

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

ADROPİNİN ÖĞRENMEYE ETKİSİ VE MEKANİZMASI

Ayşe ÖZKAN

DOKTORA TEZİ

2021-ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

ADROPİNİN ÖĞRENMEYE ETKİSİ VE MEKANİZMASI

Ayşe ÖZKAN

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Aysel AĞAR

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TDK-2019-4890 proje numarası ile desteklenmiştir.

“Kaynakça gösterilerek tezinden yararlanılabilir”

2021-ANTALYA

TEŐEKKÖR

Eğitim hayatım boyunca her konuda yol gōstericim olan, bilgilerinden, deneyimlerinden ve akademik bakış açısından yararlanma olanağı bulduğum, kendisi tarafından yetiştirilmekten gurur duyduğum tez danışmanım Prof. Dr. Aysel AĞAR’a,

Bilgi birikiminden faydalanma firsatı bulduğum, desteğini hiçbir zaman esirgemeyen Prof. Dr. Mutay AYDIN ASLAN’a ve Prof. Dr. V. Nimet UYSAL’a,

Tez çalışmalarım boyunca bana destek olan arkadaşlarım Arş. Gōr. Hande PARLAK ve Arş. Gōr. Osman Sinen’e,

Doğduğum günden bu yana hayallerimin peşinden gitmem için bana maddi/manevi destek olan, iyi bir insan olmam için elinden gelen her şeyi yapan biricik annem Bingöl ÖZKAN ve Sami ÖZKAN’a; tez çalışmalarım sırasında gece gündüz demeden yanımda olan ve karşılaştığım tüm zorluklarda sabırla ve inançla beni cesaretlendiren Dr. Ökkeş ZORTUK’a,

Sonsuz saygı ve teőekkürü borç bilirim.

ÖZET

Amaç: Çalışmamızda lateral ventriküle uygulanan adropinin spasyal öğrenme ve bellek üzerine etkilerinin ve moleküler mekanizmalarının araştırılması hedeflenmiştir.

Yöntem: 30 adet erkek Sprague Dawley sıçan rastgele kontrol ve adropin grubu olmak üzere iki gruba ayrılmıştır. Kontrol grubu sıçanlara altı gün boyunca intraserebroventriküler olarak % 0.9 sodyum klorür (NaCl) verilirken, adropin grubu hayvanlara % 0.9 NaCl içerisinde çözülmüş 1 nmol adropin uygulanmıştır. Öğrenme ve hafızayı değerlendirmek için Morris Su Tankı, Y-maze ve obje lokalizasyon testleri; motor fonksiyonları değerlendirmek için lokomotor aktivite testi yapılmıştır. Hipokampus dokularında Akt, fosfo-Akt, MAPK, fosfo-MAPK, CREB, fosfo-CREB, GSK3 β , fosfo-GSK3 β , NMDA reseptörü NR2B alt birimi, BDNF protein ekspresyonları western blot yöntemi ile belirlenmiştir. Hipokampus dokusundaki glutamin, glutamik asit ve adropin düzeyleri kütle spektrometrisi ve ELİSA metoduyla belirlenmiştir.

Bulgular: Adropin uygulaması ile lokomotor aktivite parametreleri kontrol grubuna kıyasla artış göstermiştir. Morris Su Tankı, Y-maze ve obje lokalizasyon testleri ile ölçülen spasyal öğrenme ve bellek parametreleri adropin uygulaması ile anlamlı derecede artmıştır. Adropin uygulaması ile hipokampus dokusunda p-Akt, p-CREB ve BDNF ekspresyonları artış göstermiştir. p-MAPK/MAPK, p-GSK3 β /GSK3 β ve NMDA reseptörü NR2B ekspresyonlarında ise değişiklik gözlenmemiştir. Ek olarak, adropin, glutamat ve glutamin düzeylerinin adropin uygulanan hayvanlarda kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir artış gösterdiği saptanmıştır.

Sonuç: Çalışmamızda adropin uygulamasının Morris Su Tankı, Y-maze ve obje lokalizasyon testlerinde yetişkin sıçanların uzaysal hafızasını ve öğrenmesini geliştirdiği saptanmıştır. Adropin kaynaklı bu gelişmeler, Akt sinyal yolağı aktivasyonuna bağlı olarak CREB ve BDNF ekspresyonunun artışı ile olmaktadır.

Anahtar Kelimeler: adropin, öğrenme, bellek, CREB, BDNF

ABSTRACT

Objective: In our study, we aimed to investigate the effects of adropin applied to the lateral ventricle on spatial learning and memory and its molecular mechanisms.

Method: Thirty male Sprague Dawley rats were randomly divided into two experimental groups as control and adropin groups. The control group received 0.9% NaCl solution (icv injections for six days) and the adropin group received 1 nmol of adropin (icv injections for six days) dissolved in 0.9 % NaCl solution. The Morris water maze, Y-maze and object location recognition tests were performed to evaluate learning and memory and the locomotor activity tests were measured to assess the motor functions. The expression of Akt, p-Akt, CREB, p-CREB, MAPK, p-MAPK, GSK3 β , p-GSK3 β , BDNF and NMDA receptor NR2B subunit were determined by using western blot. The levels of adropin, glutamine-glutamic acid were measured by an ELISA kit and mass spectrometry, respectively.

Results: The locomotor activity parameters were elevated with adropin administration in comparison to the control group. The adropin-injected group showed better performance in the spatial memory tasks as compared to the control group. In addition, adropin administration increased the levels of p-Akt, p-CREB and BDNF expression. We observed that p-MAPK/MAPK ratio and GSK3 β expression did not change in the adropin group with respect to the control group. Moreover, a significant alteration of NR2B expression was not observed in the adropin group. The glutamine, glutamic acid and adropin levels were found to increase with adropin treatment in the hippocampal tissues.

Conclusion: The result of the present study has shown that adropin improves spatial memory and learning of adult rats in the Morris Water Maze, Y-maze, and object location recognition tests. The adropin-induced improvements appear to be stimulated the Akt/CREB/BDNF signaling in the hippocampus.

Key words: adropin, learning, memory, CREB, BDNF

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
TABLolar DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR	ix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Öğrenme ve Bellek	3
2.1.1. Öğrenme	3
2.1.2. Bellek	7
2.1.3. Sinaptik Plastisite	12
2.1.4. LTP'nin Mekanizması	13
2.1.5. Sinaptik Plastisitede NMDA Reseptörlerinin Fonksiyonu	24
2.1.6. GSK3 β Sinyali	30
2.1.7. Adropin	35
3. GEREÇ ve YÖNTEM	40
3.1. Deney Gruplarının Oluşturulması	40
3.2. Deney Protokolü	40
3.3. İntraserebroventriküler Kanülasyon (İCV) Uygulaması	41

3.4. Adropin Uygulaması	42
3.5. Parametreler	42
3.5.1. Ağırlık takibi	42
3.5.2. Motor Aktivitenin Belirlenmesi	43
3.5.3. Uzaysal Hafıza ve Öğrenmenin Değerlendirilmesi	43
3.5.4. Biyokimyasal Analizler	48
3.5.5. Western Blot Analizi	49
3.5.6. Glutamin ve Glutamik Asit Miktarının Belirlenmesi	52
3.5.7. ELİSA Yöntemi ile Adropin Miktarının Belirlenmesi	53
3.5.8. Sonuçların Değerlendirilmesi	53
4. BULGULAR	54
4.1. Genel Görünüm	54
4.2. Davranış Deneyleri	54
4.2.1. Lokomotor Aktivite Testi	54
4.2.2. Morris Su Tankı (MWM)	55
4.2.3. Y-Maze Testi	58
4.2.4. Obje Lokalizasyon Testi (OLT)	59
4.3. Biyokimyasal Analiz Sonuçları	61
4.3.1. Adropin Miktarının ELİSA Yöntemi İle Belirlenmesi	61
4.3.2. Kütle Spektrometresi ile Glutamik Asit ve Glutamin Tayini	61
4.4. Western Blot ile Protein Ekspresyonunun Değerlendirilmesi	62

4.4.1. Akt ve p-Akt Protein Ekspresyonları	62
4.4.2. GSK3 β ve p-GSK3 β Protein Ekspresyonları	63
4.4.3. MAPK ve p-MAPK Protein Ekspresyonları	64
4.4.4. CREB ve p-CREB Protein Ekspresyonları	65
4.4.5. BDNF Protein Ekspresyonu	66
4.4.6. NMDA Reseptörü NR2B Alt Birimi Ekspresyonu	67
5. TARTIŞMA	68
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	77
KAYNAKLAR	78
ÖZGEÇMİŞ	104
EKLER	
Ek 1. Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Belgesi	109

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 3.1. Deneysel prosedürler için belirlenen deney grupları	40
Tablo 3.2. Morris Su Tankı testi deneme koordinatları.....	45
Tablo 3.3. Western blot işlemlerinde kullanılan antikorlar	51
Tablo 4.1. 5 gün boyunca sıçanların platformu bulma süreleri.....	55
Tablo 4.2. Prob trialde (6. Gün) değerlendirilen parametreler	56
Tablo 4.3. Y maze testinde değerlendirilen parametreler.....	58



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Aplysia'nın solunum organları.....	4
Şekil 2.2. Aplysia'da geri çekme refleksinin habitüasyonu.....	4
Şekil 2.3. Bellek çeşitleri	8
Şekil 2.4. Kemirgen hipokampüsünün yolakları	10
Şekil 2.5. Sıçan hipokampüsünün nöronal yolakları	11
Şekil 2.6. Kısa ve uzun dönem potansiyalizasyonun moleküler mekanizması.....	15
Şekil 2.7. E-LTP sırasında eksitator sinapsların BDNF-aracılı düzenlenmesi	16
Şekil 2.8. BDNF ve proBDNF oluşumu	19
Şekil 2.9. BDNF ve aktive ettiği hücre içi sinyal yolakları	23
Şekil 2.10. Glutamat reseptörleri	25
Şekil 2.11. Olgun sinapsta NMDA reseptörü plastisitesi	28
Şekil 3.1. Deney protokolü	41
Şekil 3.2. Stereotaksik çerçeveye sıçanların yerleştirilmesi	42
Şekil 3.3. Lokomotor aktivite kafesi.....	43
Şekil 3.4. Morris Su Tankı testinin şematize hali	44
Şekil 3.5. Deneylerde kullanılan Morris Su Tankı.	45
Şekil 3.6. Obje lokalizasyon test prosedürü.....	47
Şekil 3.7. Y-maze deney düzeneği.....	48
Şekil 3.8. Western blot elektroforez işlemi.....	50
Şekil 4.1. Lokomotor aktivite testi.....	54
Şekil 4.2. 5 gün boyunca sıçanların platformu bulma süreleri.	56
Şekil 4.3. Prob trialde sıçanların hedef kadranda bulunma süreleri	57
Şekil 4.4. Prob trialde sıçanların hedef kadrana giriş frekansları	57
Şekil 4.5. Kontrol ve adropin gruplarının prob trialde (6. günde) arena üzerinde takip ettiği yol	58
Şekil 4.6. Sıçanların yeni kolda geçirdikleri süre.	59
Şekil 4.7. Keşif zamanı	60
Şekil 4.8. Diskriminasyon indeksi.	60
Şekil 4.9. Hipokampüs dokusunda adropin miktarı.....	61

Şekil 4.10. Hipokampus dokusunda glutamik asit ve glutamin seviyeleri.	62
Şekil 4.11. Akt ve p-Akt protein ekspresyon düzeyleri	63
Şekil 4.12. GSK3 β ve p-GSK3 β protein ekspresyon düzeyleri	64
Şekil 4.13. MAPK ve p-MAPK protein ekspresyon düzeyleri.	65
Şekil 4.14. CREB ve p-CREB protein ekspresyon düzeyleri.	66
Şekil 4.15. BDNF protein ekspresyon düzeyi.....	67
Şekil 4.16. NMDA Reseptörü NR2B alt birimi protein ekspresyon düzeyi	67



SİMGELER ve KISALTMALAR

4E-BP1	: 4E-bağlanma proteini-1
A_{2A}R	: Adenozin 2A Reseptörü
AKT	: Serin/treonin-spesifik protein kinaz
AMPA	: α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropiyonik asit
AMPA	: AMPA Reseptörü
AP	: Anteroposterior
AP-1	: Aktivatör Protein-1
ApoER2	: Apolipoprotein Reseptör 2
BDNF	: Beyin Türevli Nörotrofik Faktör
BSA	: Bovin Serum Albümin
CA	: Cornu Ammonis-Ammon'un Boynuzu
CaMKII	: Ca ²⁺ /kalmodulin Bağımlı Protein Kinaz II
cAMP	: Siklik Adenozin Mono Fosfat
CD36	: Farklılaşma Kümesi 36
CPPA	: Coomassie Plus Protein Assay Reagent
CPT-1B	: Karnitin Palmitoltransferaz-1B
CRE	: cAMP Düzenleyici Element
CREB	: Siklik AMP-cevap Elementi Bağlayıcı Protein
CREB-1	: Siklik AMP-cevap Elementi Bağlayıcı Protein-1
CREB-2	: Siklik AMP-cevap Elementi Bağlayıcı Protein-2

CS	: Şartlı Uyaran (Conditioned Stimulus)
DAG	: Diaçilgliserol
DG	: Dentat Girus
DV	: Dorsoventral
EC	: Entorinal Korteks
Echo	: Enerji homeostazı-ilişkili gen
eIF4E	: Ökaryot Başlatıcı Faktör 4E
Elk-1	: ETS Transkripsiyon Faktör-1
E-LTP	: Erken LTP
eNOS	: Endotelial Nitrik Oksit Sentaz
EPO	: Eritropoietin
EPSP	: Uyarıcı Postsinaptik Potansiyel
ER	: Endoplazmik Retikulum
Erk1/2	: Ekstrasellüler Sinyal Düzenleyici Protein Kinaz ½
ESI	: Elektrosprey İyonizasyon
F-EPSP	: Hızlı Uyarıcı Postsinaptik Potansiyel
GD	: Güneydoğu
GDNF	: Glial Hücre Türevli Nörotrofik Faktörü
GDP	: Guanin Di Fosfat
GRB2	: Büyüme Faktörü Reseptör Bağlayıcı Protein 2
GSK3β	: Glikojen Sentaz Kinaz β

GTP	: Guanin Tri Fosfat
HIF-1α	: Hipoksi-Uyarıcı Faktör-1 α
HPLC	: Yüksek Hızlı Sıvı Kromatografisi
IC50	: İnhibitör Konsantrasyon
ICV	: İntraserebroventriküler Kanülasyon
IP3	: İnositol 1,4,5-trifosfat
IRS-1	: İnsülin Reseptör Substrat-1
KB	: Kuzeybatı
KD	: Kuzeydoğu
LC	: Sıvı Kromatografi
LDLR	: Düşük Yoğunluklu Lipoprotein Reseptörü
L-LTP	: Geç LTP
LPY	: Lateral Perforant Yolak
LTP	: Uzun Dönem Potansiyalizasyon
mAChR	: Muskarinik Asetilkolin Reseptörü
MAP1B	: Mikrotübül İlişkili Protein 1B
MAPK	: Mitojenler Tarafından Aktive Edilen Protein Kinaz
mGluR	: Metabotropik Glutamat Reseptörleri
ML	: Mediolateral
Mnk1	: MAPK ile etkileşen serin/treonin kinaz 1
MPY	: Medial Perforant Yolak

MRM	: Çoklu Reaksiyon İzleme
mRNA	: Haberci RNA
MS	: Kütle Spektrometresi
MSS	: Merkezi Sinir Sistemi
mTOR	: Rapamisinin Memeli Hedefi
NaCl	: Sodyum Klorür
NB3	: Nöronal Tanıma Molekülü 3
NCAM	: Nöronal Hücre Adezyon Molekülü
NFAT	: Aktive Edilmiş T Hücresi Nüklear Faktörü
NF-κB	: Nüklear Faktör Kappa B
NGF	: Sinir Büyüme Faktörü
NMDA	: N-metil-D-aspartat
NO	: Nitrik Oksit
NR2B	: NMDA Reseptörü 2B Alt Birimi
Nrf2	: Nüklear Faktör Eritroid 2-ilişkili Faktör 2
NT3	: Nörotrofin 3
NT4	: Nörotrofin 4
OLT	: Obje Lokalizasyon Testi
PBS	: Fosfat Tuzu Tamponu
PDH	: Pirüvat Dehidrogenaz
PDK1	: 3-Fosfoinositid-Bağımlı Kinaz 1

