamızda kullanılan en yüksek doz olan 200 mg/kg dozunda etkinlik göstermiştir. Buna karşılık, DG'da ise 200 mg/kg doza ek olarak, aynı zamanda seftriaksonun 50 mg/kg dozunda da belirgin bir etkinlik gözlenmiştir. Bu durum, genel bir bakış açısıyla, seftriaksonun hipokampusün tüm bölgelerinde GLT-1 ekspresyonunu artırdığını ve bunu daha çok yüksek dozlarında ortaya çıkarttığını göstermektedir. Konuyla ilişkili tüm araştırmaların da seftriaksonun GLT-1 ekspresyonunu artırdığını göstermesi nedeniyle, immunohistokimya bulgularımız genel anlamda literatür ile uyumludur (2,5,14,55).

Hipokampusün farklı bölgelerinde akut veya kronik seftriakson uygulaması yapılmamış gruplardaki, yani her bölgeye ait kontrol grubundaki GLT-1 ekspresyonu, o bölgedeki bazal GLT-1 ekspresyonunun göstergesidir. İmmunohistokimya bulgularımız kontrol gruplarında, hipokampusün CA1, CA3 ve DG bölgelerinde bazal GLT-1 ekspresyonunun yaklaşık olarak aynı olduğunu göstermektedir. Yakın zamanda yapılmış benzeri bir araştırmada ise, hipokampusün CA3 ve DG bölgelerinde CA1'e göre bazal GLT-1 ekspresyonunun çok daha fazla olduğunu göstermektedir (56). Bu sonuçlar bizim bulgularımızla karşılaştırıldığında sadece CA1 bölgesindeki GLT-1 ekspresyonu açısından farklılık görülmektedir. Bu farklılığın çok farklı nedenlerden kaynaklanabilmesine karşın, o çalışmada sıçan bizim çalışmamızda ise fare kullanılması ilk akla gelenler arasındadır.



İmmunohistokimyasal analiz hipokampustaki bölgelere göre değerlendirildiğinde ise, seftriakson 50 mg/kg dozunda uygulandığında hipokampüsün CA3 bölgesindeki etkinliği CA1'e göre belirgin olarak fazla iken, DG'deki etkinlik ise diğer iki bölgeden de belirgin derecede fazla idi. Bu bulgular, CA1 bölgesinde GLT-1 ekspresyonunun az olduğunu gösteren araştırmacıların sonuçları ile uyumludur (56). 100 mg/kg ve 200 mg/kg seftriakson dozlarında ise hipokampüsün CA1, CA3 ve DG bölgeleri arasında herhangi bir farklılık görülmedi. Seftriaksonun yüksek dozlardaki etkinliğinin hipokampus bölgeleri arasında farklılık göstermemesi ise, bazal GLT-1 ekspresyonunun yaklaşık aynı olması açısından kontrol gruplarından elde edilen bulgular ile uyum içindedir.

Seftriakson akut olarak 200 mg/kg uygulandığında immunoreaktivitede anlamlı bir değişiklik gözlenmedi. Seftriaksonun GLT-1 ekspresyonu üzerine etkisinin ancak belli bir süre, örneğin 7-10 gün, kullanıldıktan sonra ortaya çıktığı bilindiğinden ve çok sayıda deneysel araştırma ile bu durum gösterilmiş olduğundan, deneylerimizde akut seftriakson uygulandığında GLT-1 ekspresyonunun farklılık göstermemesi beklenen bir sonuçtur ve konuyla ilişkili yapılmış çok sayıda araştırma ile benzerlik göstermektedir (8,31).