PFK	: Prefrontal Korteks
PI3K	: Fosfatidilinositol 3-kinaz
PKA	: Protein Kinaz A
PKC	: Protein Kinaz C
PLCγ	: Fosfolipaz C γ
PKMζ	: Protein kinaz M ζ
pS	: Pikosiemens
PSD	: Postsinaptik Yoğunluklar
PSD-95	: Postsinaptik Yoğunluklar-95
PY	: Perforant Yolak
ROCK	: Rho İlişkili Protein Kinaz
Rsk	: Ribozomal Protein S6 kinaz
SAP102	: Sinapsla İlişkili Protein-102
SF	: Serum Fizyolojik
SGZ	: Subgranüler Zon
SHC	: SHC adaptor protein
SNP	: Tek Nükleotid Polimorfizmi
SVZ	: Subventriküler Zon
TA	: Temporoammonik Yol
Trk	: Tropomiyozin İlişkili Kinaz
TRPC	: Geçici Reseptör Potansiyel C

TSC1	: Tüberoskleroz kompleksi 1
TSC2	: Tüberoskleroz kompleksi 2
UFLC	: Ultra Hızlı Sıvı Kromatografisi
US	: Şartsız Uyarıcı (Unconditioned Stimulus)
VEGFR2	: Vasküler Endotel Büyüme Faktör Reseptörü 2
VGCC	: Voltaj Kapılı Ca^{2+} Kanalı
VTA	: Ventral Tegmental Alan

1. GİRİŞ

Adropin insanlarda 9.kromozomdaki enerji homeostazı-ilişkili gen (*Enho*) tarafından kodlanan bir peptittir (Kumar ve ark., 2008). Merkezi sinir sisteminde nöronlar, nöroglial hücreler, pia mater, Purkinje hücreleri ve granüler tabakadaki hücrelerde eksprese edilmektedir (Lovren ve ark., 2010; Aydın ve ark., 2013). Glikoz ve lipid homeostazisini düzenleyici fonksiyonunun yanı sıra endotel üzerine koruyucu etki gösteren adropin, vasküler endotel büyüme faktör reseptörü 2 (VEGFR2) ekspresyonunu da arttırmaktadır (Kumar ve ark., 2008; Lovren ve ark., 2010). Hücre içerisinde fosfatidilinositol-3 kinaz/serin treonin-spesifik protein kinaz (PI3K/Akt) ve ekstrasellüler sinyal düzenleyici protein kinaz 1/2 (Erk1/2) yolakları üzerinden etkisini gösterirken, endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) sentezini de düzenlemektedir (Kumar ve ark., 2008). Stein ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada adropin reseptörünün GPR19 isimli dopamin D2 reseptör ailesine benzer bir transmembran reseptör olduğu bulunmuştur (Stein ve ark., 2016). GPR19 reseptörü serebellum, kaudat, putamen, talamus, hipotalamus, hipokampus, frontal korteks ve olfaktör bulbusta yüksek seviyede eksprese edilmektedir (O'Dowd ve ark., 1996; Hoffmeister-Ullrich ve ark., 2004). Bu reseptör aracılı aktivasyon, hücre içerisinde MAPK ve Akt'nin fosforilasyonunu sağlamaktadır (Hossain ve ark., 2016).

Sinaptik plastisitenin öğrenme ve hafızanın altında yatan en önemli mekanizma olduğu bilinmektedir (Goda ve Stevens, 1996). Beyin türevli nörotrofik faktör (BDNF)/Tropomiyozin ilişkili kinaz (TrkB) sinyali sinaptik plastisiteyi düzenleyerek öğrenme ve bellek oluşumunu sağlamaktadır (Figurov ve ark., 1996). Bu sinyal yolağında PI3K/Akt yolağı, N-metil-D-aspartat (NMDA)-reseptör aracılı sinaptik plastisiteyi modüle etmektedir (Levine ve ark., 1998). BDNF'nin reseptörüne bağlanması ile aktive olan hücre içi sinyal yolakları bir transkripsiyon faktörü olan cAMP cevap elementi bağlayıcı protein (CREB)'inin fosforilasyonuna neden olarak yeni NMDA ve α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropiyonik asit (AMPA) reseptör ekspresyonunu sağlamaktadır (Yoshii ve Constantine-Paton, 2007). Bu da hipokampüste uzun dönem potansiyalizasyon (LTP), öğrenme ve bellek oluşumuna katkıda bulunmaktadır. Akt tarafından fosforillenen diğer bir protein olan Girdin (bir aktin filamenti), NR2B

proteininin Y1472 bölgesinden fosforillenmesini sağlayarak NMDA reseptör aktivasyonunu gerçekleştirmektedir ve böylece BDNF-aracılı NMDA reseptör aktivasyonu sağlayarak yeni reseptör oluşumuna sebep olmaktadır (Itoh ve ark., 2016).

Beyin türevli nörotrofik faktör, nöronal hücrelerin sağ kalımı ve farklılaşmasında görev alan molekül olarak tanımlanmıştır (Cohen ve ark., 1954). Hücredeki fizyolojik cevaplarını membrana bağlı TrkB reseptör grubunu aktive ederek oluşturan BDNF, mitojenler tarafından aktive edilen protein kinaz (MAPK), PI3K-Akt yolağı ve fosfolipaz C γ (PLC γ)-Ca²⁺ yolağı gibi sinyal yollarını uyararak cevap oluşturmaktadır (Kaplan ve Miller, 2000). MAPK yolağının aktive olması için TrkB reseptörü 515. pozisyonundaki treoninden fosforillenmekte ve bir dizi hücre içi proteini fosforilayarak dentat girustaki sinapslarda BDNF proteininin ekspresyonu için gerekli olan CREB proteinini uyararak sinaptik plastisite genlerinin ekspresyonunu arttırmaktadır (Ying ve ark., 2002; Pereira ve ark., 2006b). BDNF'nin bağlanması ile aktive olan TrkB ikinci bir sinyal yolağı olan PI3K-Akt yolağını da aktive etmektedir. PI3K'ın aktive ettiği Akt protein sentezinin BDNF-aracılı kontrolünü sağlamaktadır (Crowder ve Freeman, 1998).

Bu projede, adropinin (1 nmol/gün, icv., 6 gün) Sprague Dawley sıçanlarda bilişsel ve motor fonksiyonlar, öğrenme ve bellek davranışları üzerine olan etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda (1) bilişsel fonksiyonlar (Morris Su Tankı testi, Y-maze ve Obje lokalizasyon testi), (2) motor fonksiyonlar (lokomotor aktivite), (3) hipokampus dokularındaki protein ekspresyonlarını belirlemek için western blot yöntemi ile Akt, p-Akt, MAPK, p-MAPK, CREB, p-CREB, glikojen sentaz kinaz 3 β (GSK3 β), p-GSK3 β , NMDA reseptörü NR2B alt birimi (NR2B), BDNF proteinleri, (4) ELISA yöntemi ile hipokampus dokusunda adropin miktarı, (5) biyokimyasal analizlerle hipokampus dokularında nörotransmitter seviyeleri (glutamin, glutamik asit) analiz edilmiştir. Bu çalışma ile merkezi sinir sisteminde eksprese olan adropinin motor fonksiyonlar, öğrenme ve bellek üzerine etkisi ilk kez *in vivo* olarak araştırılmıştır. Ekzojen olarak uygulanan adropinin bellek parametreleri üzerine arttırıcı etkisi olduğu biyokimyasal ve davranış verileri ile desteklenmiş ve mekanizması aydınlatılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Öğrenme ve Bellek

2.1.1. Öğrenme

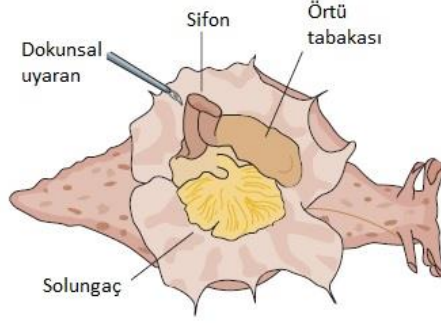
Çevre hakkında sonradan bilgi edinilmesi sonucu davranışların bu bilgilere göre değiştirilmesine öğrenme denir.

Öğrenme karşılaştırmasız (non-associative) ve karşılaştırmalı (associative) olmak üzere iki ana grupta sınıflandırılmaktadır:

- a) Karşılaştırmasız (non-associative) öğrenme
 - Alışkanlık (Habitüasyon)
 - Hassaslaştırma (Sensitizasyon)
- b) Karşılaştırmalı (associative) öğrenme
 - Klasik şartlanma
 - Aletli şartlanma

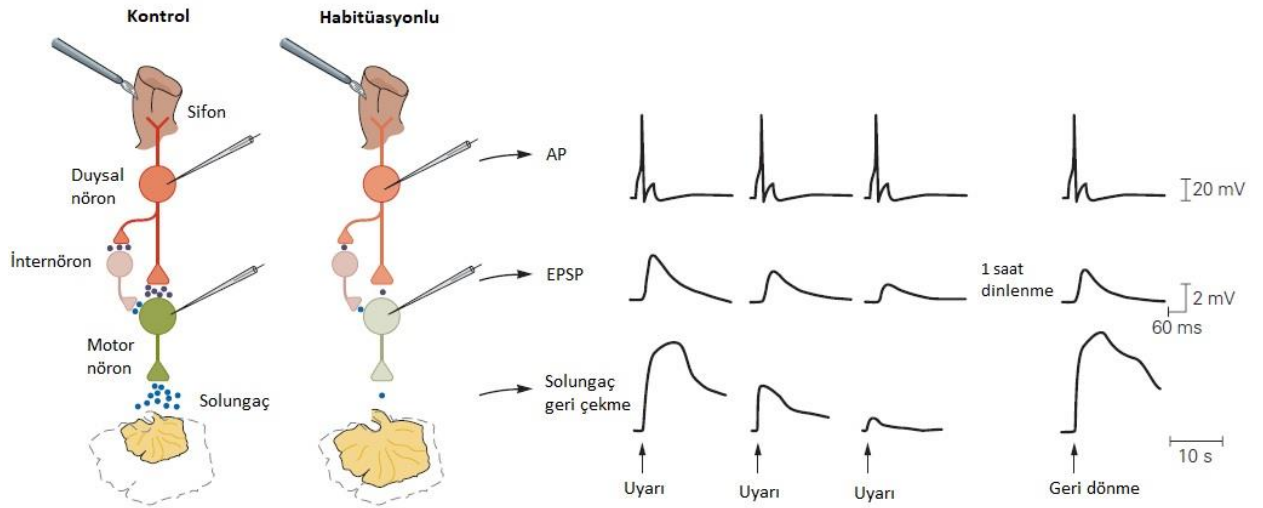
Karşılaştırmasız Öğrenme

Karşılaştırmasız öğrenme kendi içerisinde alışkanlık (habitüasyon) ve hassaslaştırma (sensitizasyon) olarak ikiye ayrılmaktadır. **Habitüasyon**, vücudun zararsız ve tekrarlayan uyaranlara karşı davranışsal tepkinin kademeli olarak azalması şeklinde tanımlanmaktadır. *Aplysia californica*, 20.000 nörona sahip bir deniz yumuşakçasıdır. Bu deniz canlısında geri çekme refleksine sahip, deniz suyunun ve atıkların dışarı atılması için kullanılan solungaç ve sifon adında organları bulunmaktadır (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Aplysia'nın solunum organları. (Kandel ve Schwartz, 2013)'ten uyarlanarak Türkçe'leştirilmiştir.

Aplysia'da sifona dokunulduğunda duysal mekanoreseptörler uyarılmaktadır. Glutamatın duysal nöron terminallerinden salınması, internöronlarda ve motor hücrelerde hızlı uyarıcı postsinaptik potansiyeller (F-EPSP) oluşturmaktadır. Duysal hücrelerden ve internöronlardan gelen EPSP'ler motor hücrelerde spasyal ve temporal sumasyona neden olarak solungaçta kuvvetli bir geri çekilme hareketi sağlamaktadır. Tekrarlayan uyarılar verilmesi ise Ca^{2+} kanallarının inaktive olmasını sağlarken, duysal nöronlardan glutamat salınımının azalmasına neden olmaktadır (Şekil 2.2). İternöron ve motor nöronda oluşan EPSP'nin küçülmesi ile birlikte sinaps sayısı %30 azalmaktadır (Castellucci ve Kandel, 1974; Bailey ve Chen, 1983).



Şekil 2.2. Aplysia'da geri çekme refleksinin habitüasyonu. (Kandel ve Schwartz, 2013)'den uyarlanarak Türkçe'leştirilmiştir.

Sensitizasyon ise orta veya güçlü bir uyarının tekrarlanarak verilmesi ile ortaya çıkan tepkidir. Zararlı bir uyarın ile karşılaşıldığında bunun öğrenilmesi ve daha sonra zararsız

uyaranlara bile duyarlı hale gelmesi olayıdır. Hayvanın vücudunun bir bölgesine kısa ama güçlü elektrik şoklarının verilmesi, diğer bölgelere gönderilen zayıf uyaranların ortaya çıkardığı geri çekilme reflekslerini arttırabilmektedir. Zayıf uyaranlar ile artan motor nöron aktivitesi geri çekilme reflekslerini ortaya çıkarmaktadır.

Kısa süreli sensitizasyonda en az üç grup düzenleyici internöron görev almaktadır ve burada en çok çalışılan nörotransmitter serotoninidir. Serotonerjik internöronlar duysal nöronların presinaptik terminallerindeki akso-aksonik sinapslar dahil olmak üzere birçok bölgede sinaps oluşturmaktadır. Uyarıdan sonra internöronlardan salınan serotonin, G proteinine bağlanarak adenilat siklazın aktivitesini arttırmaktadır. Bu etki ile siklik adenozin monofosfat (cAMP) oluşturulmaktadır ve oluşan cAMP protein kinaz A (PKA)'yı aktive etmektedir. Serotonin ayrıca, fosfolipidlerin hidrolizine ve protein kinaz C (PKC)'nin aktivasyonuna yol açan ikinci bir G protein kapılı reseptörü aktif hale getirmektedir. PKA ve PKC'nin aracılık ettiği protein fosforilasyonu, duysal nöronlardan nörotransmitter salınmasını arttırmaktadır. Ek olarak, PKA K^+ kanallarını fosforile ederek kapanmasına neden olur ve bu olay aksiyon potansiyelini genişleterek voltaj kapılı Ca^{2+} kanalları aracılığıyla hücre içerisine Ca^{2+} akışını arttırarak nörotransmitter salınımını uyarmaktadır. Bir kuyruk şoku ile serotonin salınmasına yanıt olarak presinaptik fasilitasyon (kolaylaştırma) birkaç dakika sürmektedir.

Solungaç geri çekme refleksinin uzun süreli sensitizasyonu, nöronlarda bulunan mRNA'ların ve proteinlerin sentezini gerektirmektedir. Kısa süreli bellekten uzun süreli belleğe geçiş, tekrarlayan uyarılar ile salınan serotoninin reseptörüne bağlanarak hücre içerisinde cAMP miktarını arttırması ve devamında PKA'nın nükleusa transloke olması ile başlamaktadır. PKA, transkripsiyon aktivatörü olan görev yapan siklik AMP-sorumlu Element Bağlayıcı Protein 1 (CREB-1)'i fosforlayıp cAMP düzenleyici element (CRE)'e bağlanmasını uyararak gen transkripsiyonunu aktive etmektedir. Diğer taraftan PKA, MAPK'ı aktifleştirerek transkripsiyon baskılayıcı siklik AMP-sorumlu Element Bağlayıcı Protein 2 (CREB-2)'yi fosforile etmektedir ve baskılayıcı özelliğini ortadan kaldırmaktadır (Bartsch ve ark., 1998). Ayrıca, CREB-1'in kodladığı bir gen tarafından eksprese edilen ubiquitin hidrolaz, PKA'nın düzenleyici alt birimini proteolitik kesimle ayırarak PKA'nın katalitik alt biriminin uzun süre aktivite göstermesine neden

olmaktadır. Ek olarak CREB-1, transkripsiyon aktivatörü olan C/EBP'nin ekspresyonunu uyararak yeni sinaptik bağlantıların büyümesi için gerekli olan proteinlerin üretimini sağlamaktadır (Kandel ve Schwartz, 2013). CREB1'in aktivasyonu ve CREB2'nin baskılanması koordineli şekilde yürütüldüğünde, çeşitli stimuluslara cevap olarak hızlı ve geçici bir şekilde aktive olan bazı genlerin transkripsiyonunu başlatmaktadır. Uzun dönem öğrenme ve belleğin şekillenmesi de bu transkripsiyon başlatıcı ve susturucu elementlerin modülasyonu ile mümkün olmaktadır.

Karşılaştırmalı Öğrenme

Karşılaştırmalı öğrenme, iki uyaran arasında (klasik şartlanma) veya bir davranış ile sonuçları arasında (aletli şartlanma) bir ilişkinin oluşup oluşmadığına göre iki ana gruba ayrılmaktadır. **Klasik (Pavlovyan) şartlanma** Ivan Pavlov tarafından tanımlanmıştır ve temelinde iki uyarıyı birbiri ile eşleme prensibine dayanmaktadır. Şartlı uyaran (Conditioned stimulus (CS)) olarak ışık, ses gibi cevap uyandırmayacak veya uyarandan bağımsız bir cevap ortaya çıkaracak bir stimulus (Şartsız uyaran (Unconditioned stimulus-US)) seçilmektedir. Şartlı uyaran ve şartsız uyarının tekrarlayan uygulaması (bazen tek bir deneme de olabilir) ile de öğrenilmiş bir yanıt ortaya çıkmaktadır (koşullu cevap) (Carew ve ark., 1981). Habitüasyon ve sensitizasyon gibi tek bir uyarının özelliklerinin öğrenilmesinin aksine klasik şartlanmada hayvan bir uyarıyı diğeri ile ilişkilendirmeyi öğrenmektedir. Aplysia üzerinde yapılan deneylerde klasik şartlanma oluşturabilmek için şartlı bir uyaran ve koşulsuz uyarının birbiri ardına verilmesi ve uyarıların verilme frekansının önemli olduğu bulunmuştur.

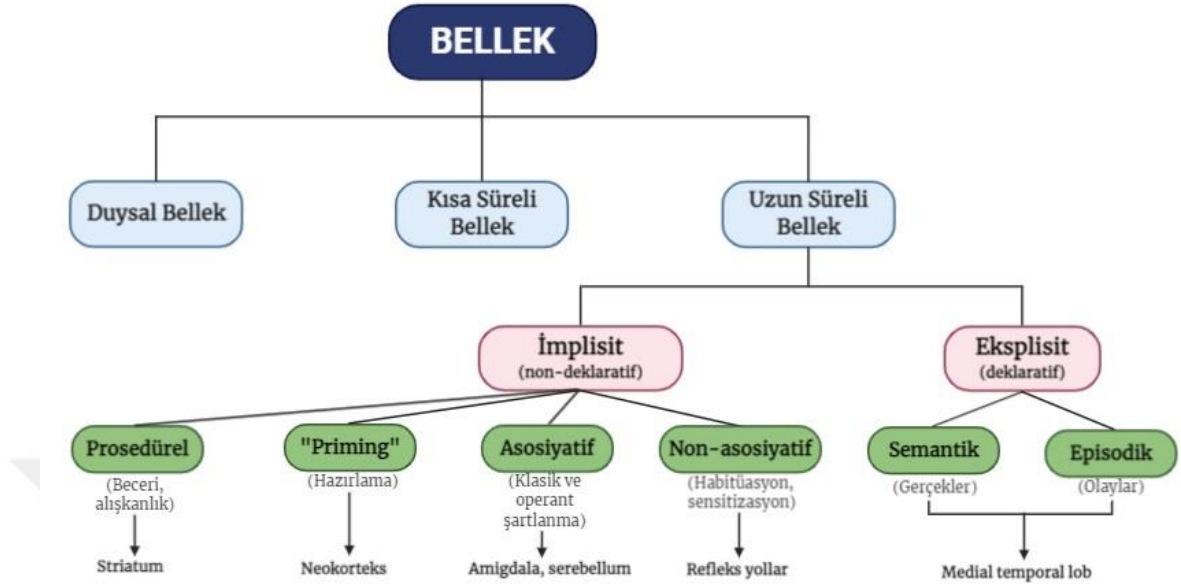
Karşılaştırmalı öğrenmede kuyruğa verilen şok ile internöronlar aktive olur ve sifona dokunulması ile serotonin salınarak duysal nöronlarda aksiyon potansiyeli tetiklenmektedir. Oluşan aksiyon potansiyeli duysal nöronların presinaptik terminalinden Ca^{2+} akışını uyarmaktadır. Hücre içine giren Ca^{2+} kalmoduline bağlanıp adenilat siklazı aktive etmektedir. Böylece kuyruktaki şartsız uyaran ardından salınan serotonine daha kuvvetli yanıt verilir. cAMP üretiminin artmasını takiben presinaptik fasilitasyon oluşmaktadır (Kandel ve Schwartz, 2013).

Aletli şartlanma ise Thorndike'nin Etki Yasası'na dayanan deneysel bir prosedürdür. Buna göre; istenen etkilerin izlediği davranışların tekrarlanma eğiliminde olacağını belirtirken, caydırıcı etkilerin izlediği davranışların bastırılma eğiliminde olacağını belirtmektedir. Aletli şartlanmada araştırmacı hayvana olumlu ve olumsuz uyarılar verilen bir deneysel prosedürü uygulayabilmektedir. Olumlu uyarı (örneğin yiyecek) bu davranışın oluşumunu arttıracak iken (pekiştirme); olumsuz bir stimulus (örneğin ağrılı bir elektrik çarpması) bu davranışın gelecekteki olasılığını (ceza süreci) azaltma eğiliminde olmaktadır. Aletli şartlanmanın arkasındaki temel kavram bir uyarının bir davranışa ve daha sonra da bir sonuca yol açmasıdır. Bu şartlanma biçiminde olumlu ve olumsuz uyarılar ile birlikte çeşitli pekiştiriciler de bulunmaktadır. Uyarı, oluşan yanıt ve pekiştirici arasındaki ilişki, gelecekte bir davranışın tekrar olma olasılığını etkileyen faktörlerdir. Pekiştirici olumlu ise bir tür ödül veya olumsuz sonuçlar olması durumunda da ceza olmaktadır.

2.1.2. Bellek

Öğrenilen bilgilerin kodlanması, depolanması gerektiğinde geri çağırılmasına bellek denir. Modern davranışsal ve biyolojik çalışmalar, belleğin bütüncül bir birimi olmadığını, her biri kendi kurallarına sahip üç ana kategoriye ayrılabilen farklı zihinsel süreçlerden oluştuğunu ortaya koymaktadır (Squire, 2004) (Şekil 2.3):

- Duyusal bellek
- Kısa süreli bellek (çalışma belleği)
- Uzun süreli bellek



Şekil 2.3. Bellek çeşitleri. Şekil, (Squire, 2004)'dan uyarlanarak çizilmiştir.

Duysal Bellek

Dış dünyadan gelen duysal uyarıların kortikal alanlar tarafından algılandığı, duysal bilgilerin işlenmemiş bir biçimde tutulduğu bellektir. Bu bellek kısa ömürlüdür (0.5-3 saniye) fakat büyük bir kapasiteye sahiptir. Duysal bellek başlangıçta ilgi alanımız olmasa bile konuşulduktan sonra bir şeyi hatırlama yeteneğimizi açıklamaktadır. Algılama sürecinin ilk adımı olan bu bellek, tüm duysal bilgileri kısa süreli belleğe geçirmemektedir (Atkinson ve Shiffrin, 1968).

Duysal bellek ikonik ve ekoik bellek olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Görsel bilgilerin çok kısa bir süre için sunulması ve derin bir kodlama gerçekleşmeden bu bilgilerin belirli yönlerinin hatırlanmasına **ikonik bellek** denmektedir. Ardışık işleme nedeniyle daha düşük kapasiteye sahip olan **ekoik bellek** ise işitsel bilgilerin hatırlanmasını sağlamaktadır (Kandel ve Schwartz, 2013).

Kısa Süreli Bellek (Çalışma Belleği)

Kısa süreli bellek, dikkatin uygulandığı duysal bir bilgi alt kümesinin geçici deposudur. Duysal bellek, kısa süreli belleğe dönüştürülebileceği gibi sonsuza kadar bilinçten kaybolabilir. Oluşturulan kısa süreli bellekte saklama süresi 10-12 saniye arasında değişmektedir. Genel olarak duysal bilgi işleme ile ilgili bölgeler olan frontal loblarda

ve kortikal alanlarda kısa süreli belleğin işlendiği kabul edilmektedir (prefrontal korteks-PFK) (Kandel, 2001b).

Uzun Süreli Bellek

Uzun süreli bellek, kişinin bilgi saklanması katılımı ve ilgisine bağlı olarak bir gün, birkaç ay, birkaç yıl veya bir ömür boyu saklanabilen, sadece süresi değil depolama kapasitesinin de sonsuz olduğu bir bellek tipidir. Eksplisit ve implisit bellek olmak üzere ikiye ayrılmaktadır.

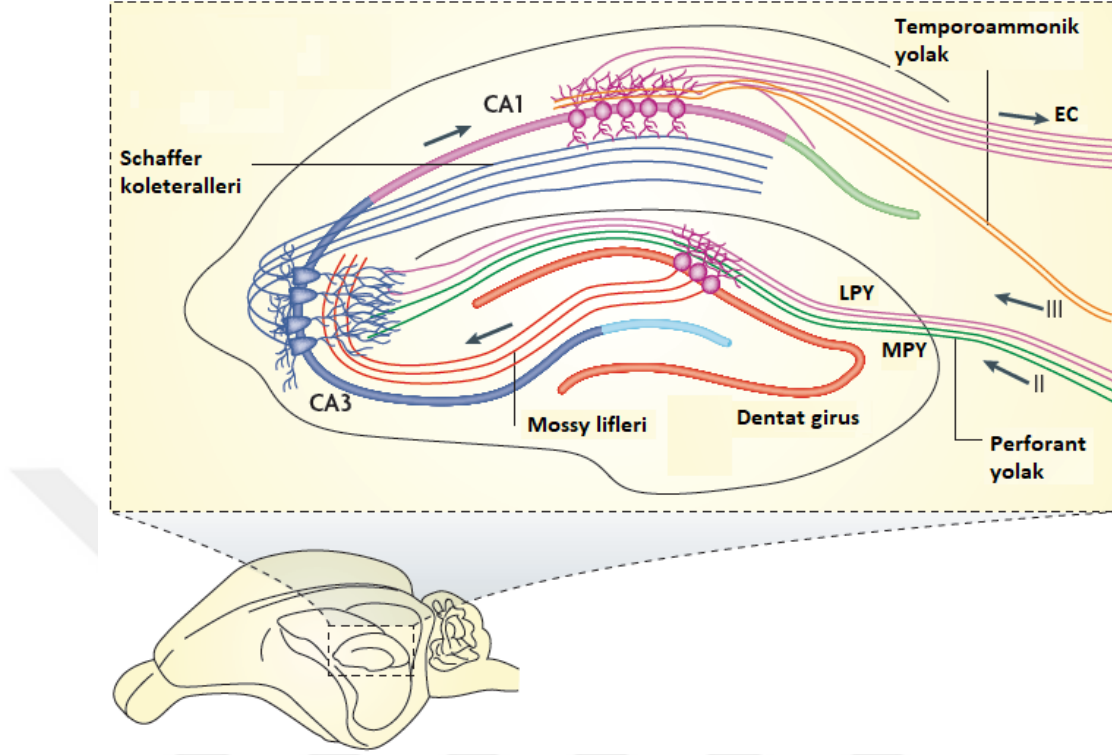
Eksplisit Bellek

Eksplisit bellek insanlar, yerler ve cisimler hakkındaki bilgilerin bilinçli olarak hatırlanmasıdır ve özellikle omurgalı beyinde oldukça gelişmiştir. Bu bellek tipi, hipokampal formasyonun (oluşum) da dahil olduğu serebral korteksin medial temporal lobunda bulunmaktadır ve kodlama, depolama, birleştirme ve geri çağırma olmak üzere dört aşamadan oluşmaktadır (Markowitsch, 2013).

Eksplisit belleğin en iyi şekilde geliştiği fare, sıçan gibi kemirgenlerin beyni, aynı zamanda karmaşık uzaysal ortamlarda gezinmek için oldukça iyi uyarlanmıştır. Memeli beyinde önemli bir subkortikal yapı olan hipokampus, özellikle mekansal öğrenme ve bellek için oldukça önemlidir.

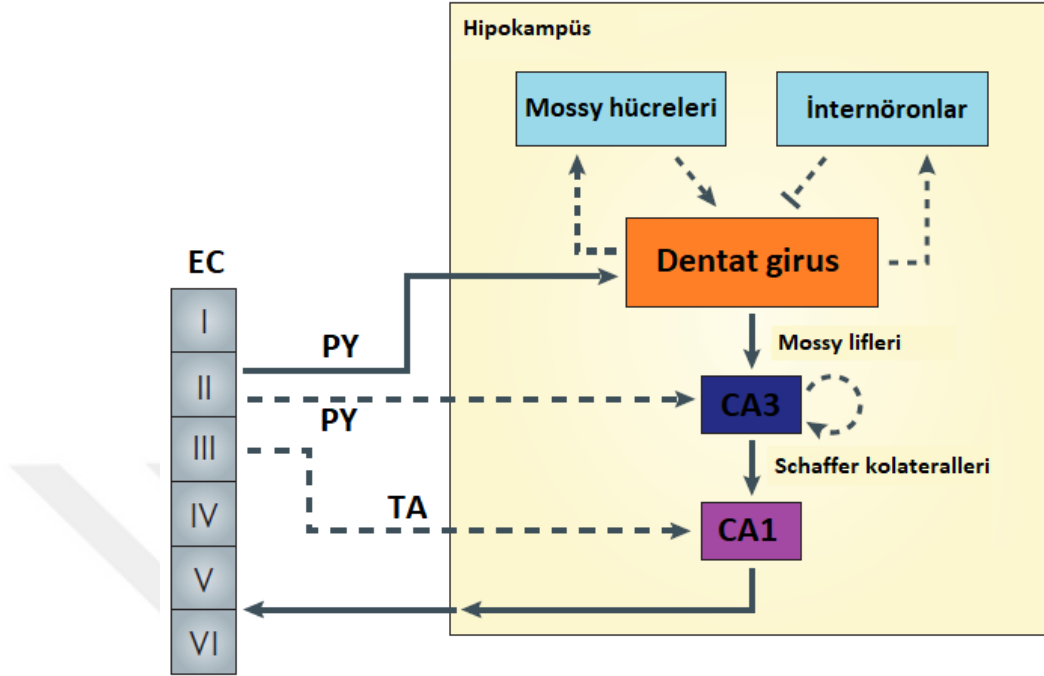
Hipokampus

Hipokampal formasyon sitoarkitektonik olarak dentat girus (DG), subikulum ve hipokampus olmak üzere üç farklı bölgeden oluşmaktadır. Şekli nedeniyle eski tarz anatomik adlandırmada Yunanca Cornu Ammonis (Ammon'un Boynuzu) olarak adlandırılan hipokampus, şekil itibari ile deniz atına benzetilmektedir. Cornu Ammonis (CA) terminolojisine göre hipokampus CA1, CA2, CA3 ve CA4 olmak üzere başlıca dört alt bölüme ayrılmaktadır. Hipokampal oluşumun diğer bölgeleri arasında presubikulum, parasubikulum ve entorinal korteks bulunmaktadır (Strange ve ark., 2014). Hipokampusün alt bölgeleri, eksitator trisinaptik yolak olarak isimlendirilen ve entorinal-hipokampal döngüyü oluşturan sıralı uyarıcı projeksiyonlarla birbirine bağlanmaktadır (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Kemirgen hipokampusünün yolları. (Deng ve ark., 2010) referans alınarak yeniden çizilmiştir. EC: Entorinal korteks, LPY: Lateral perforant yolak, MPY: Medial perforant yolak.