Omrani ve ark. (55) GLT-1 gen transkripsiyonunu artırmanın GLT-1a ekspresyon ve dağılımını değiştirdiğini, seftriakson uygulanan hayvanlarda uzun-sürelili depresyonun (LTD) ortadan kalktığını, ve seftriaksonun sıçanlarda Schaffer-CA1 sinapslarda değil, fakat CA3 mossy liflerinde uzun-sürelili potansiyalizasyonu belirgin derecede inhibe ettiğini gösterdiler. Ancak, davranışsal değişikliklerle birlikte görülen bu moleküler ve elektrofizyolojik bulguların önemi henüz bilinmemektedir. Bu bulgulara ek olarak, Katagiri ve ark. (57), GLT-1 knock-out farelerde hipokampüsün CA1 bölgesinde LTP indüksiyonunun bozulduğunu gösterdiler. Mutant farelerde LTP'nin neredeyse tamamen ortadan kalktığını, fakat düşük doz kompetitif NMDA reseptör antagonisti D-APV'nin LTP'deki bozulmayı düzelttiğini belirlediler (57). Bu bulgulara dayanarak da, GLT-1 eksikliğinin sinaptik aralıkta glutamat konsantrasyonlarını artırarak NMDA reseptörlerinin aşırı aktivasyonuna yol açtığını sonucuna vardılar. Yakın zamanlarda yapılan bir diğer çalışmada ise, C57BL/6J farelerde multipl T-labirentinde uzaysal bellek mekanizmalarında GLT-1 tarafından sinyal sonlanmasının rol oynadığı gösterildi (58). Araştırmacılar, olasılıkla teknik nedenlere veya belirlenemeyecek derecede düşük düzeyler nedeniyle, bu çalışmalarında GLT-1 monomer düzeylerini ölçmediler. Bununla birlikte, araştırmalarını diğer komplekslerin değil, yüksek-moleküler ağırlıklı komplekslerin düzeylerini ölçmek ve 720 kDa'daki GLT-1 kompleksinin bellek ile ilintili olduğunu göstermek amacıyla düzenlediler (57).

Yapılan tüm bu çalışmalardan yola çıkarak, seftriaksonun, özellikle yüksek dozlarında hipokampüsün CA1, CA3 ve DG bölgelerinde GLT-1 ekspresyonunu artırdığı, buna karşın etkili olması beklenmesine karşın, Morris su labirentinde öğrenme fazı ve probe testinde incelenen parametreler üzerinde anlamlı bir etkiye sahip olmadığı sonucuna varılabilir. Yukarıda da belirtildiği şekilde; bu sonuçlar seftriakson ile GLT-1 ekspresyonunun aktive edilmesinin, normal farelerde uzaysal öğrenme ve bellek fonksiyonları üzerinde bir etkiye sahip olmadığını ortaya koymaktadır. Bununla birlikte, belleği bozulmuş farelerde elde edilen sonuçların farklı olması beklenebilir.

## SONUÇLAR

Beta laktam antibiyotik seftriaksonun glutamat transporter-1 ( GLT-1) ekspresyonunu uyardığı bilinmektedir. Yeni bulgulara göre, beta laktam antibiyotikler GLT-1 aktivasyonu mekanizması ile nöroprotektif etkilerini ortaya koymaktadır. Glutamat, uzaysal öğrenme ve bellekte rol oynayan önemli bir mediyatördür. Bu nedenle çalışmamızda seftriaksonun uzaysal öğrenme ve bellek üzerine etkisi incelenmiştir.

Seftriaksonun öğrenme ve bellek üzerine etkilerini araştırdığımız bu çalışmamızda, çalışma gruplarına 7 gün süreyle Morris su labirentinde gizli platformu bulma konusunda eğitim verildi, 8. gün platform havuzdan çıkarıldı. Veriler bilgisayar ortamında kamera aracılığı ile kayıt altına alındı. Buradaki performanslarına bakılarak farelerin öğrenme ve bellek fonksiyonları değerlendirildi.

İmmunohistokimya sonuçlarımız, seftriaksonun CA1, CA3 ve DG gibi hipokampus bölgelerinde GLT-1 ekspresyonunu, özellikle yüksek dozlarında, belirgin derecede artırdığını göstermektedir.

Elde edilen sonuçlara göre; seftriakson Morris su labirentinde öğrenme fazı ve probe testinde incelenen parametreler üzerinde anlamlı bir etkiye sahip değildir. Bu sonuçlar seftriakson ile GLT-1 ekspresyonunun aktive edilmesinin, normal farelerde uzaysal öğrenme ve bellek fonksiyonları üzerinde bir etkiye sahip olmadığını ortaya koymaktadır. Ancak belleği bozulmuş farelerde elde edilen sonuçlar farklı olabilir.