Entorinal kortekste tabaka II'den çıkan aksonlar medial ve lateral yollardan oluşan perforant yolak (PY) aracılığı ile DG'ye projekte olmaktadır. DG projeksiyonlarını Mossy lifleri ile CA3'teki piramidal hücrelere gönderirken; CA3 piramidal nöronları bilgileri Schaffer kolateralleri ile CA1 piramidal nöronlarına iletmektedir. CA1 bölgesindeki piramidal nöronlar ise aksonlarını EC'nin derin tabakalarına iletmektedir. CA3 bölgesi, perforant yolak aracılığıyla EC tabaka II nöronlarından doğrudan projeksiyonlar almaktadır. CA1, temporoammonik yol (TA) ile EC tabaka III nöronlarından doğrudan girdi almaktadır. DG hücrelerinden çıkan projeksiyonlar ise Mossy hücreleri ve internöronlara gönderilmektedir (Şekil 2.5) (Deng ve ark., 2010).



Şekil 2.5. Sıçan hipokampusunun nöronal yolları. Şekil, (Deng ve ark., 2010)'tan uyarlanarak Türkçeleştirilmiştir. EC: Entorinal korteks, PY: Perforant yolak, TA: Temporoammonik yol.

Eksplisit bellek kendi içerisinde iki bellek tipine ayrılmaktadır:

- **Episodik bellek:** Uzay ve zamanda yer alan belirli olayların yanı sıra bu olayları hatırlamakta yer alan temel bilişsel süreçler ve nöronal mekanizmalar için olan belleği ifade etmektedir. Episodik belleği diğer bellek çeşitlerinden ayıran en önemli bileşeni hatırlanan olayın uzaysal veya zamansal bir bilgi olmasıdır (Tulving, 2002).
- **Semantik bellek:** Belirli gerçeklere uzanan, genel olarak kişinin dünya hakkındaki genel bilgisini ifade etmektedir. Sözcük bilgisi ve anlamları, bilgiyi organize eden her türlü kavram bu bellek kapsamında örnek olarak verilebilmektedir (Neely, 1977).

İmplicit Bellek

İmplicit bellek, motor ve algısal beceriler için gelişmiş bir bellektir ve geçmiş deneyimin bilinçsiz bir şekilde performans yoluyla hatırlanması durumudur. Bu bellek tipi, klasik ve aletli şartlanma gibi karşılaştırmalı belleklerin yanı sıra sensitizasyon ve habitüasyon gibi karşılaştırmazsız biçimleri de içermektedir.

İmplicit bellek duysal ve motor beceriler öğrenilirken etkin olan serebellum, striatum, amigdala gibi bölgelerde lokalize olmaktadır (Polster ve ark., 1991; Squire, 1992). Bunlardan dolayı implicit bellek basit refleks sistemlerine sahip canlılarda inceleyebilirken, eksplisit bellek en iyi memelilerde incelenmektedir.

Yüksek omurgasızlardaki implicit belleğin basit formları ve memelilerde daha karmaşık şekilde olan eksplisit bellek biçimleri üzerine yapılan son araştırmalar, sinaptik bağlantıların gücündeki ve yapısındaki değişikliklerin bu belleğin depolama biçimlerinin altında yatan mekanizma olduğunu göstermektedir. Hem eksplisit hem de implicit bellek tiplerinin her ikisinde de iki genel depolama mekanizması tanımlanmıştır: dakikalar süren kısa süreli bellek ve günler, haftalar veya daha uzun süreler alan uzun süreli bellek. Bu zamansal ayırım sinaptik plastisite için gerekli olan özel moleküler gereksinimler ile açıklanabilmektedir. Kısa süreli bellekte çeşitli kinazların aracılık ettiği, önceden var olan proteinlerin kovalent modifikasyonları veya var olan bu bağların etkinliğindeki değişiklikler olmaktadır. Buna karşılık, uzun süreli değişiklikler *de novo* gen ekspresyonu, yeni haberci RNA (mRNA) ve proteinlerin sentezi gereklidir. Genel olarak uzun süreli formlar yeni sinaptik bağlantıların büyümesi ile ilişkili olan gruptur.

Neokorteks tarafından kontrol edilen **priming** (hazırlama) bellek, önceki karşılaşma ile kelimelerin ve cisimlerin tanınmasının kolaylaşmasıdır. Beceri ve alışkanlıkların belleği olan **prosedürel** belleğin bir bölümü erken yaşlarda, kalanları ise yaşam boyu kazanılmaktadır. Striatum tarafından düzenlenen bu bellekte, motor öğrenme ile bilinçli olmaksızın basit ve karmaşık bilgiler birleştirilmektedir. Amigdala ve serebellumun görev aldığı **asosiyatif** belleğin temelinde iki uyaran arasındaki ilişkinin öğrenildiği klasik şartlanma bulunmaktadır. Bir uyarana verilen yanıtın değişmesi **non-asosiyatif** bellektir. Habitüasyon ve sensitizasyondan oluşan bu bellek tipinde uyarının tekrarlayan uygulaması yanıtta azalmaya neden oluyorsa habitüasyon; artmaya yol açıyorsa sensitizasyon olarak isimlendirilmektedir (Şekil 2.3).

2.1.3. Sinaptik Plastisite

100 milyardan fazla nörona sahip yetişkin insan beyni bilgi işleme, depolama ve geri çağırma gibi fonksiyonları üstlenebilen büyük bir sinirsel ağdan oluşmaktadır. Nöronlar vücuttaki birçok hücreden farklı olarak polarize olabilme yeteneğine sahiptir ve bu

özellik beyinde farklı bölgelerin çeşitli fonksiyonları yerine getirmesini sağlamaktadır. Birbirine sinapslar aracılığı ile bağlı olan nöronların, sinapslar yardımı ile bilgi depolamaya aracılık eden birçok eylemi gerçekleştirdiği bilinmektedir. Bu bağlantılar elektriksel ve kimyasal sinapslar aracılığı ile olmaktadır. Kimyasal sinapslardan salgılanan nörotransmitterler eksitator veya inhibitör özellik göstermektedir.

Omurgalı merkezi sinir sisteminde (MSS), eksitator iletime glutamat ve iyonotrofik glutamat reseptörleri aracılık etmektedir (Traynelis ve ark., 2010). Aktivasyon üzerine iyonotropik glutamat reseptörleri moleküler kompozisyonlarına bağlı olarak çeşitli iyonlara karşı seçici bir şekilde açılmaktadır. AMPA reseptörleri hızlı eksitator iletimi gerçekleştirirken NMDA reseptörleri uzun dönem sinaptik plastisitenin gerçekleşmesinde görev alır.

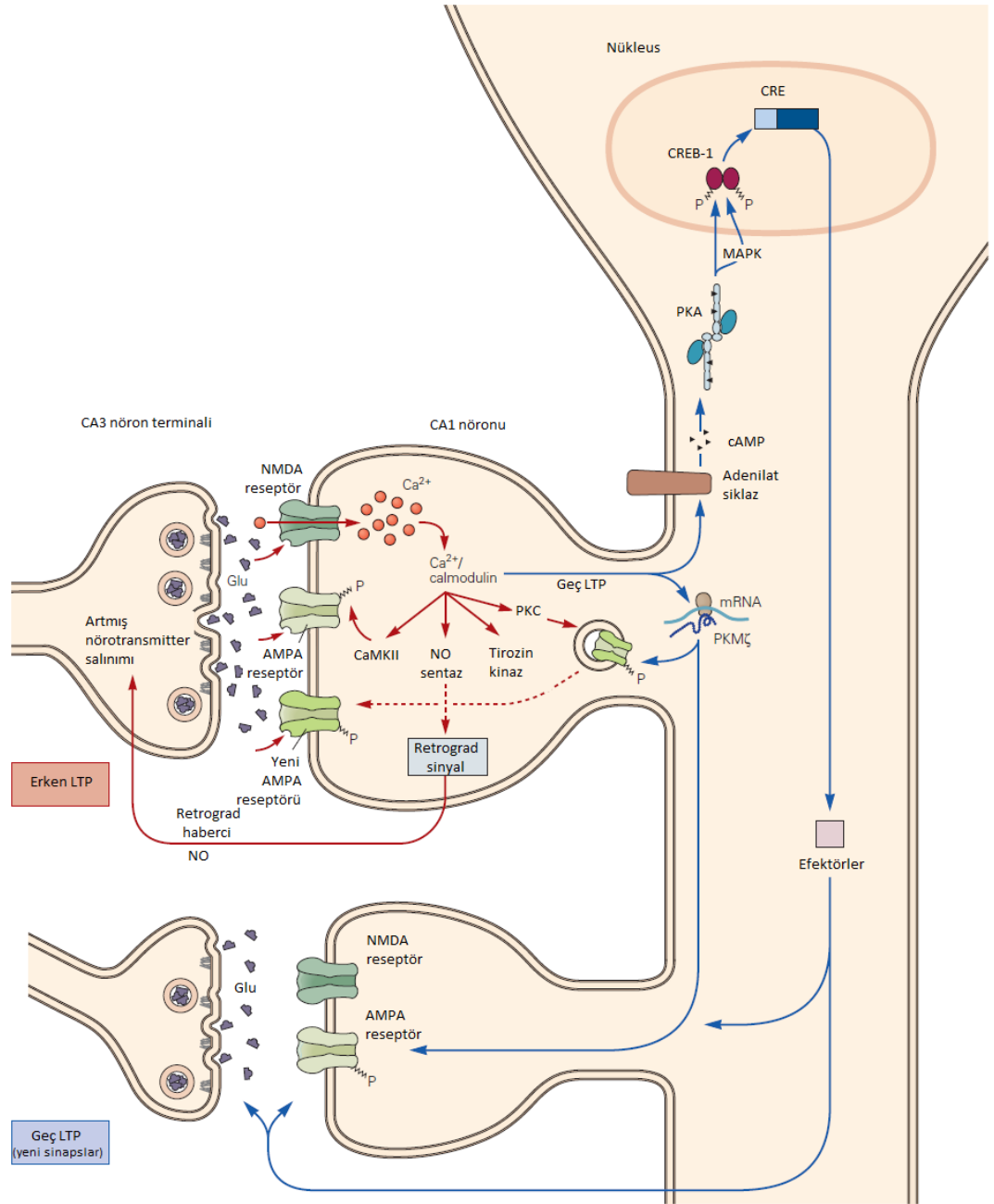
Sinaptik plastisite kullanılmaya veya kullanılmamaya yanıt olarak sinaptik güçteki değişikliği ifade etmektedir. Sinaptik etkinlikteki uzun vadeli değişikliklere genellikle sinaptaki yapısal ve fonksiyonel değişiklikler eşlik etmektedir. Sinapslardaki plastisite, presinaptik düzeyde nörotransmitterlerin serbest kalımını değiştirirken postsinaptik düzeyde nörotransmitter reseptörlerinin özelliklerini, tipini veya sayısını değiştirerek hücre içi sinyal mekanizmalarını aktive edebilmektedir. LTP, sinaptik bilgi depolama süreçlerinin aktivitesini yansıtan temel sinaptik plastisite biçimidir ve öğrenme ile hafızanın hücresel bağlantı basamağını oluşturmaktadır (Malenka, 2003; Lynch, 2004). LTP, keşfinden bu yana çeşitli beyin bölgelerinde ayrıntılı olarak incelenmiştir ve özellikle hipokampusta bu plastisitenin altında yatan moleküler mekanizmaların birçoğu bilinmektedir. Hipokampal ana hücre katmanlarının düzenli organizasyonu ve sinaptik plastisitenin bilgi depolama süreçleri ile ilgili bilgi vermesi nedeniyle memelilerde sinaptik iletimi incelemek için hipokampus bölgesi kullanılmaktadır.

2.1.4. LTP'nin Mekanizması

Sinaptik plastisite kavramı, 1949'da Hebb adlı araştırmacı tarafından, deneyimin bir devre içindeki bazı nöronal yolları destekleyen ve diğerlerini zayıflatan sinapsları değiştirebileceğini öne sürmesi ile ortaya çıkmıştır (Clark, 1950). Hebb'in teorisine göre birlikte ateşlenen hücrelerin birbirine bağlanacağı öngörülmekteydi.

LTP'nin laboratuvar ortamında tanımlanması Bliss ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiştir (Bliss ve Lomo, 1973). Perforant yolak üzerine verilen yüksek frekanslı uyaran, DG'nin granül hücreleri üzerine sinaptik aktarımın etkinliğinde artışa neden olduğu için, bellek oluşumunda LTP'nin oldukça önemli bir hücresel mekanizma olduğu düşünülmüştür.

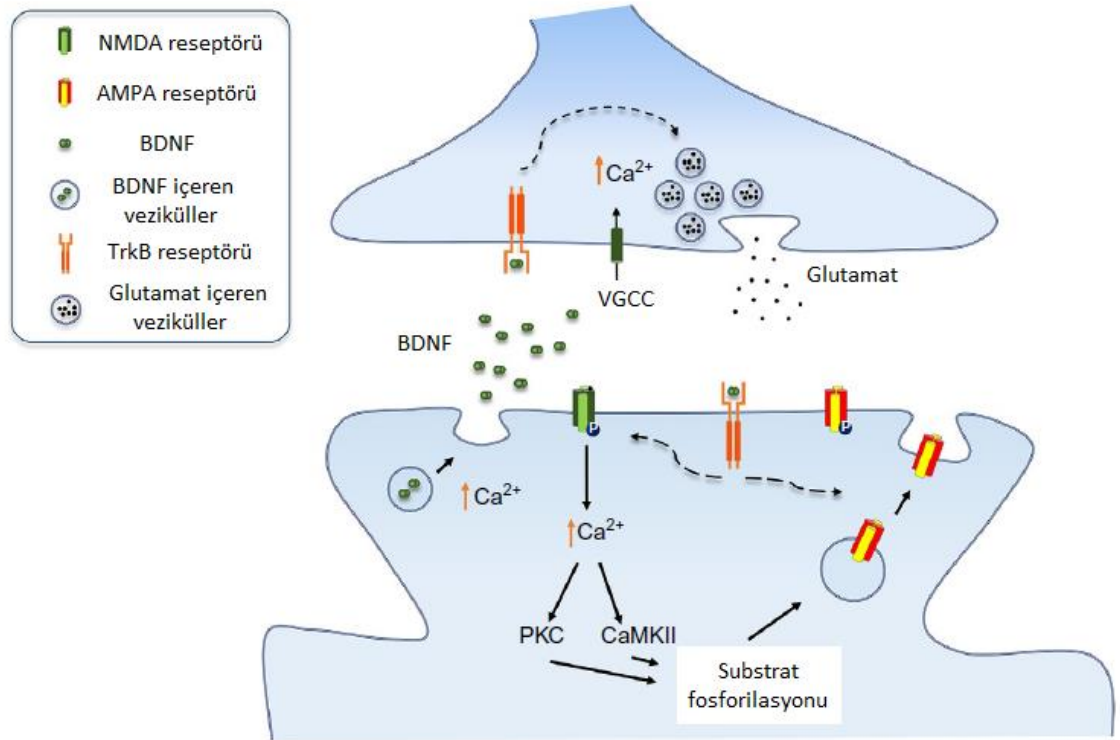
Hipokampüsteki LTP kısa dönem potansiyalizasyon, erken LTP (E-LTP) ve geç LTP (L-LTP) olmak üzere üç farklı ve sıralı faza ayrılmaktadır (Şekil 2.6). Kısa dönem potansiyalizasyon ve E-LTP geçicidir ve önceden var olan proteinlerin modifikasyonunu sağlarken L-LTP, protein sentezinde ve gen ekspresyonunda saatler, hatta günler süren değişikliğe neden olmaktadır (Kandel ve Schwartz, 2013).



Şekil 2.6. Kısa ve uzun dönem potansiyalizasyonun moleküler mekanizması. (Kandel ve Schwartz, 2013)'dan uyarlanarak Türkçe'leştirilmiştir. CRE: cAMP düzenleyici element, CREB-1: cAMP-cevap elementi bağlayıcı protein-1, MAPK: Mitojenler tarafından aktive edilen protein kinaz, PKA: Protein kinaz A, PKM ζ : Protein kinaz M zeta, NO: Nitrik oksit, PKC: Protein kinaz C, CaMKII: Ca²⁺/kalmolulin bağımlı kinaz II.

NMDA reseptörlerinin aktivasyonunun aracılık ettiği postsinaptik Ca²⁺ akımı E-LTP için gereklidir (Bliss ve Collingridge, 1993). NMDA reseptörlerinin açılması için

membran depolarizasyonunu takiben Mg^{2+} blokajının kalkması, reseptöre glutamat ve glisin (D-serin) bağlanması gerekmektedir. NMDAR aktivasyonu, Ca^{2+} 'un hücreye girmesine izin vermektedir ve hücre içi Ca^{2+} konsantrasyonundaki bu artış, Ca^{2+} /kalmodulin bağımlı protein kinaz II (CaMKII) ve PKC dahil olmak üzere E-LTP uyarılmasına aracılık eden bazı hücre içi enzimi aktive etmektedir (Sweatt, 1999) (Şekil 2). Bu enzimlerin sürekli aktivasyonu, E-LTP'nin korunması için de çok önemlidir (Bliss ve Collingridge, 1993; Lynch, 2004). Sürekli olarak aktif PKC ve CaMKII formlarının üretilmesi, hücre içi sinyal yollarını fosforile etmektedir. Bu olay reseptörlerin postsinaptik membrana yerleşiminin artmasına ve aktivitelerinde artışa neden olmaktadır (Şekil 2.7) (Derkach ve ark., 2007; D. T. Lin ve ark., 2009). Yapılan çalışmalarda E-LTP'nin uyarıldığı koşullarda NMDAR'nın yüzey ekspresyonunun arttığı saptanmıştır (Grosshans ve ark., 2002).



Şekil 2.7. E-LTP sırasında eksitator sinapsların BDNF-aracılı düzenlenmesi. (Leal ve ark., 2017)'dan uyarlanarakTürkçe'leştirilmiştir. PKC: Protein kinaz C, VGCC: Voltaj kapılı Ca^{2+} kanalı, CaMKII: Ca^{2+} /kalmodulin bağımlı protein kinaz II.

Geçici özellik gösteren E-LTP'yi, dendritik bölmelerde protein sentezini ve transkripsiyonel aktiviteyi uyararak L-LTP izlemektedir (Bramham ve Wells, 2007). PKA,

CaMKII ve Erk1/2 gibi sinyal molekülleri CREB gibi transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonunu sağlamaktadır (Adams ve Dudek, 2005). Bu faktörler, L-LTP için gerekli olan ve sinapslarda çeşitli yapısal ve fonksiyonel değişikliklere aracılık eden proteinlerin sentezini uyarmaktadır. Artmış uyarıcı sinaptik kuvvet, dendritik spinlerde yapısal değişiklikler olmasına neden olmaktadır. Spin sayısının ve uzunluğunun aktin aracılı artması, sinaptik etkinlikte uzun dönem değişiklikleri desteklemektedir (Bailey ve ark., 2015).

Var olan proteinlerin modifikasyonları ve sinaps trafiğinin düzenlendiği E-LTP’de *de novo* protein sentezi yapılmamaktadır (Malenka ve Bear, 2004). Yüksek frekanslı, tekrarlı uyarılar ile tetiklenen L-LTP’de ise mRNA üretimi ve sinapslarda yapısal değişiklikler gerçekleşmektedir (Kandel, 2001a). L-LTP uyarılması ile PKA, MAPK gibi hücre içi sinyal yolları aktive olurken; CREB, ETS transkripsiyon faktör-1 (Elk-1) gibi transkripsiyon faktörlerinin de ekspresyonu uyarılmaktadır. Aktive olan bu transkripsiyon faktörleri BDNF gibi sinaps yapısı ve fonksiyonunda değişikliklere aracılık eden genlerin düzeyinin artmasını sağlamaktadır (Shaywitz ve Greenberg, 1999).

BDNF hipokampal LTP ve öğrenmede önemli bir rol oynamaktadır. Bu nörotrofin;

- LTP’nin stabil bir şekilde sürdürülmesini ve uyarılmasını düzenlemektedir.
- Nörotransmitter salınımındaki değişiklikleri uyarmaktadır.
- Postsinaptik glutamat reseptörlerini modüle etmektedir.
- Transkripsiyonu aktive ederek dendritik spinlerdeki yapısal plastisiteyi düzenlemektedir (Bramham ve Messaoudi, 2005; Waterhouse ve Xu, 2009).

BDNF ve Nörotrofin Ailesi Reseptörleri

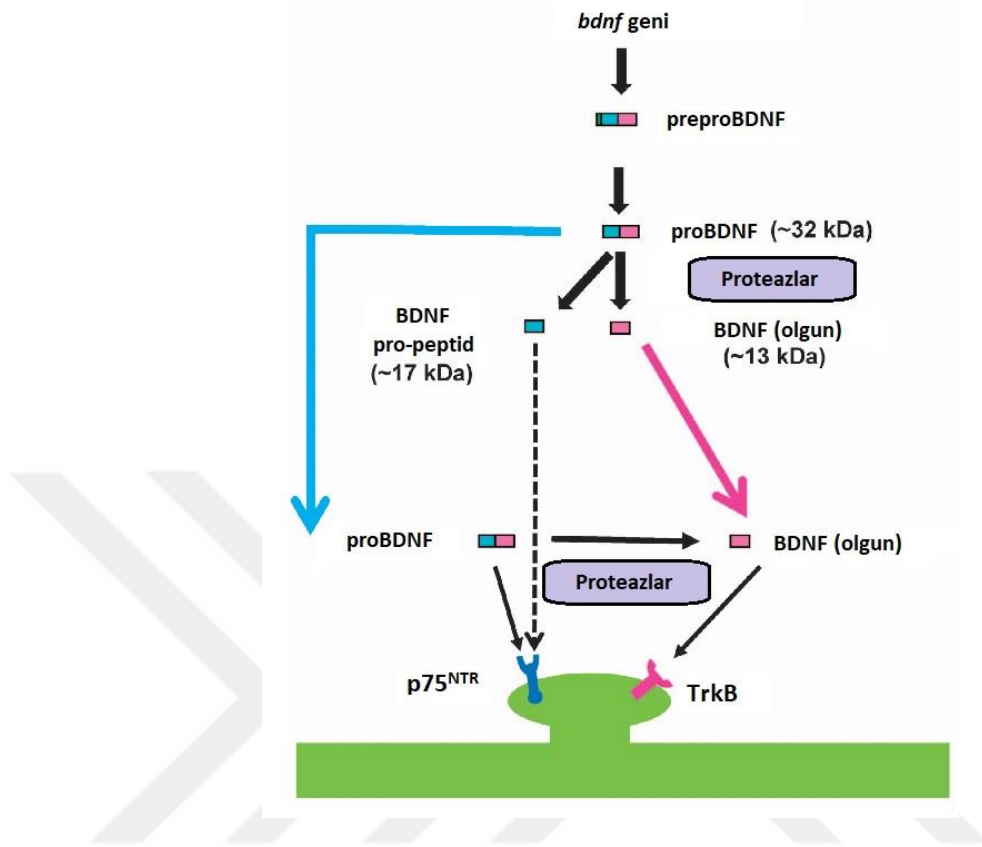
1950’li yıllarda keşfedilen sinir büyüme faktörü (NGF), gelişim sırasında duysal ve sempatik nöronların sağ kalımını ve büyümesini sağlayan ilk nörotrofin olarak kayıtlara geçmiştir (Cohen ve ark., 1954). Nörotrofin ailesinin kuruluşu, domuz beyninden saflaştırılan BDNF’nin duysal nöronlarda da bulunması ve benzer aktiviteler göstermesinin saptanmasına dayanmaktadır (Barde ve ark., 1982). Bu tarihten sonra

nörotrofin 3 (NT3) ve nörotrofin 4 (NT4) adında iki faktör daha bulunmuştur (Lewin ve Barde, 1996).

Nörotrofinlerin fizyolojik cevapları membrana bağlı iki farklı reseptör tipinin aktivasyonu aracılığı ile olmaktadır. Nörotrofinler $p75^{NTR}$ ve tropomiyozin ilişkili kinaz (Trk) reseptörlerine bağlanarak hücrede çeşitli fizyolojik reaksiyonları tetiklemektedir. NGF'ler TrkA, BDNF ve NT4 TrkB reseptörlerine ve NT3 TrkC reseptörlerine bağlanmaktadır (Chao, 2003).

BDNF Sentezi ve Salınması

Nöronal aktiviteye bağlı olarak düzenlenen BDNF protein üretimi ve salgılanması, *bdnf* adlı genin ekspresyonunun kontrolü ile mümkün olmaktadır. BDNF ve diğer nörotrofinler, pre-pro-nörotrofinler olarak endoplazmik retikulumda sentezlenmektedir. Pre-pro BDNF'nin olgun hale dönüştürülebilmesi için sinyal peptidinin ayrılması ve proBDNF haline gelmesi gerekmektedir (Şekil 2.8). Yetişkin fare hipokampusu üzerinde yapılan araştırmalarda, eksitatör presinaptik terminallerdeki yoğun veziküllerin içerisinde prekürsör ve olgun BDNF formlarının birlikte bulunduğu tespit edilmiştir (Dieni ve ark., 2012). Diğer taraftan biyokimyasal çalışmalar proBDNF'nin özel bir proteaz (furin) ile Golgi'nin trans yüzünde kısmen parçalandığını veya sekretuar granüllerdeki pro-protein konvertaz 1/3 enzimi aracılığıyla parçalandığını göstermiştir (Seidah ve ark., 1996; Mowla ve ark., 2001).



Şekil 2.8. BDNF ve proBDNF oluşumu. Şekil (B. Yang ve ark., 2017)'dan alınarak Türkçeleştirilmiştir.

BDNF, mRNA'sının dendritler boyunca taşınması ile lokal olarak sinapslarda sentezlenir ve yüksek yoğunlukla BDNF içeren veziküller presinaptik bölgeye ulaşmadan önce aksonlar boyunca anterograd olarak taşınmaktadır (Matsuda ve ark., 2009). BDNF veya proBDNF içeren veziküller aktiviteye bağlı olarak pre ve postsinaptik bölgelerden ekzositoza uğramaktadır. Glutamaterjik sinapsların aktivasyonunu takiben dendritik bölgelerden BDNF'nin serbest kalması, ancak NMDA reseptörleri aracılığı ile hücre içine Ca^{2+} girmesine veya postsinaptik voltaj kapılı Ca^{2+} kanallarının aktivasyonuna bağlıdır (Hartmann ve ark., 2001). Yapılan bir çalışmada ekstrasellüler BDNF'nin postsinaptik seviyede endositozla hücre içine alındığını ve bu nörotrofin havuzunun glutamat reseptörlerinin aktivasyonuna bağlı olarak nöronal ateşleme ile serbest kalabileceğini göstermektedir (Y. H. Wong ve ark., 2015). Ayrıca internalize edilen TrkB reseptörlerinin degradasyona yönlendirildiği ya da BDNF-bağımlı bir mekanizma ile plazma membranına tekrar lokalize edildiği de tespit edilmiştir (Huang ve Reichardt, 2003; Z. Y. Chen, Ieraci, ve ark., 2005).

BDNF aracılı sinyal iletimi, spesifik olarak TrkB reseptörü aracılığıyla gerçekleşmektedir. Ligand bağlanması ile TrkB reseptörünün hücre içi kinaz alanı dimerize olarak otofosforilasyona (Tyr 515 ve Tyr 816) uğramaktadır. SHC adaptor protein (Shc) ve büyüme faktörü reseptör bağlayıcı protein 2 (GRB2) gibi adaptör moleküllerin yerleşim yerleri şekillenince hücre içerisindeki çeşitli sinyal yolları aktive olmaktadır. Bu sinyal yolları, MAPK, fosfolipaz C γ ve PI3K/Akt yollarıdır (Blum ve ark., 1999; Mizuno ve ark., 2003). *Trkb* geninin eksikliği durumunda bellek formasyonunun bozulduğu tespit edilmiştir. Bu da TrkB sinyalinin bellek oluşumunda önemli bir role sahip olduğunu göstermektedir (Minichiello ve ark., 1999). Ras/MAPK yolağı, BDNF de dahil olmak üzere birçok büyüme faktörü ile aktive edilerek öğrenme ve bellek oluşumunda rol oynamaktadır. Bununla birlikte, sıçan hipokampus CA1 bölgesinde LTP sırasında ERK aktivitesinin arttığı da tespit edilmiştir (English ve Sweatt, 1996). MEK inhibitörü uygulaması ise hipokampal LTP'yi inhibe etmektedir (English ve Sweatt, 1997).

Tirozin kinaz sinyal kaskadı tarafından aktive edilen PI3K ve sinyal yolağında alt kademelerinde bulunan moleküller, sinaptik plastisitede oldukça önemlidir. PI3K aktive edici peptidin *in vitro*'da dendritik spin dinamiklerini düzenlediği ortaya çıkmıştır (Cuesto ve ark., 2011). PI3K inhibitörü LY294002 adlı molekülün intraserebroventriküler uygulanması ile dentat girusta LTP oluşumunu engellenmiştir (Horwood ve ark., 2006).

TrkB reseptörleri, hipokampusun piramidal ve granüler hücrelerinin sinir terminallerinde, aksonlarında ve dendritik spinlerinde tespit edilmiştir (Drake ve ark., 1999). Ayrıca, subsellüler fraksiyonlarda TrkB reseptörlerinin serebrokortikal nöronların dendritik spinlerinde bulunduğu saptanmıştır (Aoki ve ark., 2000). Biyotin işaretli antikor kullanılarak yapılan bir diğer çalışmada ise TrkB reseptörlerinin hipokampusteki glutamaterjik sinir terminallerinde ve hatta presinaptik aktif zonda da bulunabileceği ortaya konmuştur (Pereira ve ark., 2006a).

BDNF'nin Fizyolojik Özellikleri

Sinaptik plastisite, hücre yüzey reseptörlerinden gelen sinyaller ile aktin hücre iskeletinin yeniden modellenmesi, gen transkripsiyonu ve protein sentezi uyarılması ile tetiklenmektedir. BDNF sinaptik plastisitenin bilinen en iyi düzenleyicisidir. Hipokampüste nöronal aktiviteye bağlı olarak BDNF ekspresyonu ve salgılanması artmaktadır (Zafra ve ark., 1990). Bununla birlikte sıçan hipokampusünde BDNF mRNA seviyesi, uzaysal öğrenmeyi gösteren Morris su tankı testinin denemeleri sırasında anlamlı şekilde artış göstermektedir (Mizuno ve ark., 2000). Sinaptik plastisitede BDNF'nin etkisini anlamak için oluşturulan BDNF knockout farelerde, öğrenme ve bellek formasyonunun bozulduğu, fakat dışarıdan rekombinant BDNF protein verilmesi ile LTP ve bazal sinaptik iletimin düzeldiği saptanmıştır (Patterson ve ark., 1996; Linnarsson ve ark., 1997). Ek olarak antikör veya antisense oligonükleotitler kullanılarak BDNF'nin bloke edilmesi uzaysal hafızayı, kısa ve uzun süreli belleği bozmuştur (Alonso ve ark., 2002).