## ÖZET

Glutamat santral sinir sistemindeki en önemli eksitatör amino asit nörotransmitterdir. Son senelerde beta-laktam antibiyotiklerin GLT-1'i aktive ederek glutamat uptake'ini artırdıkları ve bunun sonucunda nöroprotektif etki gösterdikleri belirlenmiştir. Araştırmamızda GLT-1 aktivasyonu yapan bir beta-laktam antibiyotik olan seftriaksonun uzaysal bellek üzerine etkisini incelemek amaçlanmıştır. Her birinde onikişer fare bulunan gruplar, 7 gün süreyle günde 4 deneme ile Morris Su Labirentinde saklı platformu bulma konusunda eğitilmiş (acquisition), 8. gün platform havuzdan çıkarılarak hayvanlar 1 kez yüzdürülmüş (probe) ve bu testlerdeki performanslarına dayanarak öğrenme ve bellek fonksiyonları değerlendirilmiştir. Seftriakson 9 gün boyunca farklı dozlarda (50, 100, 200 mg/kg, i.p.) verilmiş, ayrıca bir gruba tek doz seftriakson (200 mg/kg, i.p.) uygulanarak ilacın akut etkisi de gözlenmiştir. İmmunohistokimya sonuçları, seftriaksonun, özellikle 200 mg/kg dozunda hipokampusün CA1, CA3 ve DG bölgelerinde GLT-ekspresyonunu artırdığını göstermektedir. Platforma erişme süresi, platforma erişene kadar katedilen mesafe, farelerin yüzme hızı gibi parametreler değerlendirildiğinde kronik seftriakson uygulamasının hayvanların öğrenme eğrileri üzerine bir etkisinin olmadığı, probe testte platformun bulunduğu kadrana (hedef kadrana) ulaşma süresi, hedef kadranda yüzme süresi gibi parametreler değerlendirildiğinde, gerek kronik gerekse akut seftriakson uygulamasının herhangi bir dozunda belleği etkilemediği gözlemlendi. Beta-laktam antibiyotikler tarafından oluşturulan GLT-1 transporter aktivasyonunun kronik ağrı, amyotrofik lateral skleroz, Parkinson hastalığı ve epilepsi gibi farklı santral sinir sistemi hastalıklarına karşı etkili olduğunun gösterilmesine karşın, araştırmamızın sonuçları seftriaksonun GLT-1 ekspresyonunu artırdığını, ancak uzaysal bellek fonksiyonları üzerine iyileştirici etkisinin olmadığını göstermektedir.

**Anahtar kelimeler: seftriakson, glutamat, GLT-1, uzaysal bellek**

# **ROLE OF GLT-1 TRANSPORTER ACTIVATION IN THE EFFECT OF CEFTRIAXONE ON SPATIAL MEMORY**

## **SUMMARY**

In the central nervous system, glutamate appears to be the principal excitatory amino acid neurotransmitter. Recent findings show that beta-lactam antibiotics, by stimulating GLT-1 expression, offer neuroprotection. The purpose of our study is to observe the effect of ceftriaxone, a beta-lactam antibiotic, on spatial memory in mice. Male mice were trained in Morris Water-Maze (n=12 for each group) task. Animals were given 4 trials per day for 7 consecutive days to locate a hidden platform (acquisition phase). On the eighth day, the platform is removed and the animals were swum for one session of 60 seconds (retention phase). Learning and memory functions of the animals were evaluated based on their performances in these tests. Ceftriaxone was given for 9 days at different doses (50, 100, and 200 mg/kg, i.p.); additionally, its acute effect was evaluated in one group (200 mg/kg, i.p.). Our immunohistochemistry findings indicate that ceftriaxone increase GLT-1 expression in CA1, CA3 and DG regions of hippocampus, especially with the dose of 200 mg/kg. Evaluation of the acquisition parameters, such as time to reach platform, distance moved, mean distance to platform indicate that chronic ceftriaxone has no effect on learning curves of the animals. When retention phase parameters (e.g. time to reach target quadrant, swim duration in target quadrant, mean distance to platform area) are evaluated, it was found that both chronic and acute ceftriaxone did not affect memory at any dose used. In contrast to the contribution of GLT-1 expression to various central nervous system diseases, such as chronic pain, amyotrophic lateral sclerosis, Parkinson's disease and seizures, our findings suggest that ceftriaxone increases GLT-1 expression, but has no effect on spatial memory function in mice.