BDNF'nin bağlanarak hücre içi sinyal kaskadını aktive ettiği TrkB reseptörünün aktivasyonu engellendiğinde, hipokampal CA1 sinapslarında teta dalgası ile ortaya çıkan LTP'nin azaldığı bulunmuştur (Figurov ve ark., 1996). Yapılan bir diğer çalışmada, BDNF ve diğer TrkB ligandlarının hipokampüste L-LTP oluşması için gerekli olduğunu ortaya koymuştur (Korte ve ark., 1995). Yine anestezi altındaki sıçanlara intrahipokampal uygulanan BDNF, medial perforant yolak ve dentat granül hücreleri arasındaki sinaptik iletimi uzun süreli olarak uyarmıştır (Messaoudi ve ark., 1998). BDNF'nin kritik rolünün anlaşılması için oluşturulan *trkB* ön beyin-spesifik knockout farelerde CA3-CA1 hipokampal sinapslarındaki LTP'nin bozulduğu saptanmıştır (Minichiello ve ark., 1999).

Sinaptik plastisitede BDNF'nin postsinaptik fonksiyonu glutamat reseptörleri üzerinedir. Hipokampal nöronal kültürleri ve kesitlerinde BDNF'nin AMPA reseptörünün sinaptik dağılımı ve trafiğini arttırdığı tespit edilmiştir (Caldeira ve ark., 2007) (Şekil 2.9). Bununla birlikte, BDNF'nin hipokampusteki nöronlarda sinaptik iletimi düzenlediği, NMDA reseptör trafiğini, reseptörün açık kalmasını, fosforilasyonunu ve glutamat

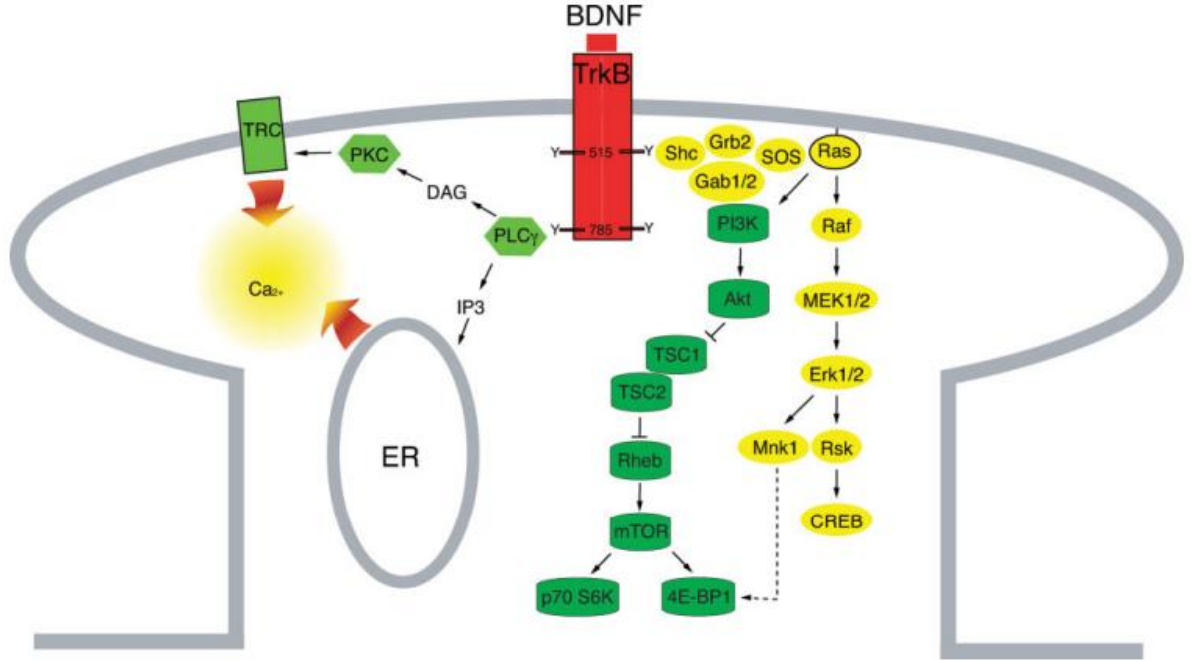
reseptör trafğini modüle ettiği bulunmuştur (Levine ve ark., 1998; Caldeira ve ark., 2007).

LTP oluşumuna ve sürdürülebilirliğine ek olarak BDNF aracılığı ile sinapslarda nöronal aktiviteye bağlı olarak gerçekleşen yapısal değişiklikler, dendrit sayısı ve hacminde artışa neden olmaktadır (Kasai ve ark., 2010). Gelişim esnasındaki nöronlarda BDNF, nörit dallanması ve büyümesine neden olurken, olgun nöronlarda dendritik spinlerin uzunluğunu ve morfolojisini düzenlemektedir (Ji ve ark., 2010). Ekzojen verilen BDNF'nin CA1 piramidal nöronlarda MAPK/ERK yolları aracılığı ile dendritik spin yoğunluğunu arttırdığını, ayrıca geçici reseptör potansiyel C (TRPC) kanalları ile hücre içine Ca^{2+} girişini uyararak membran depolarizasyonunu sürdürdüğu tespit edilmiştir (Alonso ve ark., 2004; Amaral ve Pozzo-Miller, 2007).

BDNF-TrkB Sinyal Yolağının Düzenlenmesi

Bir tirozin kinaz reseptörü olan TrkB, BDNF bağlandığında çapraz tirozin fosforilasyonuna uğrayarak homodimer haline gelmektedir. Aktive olan hücre içi Trk domainleri aracılıyla aşığıdaki sinyal yolları aktive olmaktadır:

- Mitojenler Tarafından Aktive Edilen Protein Kinaz (MAPK)
- Fosfatidilinozitol 3-kinaz (PI3K)
- Fosfolipaz C γ (PLC γ)



Şekil 2.9. BDNF ve aktive ettiği hücre içi sinyal yolları. Şekil, (Yoshii ve Constantine-Paton, 2007)'dan alınmıştır. TRC: Geçici reseptör potansiyel-kanonik kanalı, IP3: Inositol 1,4,5-trifosfat, Rsk: Ribozomal protein S6 kinaz, Mnk1: MAPK ile etkileşen serin/treonin kinaz 1, mTOR: Rapamisin protein kompleksinin memeli hedefi, TSC1: Tüberoskleroz kompleksi 1, TSC2: Tüberoskleroz kompleksi 2, ER: Endoplazmik retikulum.

a) Mitojenler Tarafından Aktive Edilen Protein Kinaz (MAPK) Yolağı

BDNF bağlanmasını takiben 515 pozisyonundan fosforillenen tirozin, Shc bölgesini fosforilleyerek Grb2 adaptör proteini ile etkileşime girmektedir. Grb2 ise guanin nükleotit değişim faktörü Sos'u aktive ederek Ras proteininden guanin di fosfat (GDP) molekülünü ayırır ve yerine guanin tri fosfat (GTP) bağlamaktadır. Aktive olan Ras, alt kaskadında bulunan Raf/MEK/Erk yolağını uyararak CREB gibi transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonunu uyarmaktadır (Shaywitz ve Greenberg, 1999). MAPK/Erk yolağı ayrıca sinaptik plastisitede önemli olan ökaryotik başlatıcı faktör 4E (eIF4E), 4E-bağlanma proteini-1 (4E-BP1) ve ribozomal protein S6 gibi proteinlerin üretimini de sağlayabilmektedir (Kelleher ve ark., 2004). Dolayısıyla yapılan araştırmalar, protein sentezinin gerçekleştiği uzun dönem plastisiteye bağlı değişimlerde MAPK/Erk yolağının etkili olduğunu göstermektedir.

b) Fosfatidilinozitol 3-kinaz (PI3K)

TrkB reseptörünün BDNF ile bağlanması ile uyarılan Shc alt birimi, Ras ve Grb2 proteinleri aracılığı ile PI3K yolağını aktive edebilmektedir. PI3K proteininin aktivasyonu ile plazma membranının iç katmanındaki inositol fosfolipidlerinin kompozisyonu değişmektedir. Bu olay ile Akt plazma membranına transloke olur ve protein translasyonu ile hücre sağ kalımı ile ilişkili yolları uyarmaktadır. BDNF/TrkB/PI3K/Akt yollarının aktive olması ile protein sentezinin majör bir düzenleyicisi olan mTOR'un translasyonu tetiklenmektedir (Sarbasov ve ark., 2005). Aktive olan mTOR proteini mRNA translasyonunda görev alan p70S6 ve 4E-BP1 gibi proteinlerin fosforlanmasını sağlamaktadır. Bununla birlikte yapılan çalışmalar, PI3K-Akt yolağının sinaptik proteinlerin trafiğinde düzenleyici bir görev gösterdiğini ispatlamıştır (Yoshii ve ark., 2011). Bu yolak sinaptik proteinlerin transportu ve translasyonu aracılığıyla sinaptik plastisitenin uzun dönem sürdürülmesine neden olmaktadır (Şekil 2.9).

c) Fosfolipaz C γ (PLC γ)

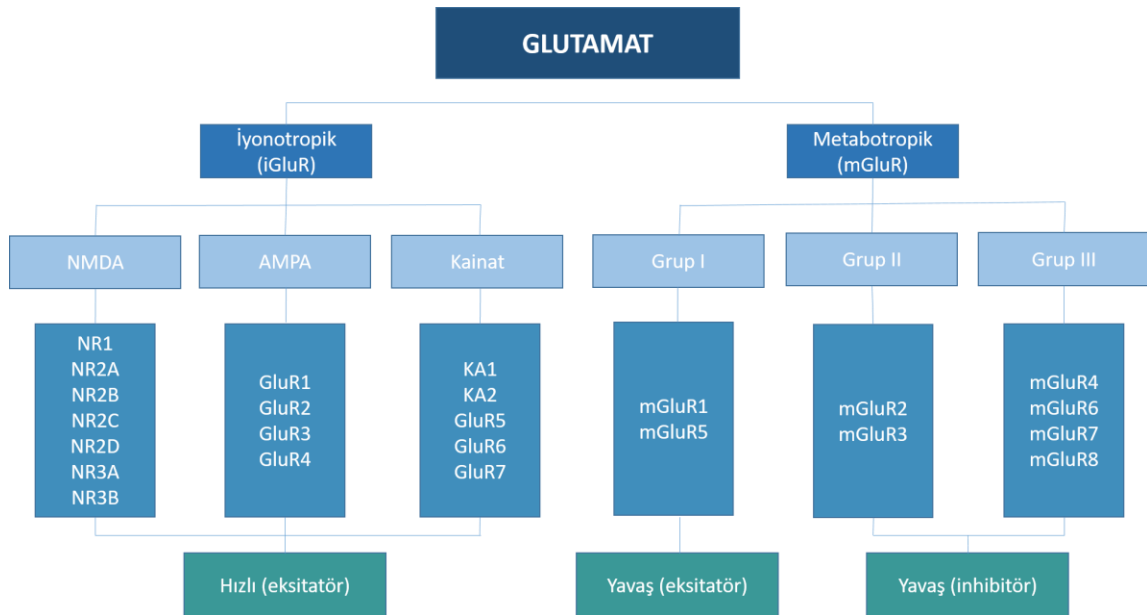
TrkB'nin kinaz aktivasyon bölgesinin dışında iki tirozin fosforilasyon rezidüsü bulunmaktadır. 785 pozisyonundan fosforillenen tirozin PLC γ 'yi aktive eder ve PLC γ fosfatidilinozitol 4,5-bifosfatı hidrolizleyerek diaçilgliserol (DAG) ve inozitol 1, 4, 5-trifosfat (IP3) oluşturmaktadır (Huang ve Reichardt, 2003). DAG PKC'yi aktive eder ve IP3 hücre içi Ca²⁺ depolarından Ca²⁺ serbest kalmasına neden olmaktadır. Gelişim aşamasındaki hipokampal nöronlarda BDNF'nin uygulanması postsinaptik bölgede hızlı bir kalsiyum geçişine neden olmaktadır (Lang ve ark., 2007). BDNF'nin reseptörüne bağlanması ile artan hücre içi Ca²⁺ ve DAG, plazma membranındaki TRPC3/6 kanallarını aktive ederek sinapslarda ve büyüme bölgelerinde BDNF-aracılı Ca²⁺ artışına katkıda bulunmaktadır (Y. Li ve ark., 2005).

2.1.5. Sinaptik Plastisitede NMDA Reseptörlerinin Fonksiyonu

Esansiyel olmayan bir amino asit olan glutamat, merkezi ve periferel sinir sisteminde görev alan temel eksitatör nörotransmitterdir (Ferraguti ve ark., 2008). Glutamat reseptörleri iyonotropik ve metabotropik olmak üzere iki ana gruba ayrılmaktadır. Metabotropik glutamat reseptörleri G-protein kapılı reseptörlerdir ve sinyal iletim

yolakları ile farmakolojik özelliklerine göre üç grupta kategorize edilmektedir. mGluR1 ve mGluR5'i içeren Grup I metabotropik reseptörler, uyarıcı etkilidir ve bunu fosfolipaz C ve ikincil haberciler aracılı ile yapmaktadır. Grup II metabotropik reseptörleri, mGluR2 ve mGluR3'ü içermekte iken; Grup III metabotropik reseptörler mGluR4, mGluR6, mGluR7 ve mGluR8'den oluşmaktadır. Grup II ve Grup III reseptörlerinin sekans benzerliği %70'i bulmaktadır (Conn ve Pin, 1997).

Nöron plastisitesi ve sinaps yapısındaki uzun dönem değişiklikleri içeren nöron aktivitesinden sorumlu olan katyon-geçirgen iyon kanalı reseptörleri AMPA reseptörleri, kainat reseptörleri ve NMDA reseptörleri olmak üzere üçe ayrılmaktadır ve her biri hızlı uyarıcı nörotransmisyona neden olmaktadır (Dingledine ve ark., 1999). Bütün iyonotropik glutamat reseptörleri selektif olmayan katyon kanallarıdır. Na⁺, K⁺ gibi tek değerlikli iyonlara ek olarak bazı durumlarda az miktarda Ca²⁺ iyonunu da geçirebilmektedir. AMPA, kainat ve NMDA reseptörlerinin aktivasyonu eksitator postsinaptik cevap oluşmasına neden olmaktadır. Diğer ligand kapılı kanallar gibi bu reseptörler de birçok protein alt biriminin birleşmesi ile izoformlar oluşturmaktadır (Şekil 2.10).



Şekil 2.10. Glutamat reseptörleri.

NMDA reseptörleri, MSS'deki sinaptik fonksiyonun düzenlenmesinde çok önemli olan glutamat kapılı iyon kanallarıdır. Bu reseptörlerin NR1, NR2 ve NR3 alt birimleri endoplazmik retikulumda heteromerik bir şekilde birleşerek farklı fizyolojik ve farmakolojik özellikte NMDAR oluşmasını sağlamaktadır. Her NMDAR alt birimi geniş bir amino (N) terminal içeren ekstrasellüler bölge, por şekillendiren bir ilmek bölgesi ve hücre içi karboksil (C) terminalinin bulunduğu bölgeyi içermektedir. NMDA reseptörleri Ca^{2+} iyonuna oldukça geçirgindir ve bu reseptörler aracılığı ile hücre içine giren Ca^{2+} sinaptogenez, sinaptik yeniden modellenme ve LTP gibi sinaptik etkinliğin uzun vadede değiştirildiği birçok süreci düzenlemektedir (Collingridge ve ark., 2004). NR2 alt birimi NMDA reseptörlerinin biyofiziksel ve farmakolojik özelliklerinin çoğunu belirlemektedir. Ayrıca NMDA reseptörü montajını, hücre içi sinyalizasyonu, reseptör trafiğini ve sinaptik hedefini düzenlemektedir (Collingridge ve ark., 2004).

NR2A alt birimi NR2B alt birimine göre glutamat için daha düşük afinite, belirgin şekilde daha hızlı bir kinetiğe ve daha büyük bir kanal açıklığına sahiptir. NR2C ve NR2D altbirimleri düşük iletkenliğe sahipken Mg^{2+} blokajına karşı hassasiyeti düşüktür. NR3 alt biriminin ise yüzeyde ekspresyonu oldukça az ve Ca^{2+} geçirgenliği düşüktür (Cull-Candy ve Leszkiewicz, 2004).