**Key words: ceftriaxone, glutamate, GLT-1, spatial memory**

## KAYNAKLAR

1. Danbolt NC. Glutamate uptake. *Prog Neurobiol* 2001;65:1-105.
2. Rothstein JD, Patel S, Regan MR, Haenggeli C, Huang YH, Bergles DE, et.al. Beta-lactam antibiotics offer neuroprotection by increasing glutamate transporter expression. *Nature* 2005;433:73-7.
3. Seal RP, Amara SG. Excitatory amino acid transporters: a family in flux. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1999;39:431-56.
4. Yan H, Li CM, Li YL, Gong ZH. Effect of spinal glutamate transporter 1 on chronic constriction injury of sciatic nerve and morphine tolerance of rats. *Yao Xue Xue Bao* 2009;44:581-5.
5. Hu Y, Li W, Lu L, Cai J, Xian X, Zhang M, et al. An anti-nociceptive role for ceftriaxone in chronic neuropathic pain in rats. *Pain* 2010;148:284-301.
6. Eljaja L, Bjerrum OJ, Honore PH, Abrahamsen B. Effects of the excitatory amino acid transporter subtype 2 (EAAT2) inducer ceftriaxone on different pain modalities in rat. *Scand J Pain* 2011;2:132-6.
7. Rao VL, Bowen KK, Dempsey RJ. Transient focal cerebral ischemia down-regulates glutamate transporters GLT-1 and EAAT2 expression in rat brain. *Neurochem Res* 2001;26:497-502.
8. Gunduz O, Oltulu C, Buldum D, Guven R, Ulugol A. Anti-allodynic and anti-hyperalgesic effects of ceftriaxone in streptozocin- induced diabetic rats. *Neurosci Lett* 2011;491:23-5.
9. Tanaka K. Functions of glutamate transporters in the brain. *Neurosci Res* 2000;37:15-19.
10. Kayaalp SO, Uzbay İT. Santral sinir sistemini etkileyen ilaçlar. Kayaalp SO (Editör). *Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji*'de. 12. baskı. Ankara: Pelikan Yayıncılık; 2009. s.623-56.
11. Gold PE. Memory-enhancing drugs. Byrne JH (Ed.). *Concise Learning and Memory*. 3<sup>rd</sup> ed. Champaign: Academic Press; 2009. p.605-20.
12. Ungerer A, Mathis C, Melan C. Are glutamate receptors specifically implicated in some forms of memory processes? *Exp Brain Res* 1998;123:45-51.

13. Butchbach ME, Tian G, Guo H, Lin CG. Association of excitatory aminoacid transporters, especially EAAT2, with cholesterol-rich lipid raft microdomains. *J Biol Chem* 2004;279:34388-396.
14. Lin Y, Tian G, Roman K, Handy C, Travers JB, Lin CG, et al. Increased glial glutamate transporter EAAT2 expression reduces visceral nociceptive response in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2009;296:129-34.
15. Suchak SK, Baloyianni NV, Perkinton MS, Williams RJ, Meldrum BS, Rattray M. The 'glial' glutamate transporter, EAAT2 (GLT-1) accounts for high affinity glutamate uptake into adult rodent nerve endings. *J Neurochem* 2003;84:522-32.
16. Sheldon AL, Robinson MB. The role of glutamate transporters in neurodegenerative diseases and potential opportunities for intervention. *Neurochem Int* 2007;51:333-55.
17. Rawls SM, Robinson W, Patel S, Baron A. Beta-lactam antibiotic prevents tolerance to the hypothermic effect of a kappa opioid receptor agonist. *Neuropharmacology* 2008;55:865-70.
18. Loria F, Petrosino S, Hernangomez M, Mestre L, Spagnolo A, Correa F, et al. An endocannabinoid tone limits excitotoxicity *in vitro* and in a model of multiple sclerosis. *Neurobiol Dis* 2010;37:166-76.
19. Lee SG, Su ZZ, Emdad L, Gupta P, Sarkar D, Borjabad A, et al. Mechanism of ceftriaxone induction of excitatory aminoacid transporter-2 expression and glutamate uptake in primary human astrocytes. *J Biol Chem* 2008;283:13116-23.
20. Inostroza M, Cid E, Mas JB, Gal B, Aivar P, Uzcategui YG, et al. Hippocampal-dependent spatial memory in the water maze is preserved in an experimental model of temporal lobe epilepsy in rats. *PLOS ONE* 2011;6(7): e22372. doi:10.1371/journal.pone.0022372.
21. Sasaki S, Warita H, Abe K, Komori T, Iwata M. EAAT1 and EAAT2 immunoreactivity in transgenic mice with a G93A mutant SOD1 gene. *NeuroReport* 2001;12:1359-62.
22. Meyer T, Fromm A, Münch C, Schwalenstöcker B, Fray AE, Ince PG, et al. The RNA of the glutamate transporter EAAT2 is variably spliced in amyotrophic lateral sclerosis and normal individuals. *J Neurol Sci* 1999;170:45-50.
23. Vanoni C, Massari S, Losa M, Carrega P, Perego C, Conforti L, et al. Increased internalisation and degradation of GLT-1 glial glutamate transporter in a cell model for familial amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *J Cell Sci* 2004;117:5417-26.
24. Guo H, Lai L, Butchbach M, Stockinger MP, Shan X, Bishop GA, et al. Increased expression of the glial glutamate transporter EAAT2 modulates excitotoxicity and delays the onset but not the outcome of ALS in mice. *Hum Mol Genet* 2003;12(19):2519-32.
25. Lepore AC, O'Donnell J, Kim AS, Yang EJ, Tuteja A, Phillips AH, et al. Reduction in expression of the astrocyte glutamate transporter, GLT-1, worsens functional and histological outcomes following traumatic spinal cord injury. *Glia* 2011;59:1996-2005.
26. Foran E, Bogush A, Goffredo M, Roncaglia P, Gustincich S, Pasinelli P, et al. Motor neuron impairment mediated by a sumoylated fragment of the glial glutamate transporter EAAT2. *Glia* 2011;59:1-13.