NMDA reseptörü alt birimi kompozisyonuna göre reseptörün iletkenliği, Mg^{2+} blokajı ve Ca^{2+} geçirgenliği değişiklik göstermektedir. NR2A/NR2B içeren reseptörlerin diğer reseptörlere kıyasla daha yüksek iletkenliğe (~50 pikosiemens (pS)) sahip olduğu, Ca^{2+} geçirgenliğinin fazla olduğu (pCa/pCs: ~7.5) ve Mg^{2+} blokajının yüksek duyarlılık gerektirdiği (İnhibitör konsantrasyon (IC50): 15 μ M, -70 mV'ta) bilinmektedir (Paoletti, 2011).

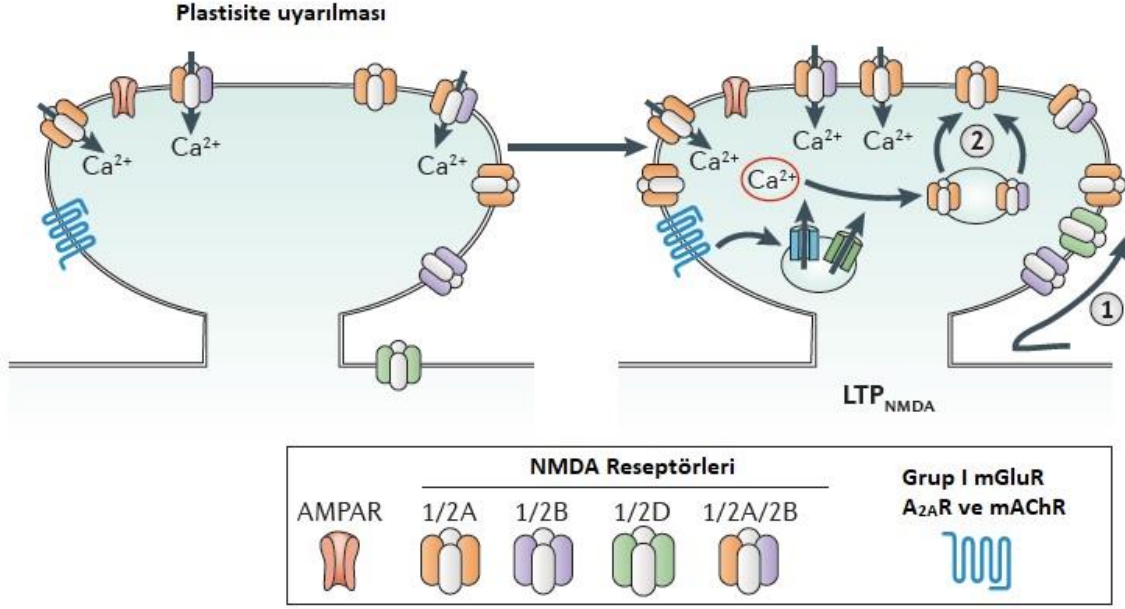
Merkezi sinir sisteminde bulunan NMDA reseptörlerinin çoğu NR1 ve NR2 altbirimlerinin heteromerik şekilde birleşiminden oluşmaktadır Sinaptik NMDA reseptörleri fiziksel olarak hücre içi sinyal proteinleri, fosfatazlar, kinaz reseptörleri ve tip I metabotropik glutamat reseptörleri (mGluR) ile bağlanan adaptör ve sinaptik yapı proteinlerini organize eden postsinaptik yoğunluklar (PSD) ile birlikte lokalize olmaktadır. mGluR'ler sinaptik plastisite, uyarılabilirlik ve nöronal bağlantıda rol oynayan G protein bağlı reseptörlerdir (Conn ve Pin, 1997). 95 kDa'luk sinapsla ilişkili

protein-95 (PSD-95) ve sinapsla ilişkili protein-102 (SAP-102) sinaptik yapı içerisinde bulunan proteinlerdir ve modüler bir PDZ bağlanma bölgesi içermektedir. Bu PDZ içeren protein NMDA reseptörlerini sabitleme fonksiyonunun yanı sıra reseptörlerin hücre içi trafiğini ve dağılımını da düzenlemektedir (Kim ve Sheng, 2004).

Olgun Sinapslarda NMDAR Plastisitesi

Uzun süreli plastisiteden AMPA reseptörü ile birlikte NMDA reseptörlerinin de katkıda bulunduğu bilinmektedir. Aktiviteye bağlı olarak dinamik olarak düzenlenen NMDA reseptörlerinin sayısı değişiklik gösterse de olgun sinapslarda reseptör alt birim kompozisyonunun değişim gösterdiği düşünülmektedir. Hipokampal kesitlerde yapılan çalışmalar AMPA reseptörleri aracılı ile oluşan LTP'nin aynı zamanda NMDA reseptörü aracılı LTP'yi de aktive ettiğini göstermiştir (Bashir ve ark., 1991). NMDA reseptörü aracılı LTP uyarılması daha güçlü bir uyarılma profili gerektirmektedir ve genel olarak AMPA reseptörü aracılı LTP'ye göre daha yavaş gelişmektedir. Bunlara ek olarak, LTP oluşumunda AMPA ve NMDA reseptörlerinin hücre içi ve yüzey hareketliliğinin farklılık gösterdiği tespit edilmiştir (Lau ve Zukin, 2007).

Mossy lifler-CA3 sinapslarında, substantia nigra ve ventral tegmental alan (VTA)'da bulunan dopaminerjik nöronların glutamaterjik sinapslarında kısa sinaptik patlamalar, AMPA reseptöründe değişiklik olmaksızın NMDA reseptörü aracılı LTP artışına neden olmaktadır. NMDA reseptörü ile hücre içine alınan Ca^{2+} veya grup I metabotropik glutamat reseptörü, adenosin 2A reseptörleri ($A_{2A}R$) ve muskarinik asetilkolin reseptörleri (mAChR) aracılığı ile hücre içi depolardan serbest bırakılan Ca^{2+} , yeni NMDA reseptörü içeren veziküllerin membrana lokalizasyonunu tetiklemektedir. NMDA reseptörü ekzositozuna ek olarak reseptörlerin lateral hareketi ve reseptör kompozisyonunun düzenlenmesi gibi uzun süreli değişiklikler de Mossy lifleri ve CA3 sinapslarında gerçekleşmektedir (Hunt ve Castillo, 2012) (Şekil 2.11). Perforant yolak-dentat girus sinapslarında NMDA reseptörü aracılı LTP'de NR2D içeren ekstrasinaptik reseptörlerin sinaptik bölgeye difüzyonu ile reseptör alt birim kompozisyonu değişimi mümkün olmaktadır (Harney ve ark., 2008). CA1 bölgesindeki sinapslarda ise NMDA reseptörü aracılı ile gerçekleşen LTP, sinaptik NR2A'nın miktarında artışa neden olmaktadır (Y. Peng ve ark., 2010).



Şekil 2.11. Olgun sinapsta NMDA reseptörü plastisitesi. (Paoletti ve ark., 2013)'dan alınarak Türkçeleştirilmiştir.

Korteksin piramidal hücrelerinde ve hipokampüste dominant olarak bulunan NMDA reseptörünün NR2A ve NR2B alt birimlerinin oranı, postnatal dönemde dinamik şekilde değişikliğe uğramaktadır (Monyer ve ark., 1994). Yetişkin beyninde miktarı azalan NR2B alt biriminin LTP'ye olan katkısının sorgulandığı bir çalışmada, sıçan hipokampusünün CA1 bölgesinde NR2B'nin en az NR2A alt birimi kadar LTP uyarılmasına katkı sağladığı saptanmıştır (Liu ve ark., 2004). Ön beyin ve hipokampüste NR2B alt birimini overeksprese eden transgenik sıçanlar ile yapılan deneylerde, uzaysal referans belleğini ölçen Morris Su Tankı testinde hayvanların hedef kadranda geçirdikleri sürenin kontrol grubuna göre oldukça fazla olduğu görülmüştür. T-maze testi ile uzaysal çalışma belleği ölçüldüğünde ise NR2B overeksprese eden sıçanların performansının anlamlı şekilde fazla olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca Schaffer kolaterali-CA1 yolağına uygulanan tek bir tetanik stimülasyon ile transgenik hayvanlarda LTP'nin tetiklendiği ve böylece NMDA reseptörü NR2B alt biriminin hipokampal sinaptik iletim ve plastisite üzerine etkisi olduğu saptanmıştır (D. Wang, Cui, ve ark., 2009). Tüm bunlara ek olarak NR2B knockout veya NR2B alt birimi C-terminal kısmı kesilmiş olan hayvanların doğar doğmaz öldüğü bilinmektedir (Sprengel ve ark., 1998).

NR1/NR2B alt birimleri antagonistinin sıçanlara verildiği bir çalışmada Morris Su tankı testinde uzaysal hafızada herhangi bir değişim olmadığı saptanmıştır (Guscott ve ark., 2003).

Perkinton ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, NMDA reseptör stimülasyonunun Erk1/2 ve Akt sinyal yollarını uyardığı ve hedef CREB molekülünün fosforilasyonunu sağlayarak sinaptik plastisite ve nöronal gelişime katkıda bulunduğu ortaya konmuştur (Perkinton ve ark., 2002). Kültüre edilmiş kortikal nöronlarda Akt aktivitesinin NMDA reseptörleri aracılığıyla düzenlendiği bulunmuştur. Yüksek konsantrasyonlardaki NMDA'nın ise Akt ve Erk fosforilasyonunu düşürerek sinaptik plastisiteyi azaltmaktadır (Sutton ve Chandler, 2002). Tüm bu bulgular NMDA reseptörlerinin fizyolojik düzeyde aktivasyonunun hücre içerisinde Akt ve Erk1/2 yollarını aktive ederek nöronal sağkalıma neden olduğunu; fakat patolojik seviyede aktivasyonunun apoptotik süreçleri uyarabileceğini göstermektedir.

Sinaptik iletim ve plastisitede fonksiyon gösteren BDNF, NMDA reseptör ekspresyonunu modüle etmektedir. Kültüre edilmiş hipokampal nöronlara akut BDNF uygulaması NMDA reseptörü aktivitesi arttırmış ve NR1, NR2A, NR2B alt birimlerinin mRNA ve protein ekspresyonu yükselmiştir (Caldeira ve ark., 2007). Plazma membranındaki NMDA reseptörü alt birimlerinin kompozisyonunu değiştiren BDNF, aktivite bağımlı olarak da reseptör aktivitesini düzenlemektedir (Crozier ve ark., 2008).

Glikojen sentaz kinaz NMDA reseptörlerinin aktivitesini düzenleyen bir diğer hücre içi moleküldür. GSK3'ün farmakolojik inhibisyonu veya susturulması kortikal piramidal nöronlarda NMDA-reseptör aracılı sinaptik akımın uzun süreli bir şekilde azalmasına yol açmaktadır (P. Chen ve ark., 2007). GSK3'ün NMDA reseptörlerini düzenlemedeki rolü, PI3K/Akt yolağı inhibitörü Wortmanin kullanımının hipokampüste NR2A ve NR2B alt birimlerinin yüzey ekspresyonunu azaltması ile gösterilmiştir. Lityum ve SB216763 gibi GSK3 inhibitörlerinin de NMDAR ekspresyonlarını kontrol seviyelerine çektiği gösterilmiştir (L. Q. Zhu ve ark., 2007). Düşük GSK3 seviyelerinde AMPA ve NMDA reseptörünün NR2B alt birimlerini içeren klatriin kaplı veziküller endositoz ile hücre içerisine alınmaktadır. GSK3 bağımlı reseptör internalizasyonu GDI: Rab5 kompleksinin ayrılmasını gerektirmektedir. Tersine; yüksek GSK3 seviyelerinde NMDA

ve AMPA reseptörleri plazma membranında yüksek oranda eksprese edilir ve reseptör internalizasyonu engellenmektedir (Wildburger ve Laezza, 2012).

2.1.6. GSK3 β Sinyali

Glikojen sentaz kinaz 3, tüm memeli ve ökaryotlarda bulunan çok fonksiyonlu bir serin/treonin kinazdır (Grimes ve Jope, 2001b). Glikojenin sentezinde anahtar bir molekül olan GSK3'ün ismi, glikojen sentazı fosforile etmesinden ileri gelmektedir. GSK3 tarafından fosforlanan glikojen sentaz enzimi inaktive olmaktadır. Memelilerde iki farklı gen tarafından kodlanan, fakat yüksek sekans homolojisi gösteren GSK3, başlıca iki farklı tipe ayrılmaktadır: GSK3 α (51 kDa) ve GSK3 β (47 kDa). GSK3 protein sentezi, glikojen metabolizması, hücre mobilitesi, proliferasyon ve sağkalım gibi bir çok sinyal yolağının düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır (Luo, 2009). Birbirine oldukça yakın sekans homolojisi gösteren bu iki izoformun fonksiyonu ise birbirinden farklılık göstermektedir. Bu izoformlar arasında GSK3 β merkezi sinir sisteminde daha fazla eksprese olan ve daha çok çalışma yapılmış olandır. GSK3 β 'nın nöronal gelişimin erken dönemlerinde nöroenez, nöronal migrasyon, farklılaşma, sağkalım gibi bir çok erken dönem nöronal düzenlenmede rol oynamaktadır.

GSK3 β Aktivitesinin Düzenlenmesi

GSK3 β dinlenim durumunda aktif olan ve çeşitli eksternal sinyallere cevap olarak hızlı ve geçici bir inhibisyon sağlayan enzimdir (Grimes ve Jope, 2001b). GSK3 β 'nın aktivitesi bölge spesifik fosforilasyon ile düzenlenmektedir. GSK3 β 'nın tirozin 216 (Tyr216) pozisyonundan fosforillenmesi aktif olmasına neden olurken; serin 9 (Ser9) pozisyonundan fosforlanması GSK3 β aktivitesini inhibe etmektedir. Ser9 bölgesine fosfor eklenmesi en yaygın ve en önemli düzenleyici mekanizmadır. P70 S6 kinaz, Erk1/2, Akt, PKC ve PKA gibi kinazlar tarafından Ser9 pozisyonundan fosforile olabilmektedir (Grimes ve Jope, 2001b; Kaytor ve Orr, 2002). GSK3 β 'nın aktivitesini arttıran Tyr216 pozisyonundan fosforillenme hücre içi Ca²⁺ seviyesindeki değişiklikler ile veya bir Ca-bağımlı tirozin kinaz ile uyarılmaktadır (Hartigan ve Johnson, 1999; Lesort ve ark., 1999).

GSK3 β fosforillenme bölgesinden bağımsız bir şekilde, hücre içi lokalizasyonuna bağlı olarak da aktive olabilmektedir (Baltzis ve ark., 2007). GSK3 β 'nın substratı olan Tau

sitozolik iken diğ er substratları olan transkripsiyon faktörleri nüklear formdadır ve GSK3  da bu iki proteinin aktivitesini düzenleyebilmek için hem sitozolde hem de nükleusta bulunabilmektedir. Diehl ve arkadaşları hücre siklusunun S fazında nüklear GSK3 ’nın bir artış gösterdiğini bulmuştur (Diehl ve ark., 1998).

GSK3  40’tan fazla glikojen metabolizması, transkripsiyon, translasyon, hücre farklılaşması, proliferasyon, sitoskelet ve apoptosis ile ilişkili proteinin fonksiyonunu düzenlemektedir (Grimes ve Jope, 2001b; Manoukian ve Woodgett, 2002; Luo, 2009). Metabolik sinyal proteinlerinden bazıları; asetilCoA karboksilaz, amiloid prekürsör protein, siklik AMP-bağımlı protein kinaz, glikojen sentaz, insülin reseptör substrat-1 (IRS-1) ve pirüvat dehidrogenazdır. Mikrotübül-ilişkili protein 1B (MAP1B), nöronal hücre-adezyon molekülü (NCAM) ve dinamin-benzeri yapısal proteinlere ek olarak  -katenin, CREB, nüklear faktör kappa   (NF- B), glukokortikoid reseptör, aktive edilmiş T hücresi nüklear faktörü (NFAT) gibi transkripsiyon faktörlerinin fonksiyonunu da regüle etmektedir.