27. Howes WB, Gibb SL, Williams EO, Pasinelli P, Brown RH, Trotti D. Caspase-3 cleaves and inactivates the glutamate transporter EAAT2. *J Biol Chem* 2006;281(20): 14076-84.
28. Coleman E, Judd R, Hoe L, Dennis J, Posner P. Effects of diabetes mellitus on astrocyte GFAP and glutamate transporters in CNS. *Glia* 2004;48:166-78.
29. Chen Y, Swanson RA. The glutamate transporters EAAT2 and EAAT3 mediate cysteine uptake in cortical neuron cultures. *J Neurochem* 2003;84:1332-9.
30. Gammelseater R, Coppola T, Marcaggi P, Mathisen JS, Chaudhry FA, Atwell D, et al. A role for glutamate transporters in the regulation of insulin secretion. *PLOS ONE* 2011;6(8): e22960. doi:10.1371/journal.pone.0022960.
31. Rawls SM, Zielinski M, Patel H, Sacavage S, Baron DA, Patel D. Beta- lactam antibiotic reduces morphine analgesic tolerance in rats through GLT-1 transporter activation. *Drug Alcohol Depen* 2010;107:261-3.
32. Wang M, Dong HJ, Gong ZH. Effects of beta-lactam antibiotics on development of tolerance and dependence to morphine. *Yao Xue Xue Bao* 2008;43:1094-8.
33. Rasmussen B, Unterwald EM, Rawls SM. Glutamate transporter subtype 1 (GLT-1) activator ceftriaxone attenuates amphetamine-induced hyperactivity and behavioral sensitization in rats. *Drug Alcohol Depen* 2011;118:484-8.
34. Sondheimer I, Knackstedt LA. Ceftriaxone prevents the induction of cocaine sensitization and produces enduring attenuation of cue-and cocaine-primed reinstatement of cocaine-seeking. *Behav Brain Res* 2011;225:252-8.
35. Mimura K, Tomimatsu T, Minato K, Jugder O, Taniguchi YK, Kanagawa T, et al. Ceftriaxone preconditioning confers neuroprotection in neonatal rats through glutamate transporter 1 upregulation. *Reprod Sci* 2011;18:1193-201.
36. Gunduz O, Oltulu C, Ulugol A. Role of GLT-1 transporter activation in prevention of cannabinoid tolerance by the beta-lactam antibiotic, ceftriaxone, in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 2011;99:100-3.
37. Kim K, Lee SG, Kegelman TP, Su ZZ, Das SK, Dash R, et al. Role of excitatory aminoacid transporter-2 (EAAT2) and glutamate in neurodegeneration: opportunities for developing novel therapeutics. *J Cell Physiol* 2011;226:2484-93.
38. Peker ÖG. Beyin korteksi, beynin zihinsel işlevleri, öğrenme ve bellek. (çeviri: H. Çavuşoğlu, B.Ç. Yeğen). *Tıbbi Fizyoloji'de*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2007. s.714-27.
39. Keleş E, Çepni S. Beyin ve Öğrenme. *Türk Fen Eğitimi Dergisi*, 2006;3:66-82.
40. Purves D. Memory. In: Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Hall WC, Lamantia AS, McNamara JO, Williams SM (Eds.). *Neuroscience*. 3<sup>rd</sup> ed. Sinauer Associates Inc; 2004. p.733-53.
41. Squire LR. Memory systems of the brain: a brief history and current perspective. *Neurobiol Learn Mem* 2004;82:171-7.
42. Uysal N, Dayı A, Özbal S, Çetin F, Aksu İ, Yalaz G ve ark. Sıçanlarda spasyal belleğin adölesan dönem süresince gelişimi. *J Neurol Sci Turk* 2010;27:407-13.



43. Morris RG, Frey U. Hippocampal synaptic plasticity: role in spatial learning or the automatic recording of attended experience? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1997;352:1489-503.
44. Yang J, An L, Yao Y, Yang Z, Zhang T. Melamine impairs spatial cognition and hippocampal synaptic plasticity by presynaptic inhibition of glutamatergic transmission in infant rats. *Toxicology* 2011;289:167-74.
45. Ünal S. Şizofrenide bilişsel işlev bozuklukları ve belirti oluşumu ile ilişkisi. *Anadolu Psikiyatri Dergisi* 2003;4:46-53.
46. Rezaki M. Şizofreni nörobiyolojisine kısa bir bakış. *Klinik Psikiyatri Dergisi* 1998;1:31-4.
47. Roediger HL, Zaromb FM. A typology of memory terms. In: Byrne JH (Ed.). *Concise learning and memory*. 3<sup>rd</sup> ed. St. Louis: Academic Press; 2009. p.1-13.
48. Burwell RD, Agster KL. Anatomy of the hippocampus and the declarative memory system. In: Byrne JH (Ed.). *Concise learning and memory*. 3<sup>rd</sup> ed. St. Louis: Academic Press; 2009. p.189-207.
49. Akova M, Kayaalp SO. Antibiyotikler. Kayaalp SO (Editör). *Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji*'de. 12. baskı. Ankara: Pelikan Yayıncılık; 2009. s.188-200.
50. Schmutz HR, Detampel P, Bühler T, Büttler A, Gygax B, Huwyler J. In vitro assessment of the formation of ceftriaxone- calcium precipitates in human plasma. *J Pharm Sci* 2011;100(6):2300-10.
51. D'Hooge R, Deyn PP. Applications of the Morris Water Maze in the study of learning and memory. *Brain Res Rev* 2001;36:60-90.
52. Mookherjee P, Green PS, Watson GS, Marques MA, Tanaka K, Meeker KD, et al. GLT-1 loss accelerates cognitive deficit onset in an Alzheimer's disease animal model. *J Alzheimers Dis* 2011;26:447-55.
53. Ulugol A. Reduction of dependence to cannabinoids by GLT-1 activating property of the beta-lactam antibiotic. *Med Hypotheses*. In press.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.mehy.2012.11.040>
54. Bechtholt-Gompf AJ, Walther HV, Adams MA, Carlezon WA, Jr., Ongur D, Cohen BM. Blockade of astrocytic glutamate uptake in rats induces signs of anhedonia and impaired spatial memory. *Neuropsychopharmacology* 2010;35:2049-59.
55. Omrani A, Melone M, Bellesi M, Safiulina V, Aida T, Tanaka K, et al. Up-regulation of GLT-1 severely impairs LTD at mossy fibre--CA3 synapses. *J Physiol* 2009;587:4575-88.
56. Zhang M, Li W-B, Liu Y-X, Liang C-J, Liu L-Z, et al. High expression of GLT-1 in hippocampal CA3 and dentate gyrus subfields contributes to their inherent resistance to ischemia in rats. *Neurochem Int* 2011;59:1019-28.
57. Katagiri H, Tanaka K, Manabe T. Requirement of appropriate glutamate concentrations in the synaptic cleft for hippocampal LTP induction. *Eur J Neurosci* 2001;14:547-53.
58. Heo S, Jung G, Beuk T, Hoyer H, Lubec G. Hippocampal glutamate transporter 1 (GLT-1) complex levels are paralleling memory training in the Multiple T-maze in C57BL/6J mice. *Brain Struct Funct* 2012;217:363-78.

## RESİMLEMELER LİSTESİ

### TABLolar

**Tablo 1.** Farelerin deney boyunca bırakıldıkları yönler.

### ŞEKİLLER

**Şekil 1.** NMDA, AMPA reseptörlerinin, glutamat taşıyıcılarının ve  $Ca^{+2}$  kanallarının yerleşimi.

**Şekil 2.** NMDA reseptör kompleksinin şematik gösterimi.

**Şekil 3.** Glutamat, reseptörleri ve taşıyıcıları.

**Şekil 4.** İnsan, maymun ve rat beyinlerinin hipokampal sistemlerinin karşılaştırmalı görüntüleri.

**Şekil 5.** Pre- ve para- subikulum yapılarının karşılaştırmalı görüntüleri.

**Şekil 6.** Hipokampal sistemin basit şematik gösterimi.

**Şekil 7.** Günlük 4 yüzdürme eğitiminin ortalaması (blok) olarak farelerin platforma erişme süresi.

**Şekil 8.** Günlük 4 yüzdürme eğitiminin ortalaması (blok) olarak farelerin platforma ortalama uzaklıkları.

**Şekil 9.** Günlük dört yüzdürme eğitiminin ortalaması (blok) olarak farelerin platforma erişene kadar yüzdükleri mesafe.

**Şekil 10.** Günlük dört yüzdürme eğitiminin ortalaması (blok) olarak farelerin duvara 10 cm uzaklıktaki alanda yüzdükleri süre.

**Şekil 11.** Günlük dört yüzdürme eğitiminin ortalaması (blok) olarak farelerin yüzme hızları.

**Şekil 12.** Probe testinde (8. gün) hedef kadranda geçirilen süre.

**Şekil 13.** Probe testinde (8. gün) platformun olması gereken bölgeye ortalama uzaklık.

**Şekil 14.** Probe testinde (8. gün) farelerin duvara 10 cm uzaklıkta yüzme süreleri.

**Şekil 15.** Probe testinde (8. gün) platformun olması gereken bölgeden geçiş sayısı.

**Şekil 16.** Probe testinde (8. gün) platform bölgesine erişene kadar geçen süre.

**Şekil 17.** Probe testinde (8. gün) hedef kadrana erişene kadar geçen süre.

**Şekil 18.** Probe testinde (8. gün) kadrarlarda geçirilen süre.

**Şekil 19.** Fare hipokampusünün farklı bölgelerinde (CA1, CA3, dentat girus-DG) kronik ve akut seftriakson uygulaması sonucu GLT-1 ekspresyonu.

**Şekil 20.** Fare hipokampusünün farklı bölgelerinde (CA1, CA3, dentat girus-DG) kronik ve akut seftriakson uygulamasının GLT-1 ekspresyonu üzerine immuno-histokimya analizi.

**Şekil 21.** Seftriakson dozlarına göre fare hipokampusünün farklı bölgelerindeki (CA1, CA3, dentat girus-DG) GLT-1 ekspresyonunun kendi içinde karşılaştırılması.

## ÖZGEÇMİŞ

1986 yılında İstanbul'da doğdum. İlk ve orta eğitimimi Bandırma' da, lise eğitimimi Kırklareli Anadolu Lisesi'nde, lisans eğitimimi Yıldız Teknik Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya bölümünde tamamladım. 2010 yılında Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalında yüksek lisans programına başladım.

2011 yılından beri Tekirdağ- Çerkezköy Organize Sanayi Bölgesinde kurulu olan Koçak Farma İlaç ve Kimya Sanayi A.Ş. 'de Ar-Ge Analisti olarak çalışmaktayım.

**EKLER**



T.C.  
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ  
İdari ve Mali İşler Daire Başkanlığı

SAYI : B.30.2.TRK.0.73.00.00/1742-6831  
KONU :

EDİRNE  
06 NİSAN 2011

Sayın Prof. Dr. Ahmet ULUGÖL  
Trakya Üniversitesi  
Tıp Fakültesi  
Farmakoloji Anabilim Dalı  
EDİRNE

Yöneticiliğini yapmış olduğunuz Arş. Gör. İpek KARAMAN'ın "Seftriaksonun Uzaysal Bellek Üzerine Etkisinde GLT-1 Transporter Aktivasyonunun Rolü" başlıklı yüksek lisans projesinin, 12 (on iki) ay süre ve 7.000,00 TL ile desteklenmesine, Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu'nun 29.03.2011 tarih ve 2011/02 sayılı toplantısında mevcudun oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilimsel Araştırma Projeleri Yönergesi'nin 12. maddesi uyarınca düzenlenen ve ekte sunulan Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Sözleşmesi'nin tarafınızca imzalanarak 1 (bir) hafta içinde Rektörlüğe iletilmesi hususunda bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.

Prof. Dr. Beyhan KARAMANLIOĞLU  
Rektör Yardımcısı ve  
Komisyon Başkanı

EK: 1 adet protokol sözleşmesi

T.C.

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ

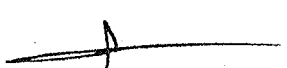
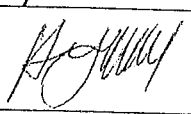
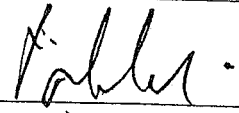
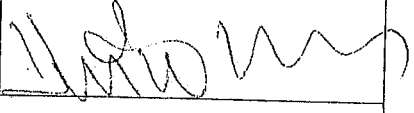
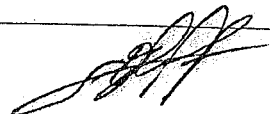
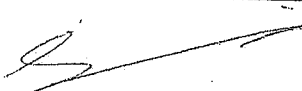
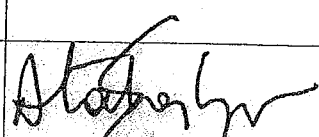
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARLARI

Oturum Sayısı: 02

Karar Tarihi: 16.02.2011

KARAR NO: 2011.02.03

Yürütücülüğünü Tıp Fakültesi öğretim üyesi Prof. Dr. Ahmet ULUGÖL'ün yaptığı Araş. Gör. İpek KARAMAN'ın Yüksek Lisans tezi olarak planlanan TÜHDYEK-2011/13 protokol nolu "Seftriaksonun uzaysal bellek üzerine etkisinde GLT-1 transporter aktivasyonunun rolü." başlıklı çalışma hakkında görüşüldü; araştırmanın amaç, yaklaşım, gereç ve yöntemler dikkate alınarak incelenmesi sonucunda: Hayvan Hakları Evrensel Bildirgesi ve etik kurallara uygun olarak hazırlandığına yapılabileceğine mevcudun oy birliği ile karar verilmiştir.

| Ünvanı/Adı/Soyadı   | Araştırma ile İlişki  | Toplantı Katılımı  | İmza  |
|---|---|--|---|
| Doç.Dr. Burhan AKSU<br>Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi                  | <input type="checkbox"/> var<br><input type="checkbox"/> yok            | <input type="checkbox"/> evet<br><input type="checkbox"/> hayır            |  |
| Yrd.Doç. Dr. Hayati ARDA<br>Fen-Edebiyat Fakültesi Öğretim Üyesi    | <input type="checkbox"/> var<br><input checked="" type="checkbox"/> yok | <input checked="" type="checkbox"/> evet<br><input type="checkbox"/> hayır |  |
| Vet.Hek. Ziya ÇUKUR<br>Veteriner Hekim                              | <input type="checkbox"/> var<br><input type="checkbox"/> yok            | <input type="checkbox"/> evet<br><input type="checkbox"/> hayır            |  |
| Hüseyin KOÇ<br>Sivil Toplum Örgütü Üyesi Sivi Üye                   | <input type="checkbox"/> var<br><input checked="" type="checkbox"/> yok | <input checked="" type="checkbox"/> evet<br><input type="checkbox"/> hayır |  |
| İlyas ÖZMEN<br>Sivil Üye  | <input type="checkbox"/> var<br><input type="checkbox"/> yok            | <input type="checkbox"/> evet<br><input type="checkbox"/> hayır            |   |
| Yrd.Doç.Dr. Beytullah ÖZKAN<br>Fen-Edebiyat Fakültesi Öğretim Üyesi | <input type="checkbox"/> var<br><input checked="" type="checkbox"/> yok | <input checked="" type="checkbox"/> evet<br><input type="checkbox"/> hayır |  |
| Doç.Dr. S. Arzu VARDAR<br>Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi               | <input type="checkbox"/> var<br><input checked="" type="checkbox"/> yok | <input checked="" type="checkbox"/> evet<br><input type="checkbox"/> hayır |  |
| Doç. Dr. Nilda TURGUT<br>Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi                | <input type="checkbox"/> var<br><input type="checkbox"/> yok            | <input type="checkbox"/> evet<br><input type="checkbox"/> hayır            |   |
| Yrd.Doç.Dr. Ruşen COŞAR-ALAŞ<br>Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi         | <input type="checkbox"/> var<br><input type="checkbox"/> yok            | <input type="checkbox"/> evet<br><input type="checkbox"/> hayır            |   |
| Yrd.Doç.Dr. Y. Atakan SEZER<br>Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi          | <input type="checkbox"/> var<br><input checked="" type="checkbox"/> yok | <input checked="" type="checkbox"/> evet<br><input type="checkbox"/> hayır |  |