Nöronal Gelişimde GSK3 ’nın Rolü

GSK3  tüm dokularda yüksek seviyede eksprese olmakta iken merkezi sinir sisteminde de yaygın şekilde bulunduğu bilinmektedir (Woodgett, 1990). Özellikle gelişmekte olan beyinde nöronlar başta olmak üzere astrositlerde de eksprese olduğu bilinmektedir (Leroy ve Brion, 1999). Yapılan bir çalışmada embriyonik dönemin ilk 18 gününde sıçan beyinde GSK3  ekspresyonunun maksimum seviyeye ulaştığı, bunun yetişkinlik ile birlikte azaldığı bulunmuştur (Leroy ve Brion, 1999). Yetişkin beyinde dendritlerin proksimal kısmında ve perikaryada immunoreaktivite gösterdiği, embriyolojik dönemde ise özellikle akson boyunca bulunduğu tespit edilmiştir. Tüm bu bulgular GSK3 ’nın nöronal gelişimde önemli bir fonksiyona sahip olduğunu göstermektedir.

GSK3  gelişim gösteren beyinde n roblastlardan çok postmitotik nöronlarda eksprese olmaktadır (Leroy ve Brion, 1999). Özellikle mikrosefali durumunda aktif GSK3 ’nın nöronlarda overeksprese olduğu bulunmuştur (Spittaels ve ark., 2000). Bununla birlikte GSK3 ’nın inhibe olması ile *in vitro*’da cerebellar granüler nöron progenitörlerinin proliferasyonunun uyarıldığı; aktivasyonu ile de nöronal prekürsörlerin bölünmesinin baskılandığı tespit edilmiştir (Cui ve ark., 1998). GSK3 ’ n bir inhibitörü olan lityumun

in vitro yetişkin dentat girus-kökenli nöronal prekürsör hücrelerin proliferasyonunu arttırdığı gösterilmiştir (Boku ve ark., 2009). Diğer bir GSK3 β inhibitörü olan SB216763 hipokampal nörojenezi arttırmaktadır (Guo ve ark., 2012). Dolayısıyla araştırmacılar, GSK3 β 'nin beyin gelişiminde proliferasyonu ve nörojenezi negatif yönde düzenlediğini iddia etmektedir. Bununla birlikte aktivator protein-1 (AP-1) ve NF- κ B gibi mitojenik transkripsiyon faktörlerini inhibe ederek regülasyonda rol oynayan GSK3 β ; hücre siklusunda görev alan siklin D1 ve D2 gibi düzenleyici proteinlerin aktivitelerini de baskılamaktadır (Diehl ve ark., 1998; Ma ve ark., 2007; Luo, 2009).

Nöronal Farklılaşma

Nöronal polarizasyon ve nörit gelişimi önemli morfolojik değişiklikleri ve nöronal sitoskelet elemanlarının yeniden düzenlenmesini gerektiren bir süreçtir. Bu polarite ve aksonal büyümede birkaç MAP1B ve Tau gibi GSK3 β 'nin substratı olan proteinler önemli rol oynamaktadır (Barth ve ark., 2008). GSK3 β 'nin nöronlarda overekspresyonu, farede postnatal maturasyona ve nöronal farklılaşmaya neden olmaktadır (Spittaels ve ark., 2000; Spittaels ve ark., 2002). *İn vitro* çalışmalarda seçici inhibitörler ile GSK3 β inhibe edildiğinde nörit gelişiminin gerçekleştiği; zıt şekilde GSK3 β aktivasyonu ile nöronal kısalma gerçekleştiği bulunmuştur (Munoz-Montano ve ark., 1999; Orme ve ark., 2003). Ek olarak, fare kortikal nöronal hücre hattında GSK3 β 'nin inaktivasyonu leptin aracılı bir artış ile aksonal büyümeye neden olmuştur (Valerio ve ark., 2006). Bununla birlikte GSK3 β 'nin nöronal kök hücre farklılaşmasını negatif yönde düzenlediği bulunmuştur. SB216763 ile GSK3 β 'nin inhibe edilmesi yetişkin rat subventriküler zondan izole edilen nöronal kök hücrelerinin proliferasyonunu inhibe etmiştir (Maurer ve ark., 2007). Ayrıca spinal kord hasarı sonrasında aksonal rejenerasyon için GSK3 β inaktivasyonunun yararlı olduğunu düşünen araştırmacılar da mevcuttur (Dill ve ark., 2008).

Diğer taraftan, bazı araştırmalar ise GSK3 β aktivitesinin aksonal uzama ve nörit gelişimi için gerekli olduğunu göstermiştir. Örneğin; lityum veya diğer GSK3 β inhibitörlerinin rat hipokampal hücre kültüründe ve duysal nöronlarda akson uzama oranını ve nörit gelişimini azalttığı bulunmuştur (Takahashi ve ark., 1999; Owen ve Gordon-Weeks,

2003). Dolayısıyla GSK3 β 'nin nöronal farklılaşma ve aksonal uzama ile ilgili zıt iki etkisine dair çalışmalar literatürde bulunmaktadır.

GSK3 β ve Nöronal Sağkalım

GSK3 β , immatür nöronlar veya nöronal prekürsörlerin ölüm ve sağkalımında önemli bir rol oynamaktadır. Embriyonik fare beyninden elde edilen nöronal prekürsör hücrelerde GSK3 β 'nin aktivasyonu apoptotik sinyali uyarmaktadır (Eom ve ark., 2007). Fakat yapılan çalışmada GSK3 β inhibitörü olan lityum uygulaması immatür cerebellar granüler hücrelerin apoptozuna yol açmıştır; matür nöronlarda ise sağ kalımı sağlamıştır (D'Mello ve ark., 1994). Araştırmacılar GSK3 β 'nin oksidatif stres, endoplazmik retikulum stresi gibi çevresel ve hücrel çeşitli streslere cevap olarak nöronal ölümü uyardığını düşünmektedir (Bhat ve ark., 2000; L. Song ve ark., 2002; Takadera ve ark., 2007). GSK3 β , hücre içindeki pro-apoptotik proteinleri (Bax gibi) direkt fosforile ederek, bunların nöronal apoptozis sırasında mitokondriyal lokalizasyonunu sağlamaktadır (Linseman ve ark., 2004). Yapılan bir diğer çalışmada ise GSK3 β 'nin aktivasyonu NF- κ B aracılı nöronal sağkalımı antagonize ederek hücre yaşayabilirliğinin azalmasına neden olmaktadır (Sui ve ark., 2006).

GSK3 β merkezi sinir sisteminin gelişimi esnasında nöronlarda lokalize olan bir proteindir ve ekspresyonu gelişimsel olarak regüle edilmektedir ve immatür beyinde nörogenez, nöronal migrasyon, farklılaşma ve sağkalım gibi çeşitli gelişimsel olayı düzenlemektedir. Eksternal sinyallere oldukça hassas olan GSK3 β , nutrient deprivasyonu, oksidatif stres, ER stresi gibi çeşitli etkilerle aktivitesi değiştirebilmektedir. Bu yüzden GSK3 β , MSS gelişiminde esansiyel bir rol oynamanın yanı sıra çeşitli çevresel uyarıların neden olduğu hasarlara karşı nöronal cevabı belirlemekte görev almaktadır.

Sinaptik Plastisitede GSK3 β 'nin Rolü

GSK3'ün α ve β izoformlarının her ikisi de aynı hücrel kompartmanda bulunmamaktadır. GSK3 β mitokondri ve sinaptozomlarda lokalize olurken alfa izoformu buralarda bulunmamaktadır (Hoshi ve ark., 1995). Bu yüzden GSK3 β sinaptik plastisiteyi direkt olarak düzenlerken GSK3 α bunu ancak gen ekspresyonunu düzenleyerek, indirekt yoldan yapmaktadır (Beaulieu ve ark., 2011; Polter ve Li, 2011).

Aynı substratlara etki edebilirken (Tau gibi) farklı fonksiyon gösterebilmektedirler. GSK3 α knockout farelerde insülin duyarlılığı gelişirken GSK3 β knockout fareler embriyonik dönemde ölmektedir (Hoeflich ve ark., 2000; MacAulay ve ark., 2007). Uzun süre lityum tedavisi almış kişilerde GSK3 aktivitesi baskılanmış, fakat bu tedaviyi almamış kontrol hastalara göre demans riskinin arttığı gösterilmiştir (Dunn ve ark., 2005). Bu sonuç, GSK3 aktivitesinin normal beyin fonksiyonunun sürdürülebilmesi için gerekli olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte GSK3 β 'nın aşırı aktivasyonunun nörofibriler yumak oluşumunu arttırarak çeşitli nörodejeneratif hastalıkların oluşumunu uyardığı bilinmektedir.

Bellek şekillenmesinin altında yatan nöronal plastisite, pre- ve post sinaptik fonksiyonların değiştirilmesi ile mümkün olmaktadır (Hernandez ve ark., 2002). Yapılan çalışmalar GSK3 modülasyonunun nöronal plastisite uyarılması ve ekspresyonu üzerinde doğrudan bir etkisi olduğunu göstermiştir (Bradley ve ark., 2012). Ayrıca plastisiteyi etkileyen sinaptik stimülüsün GSK3 aktivitesini de etkilediği bilinmektedir (Sztamari ve ark., 2005). GSK3 inhibisyonu ile NMDA ve AMPA reseptörlerinin internalizasyonu uyarılmaktadır (P. Chen ve ark., 2007). Araştırmacılar bu bilgi ışığında LTD'nin altında yatan mekanizmaya GSK3'ün katkıda bulunabileceğini düşünmektedir (Beattie ve ark., 2000).

Öğrenme uyarısının alınması ile ilk olarak birkaç saat süren kısa süreli bellek oluşumu gerçekleşmektedir ve bunu takiben bir konsolidasyon sürecinden geçmesi ile uzun dönem belleğe çevrilmesi söz konusudur. Aktif bellek geri çağırma ve güncellenen uzun süreli bellek ile şekillenmektedir. Bu güncellenen bellek bir rekonsolidasyon süreci aracılığı ile uzun dönem belleğe dönüşmektedir. Dolayısıyla rekonsolidasyon için güncellenmiş aktif bir bellek ve uzun dönem belleğin sürdürülmesi gerekmektedir. Bu konsolidasyon ve rekonsolidasyon sürecinde farklı moleküler yollar kullanılsa da her ikisinde de protein sentezi bağımlı değişiklikler görülmektedir (Nader ve ark., 2000; Morris ve ark., 2006). Yapılan çalışmalarda heterozigot GSK3 β fareler kontrol fareler ile karşılaştırıldığında sağlıklı, fertil, normal lokomotor aktivite ve sirkadien ritme sahip oldukları görülmüştür (Hoeflich ve ark., 2000).

Kimura ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada şartsız uyarana cevap olarak heterozigot GSK3 β ve yabanıl tip fareler arasında donma zamanı açısından herhangi bir farklılık görülmemiştir (Kimura ve ark., 2008). Bu çalışmada GSK3 $\beta^{+/-}$ farelerde bellek konsolidasyonu ve şekillenmesi bakımından herhangi bir bozukluk olmadığı ve bu belleğin en az 7 gün boyunca sürdürüldüğü gösterilmiştir (Kimura ve ark., 2008). Fakat rekonsolidasyonda heterozigot GSK3 β farelerin 7.günde daha kısa donma zamanı gösterdiği bulunmuştur (Kimura ve ark., 2008). Ek olarak GSK3 $\beta^{+/-}$ hayvanların belleği tekrar aktive olmazsa, 7 gün boyunca uzun süreli belleği stabilize edip öğrenme fonksiyonunu yerine getirmektedir. Fakat bu heterozigot fareler testten önce bellek tekrar aktive olmadığına rekonsolidasyonu başaramamaktadır. Bu bilgiler GSK3 β 'nın aktivasyonunun bellek rekonsolidasyonu veya sürdürülmesinde gerekli olduğunu göstermektedir.

2.1.7. Adropin

Adropin insanda 9.kromozomda bulunan Enerji Homeostazisi-İlişkili Gen (*Enho*) tarafından kodlanan 4.9 kDa ağırlığında bir peptittir (Kumar ve ark., 2008; Aydın, 2014). Merkezi sinir sistemindeki çeşitli organlarda (nöronlar, nöroglial hücreler, pia mater, vasküler alan, Purkinje hücreleri ve granüler tabaka) bulunmakla birlikte kalp, böbrek, karaciğer, pankreas ve insan göbek kordonunda eksprese olmaktadır (Lovren ve ark., 2010; Aydın ve ark., 2013; Aydın, 2014).

2008 yılında Kumar ve sonraki yıllarda Aydın adlı araştırmacı ve arkadaşları adropinin lipid homeostazisi ve kan glikozunu düzenleyici etkisini bulmuşlardır (Kumar ve ark., 2008; Aydın, 2014). Lovren 2010 yılında adropinin endotel üzerine koruyucu etki gösterdiğini ortaya koymuştur . Bu çalışmada adropin VEGFR2'i ve onun hücre içi sinyal yollarını aktive ederek etki göstermiştir. Hücre içerisinde PI3K/Akt ve Erk1/2 yollarına etki etmiştir. Bununla birlikte adropin, eNOS ekspresyonunu modüle etmektedir (Lovren ve ark., 2010). Adropin endotel hücrelerin proliferasyonunu, göçünü, kapiller benzeri yapı oluşumunu arttırmış; endotelial permeabiliteyi azaltmıştır (Lovren ve ark., 2010; Yang ve ark., 2016).

Adropin, glikoz oksidasyonunda hız sınırlayıcı bir enzim olan pirüvat dehidrogenaz (PDH) enzimini aktive etmiş ve mitokondriyal fonksiyonu arttırmıştır. Yağ asidi

oksidasyonunda görev yapan iki anahtar enzim olan karnitin palmitoltransferaz-1B (CPT-1B) ve farklılaşma kümesi 36 (CD36)'nın aktivitesini baskılayarak yağ asidi oksidasyonunda da rol oynamaktadır (Gao ve ark., 2015).

Adropin aterogenez ve kardiyovasküler hastalıkların düzenlenmesinde koruyucu bir role sahiptir (L. Wu ve ark., 2014; L. Li ve ark., 2016; L. P. Zhao ve ark., 2016). Serum adropin seviyesi, kardiyovasküler hastalık ve koroner ateroskleroz için bir risk faktörü olan serum homosistein seviyesi ile ters ilişkilidir (L. P. Zhao ve ark., 2016). Kardiyak sendrom X ve stabil koroner arter hastalığına sahip hastaların serum adropin seviyesi düşük bulunmuştur (Celik ve ark., 2013; L. P. Zhao ve ark., 2015). Akut miyokard infarktüsü başlangıcında serum adropin seviyesi kontrol grubundan daha düşük seyreder iken; izleyen 1 ve 24.saatlerde adropin seviyesinin arttığı bulunmuştur (Aydin, 2014; H. Y. Yu ve ark., 2014). Plazma adropin seviyesi kalp yetmezliğinin şiddeti ile doğru orantıda iken sol ventrikül ejeksiyon fraksiyonu ile arasında negatif bir korelasyon bulunmaktadır (Lian ve ark., 2011).

Adropin, nöronal tanıma molekülü 3 (NB3) aracılı ile membrana bağlı bir protein olan Notch1 sinyal yolağını modüle etmektedir. NB-3, Notch1'in ligandı olarak görev alan, kontaktin ailesine ait bir proteindir ve sinir sistemi gelişimi sırasında hücre yüzey etkileşimine aracılık etmektedir. Wong ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada adropinin NB3/Notch sinyal yolağı aracılığı ile lokomotor aktivite ve motor koordinasyonu düzenlediği, ayrıca serebellum gelişiminde de önemli bir rol oynadığı bulunmuştur (C. M. Wong ve ark., 2014).

Adropin ve Vasküler Endotel Büyüme Faktör Reseptörü 2 (VEGFR2)

VEGFR2, özellikle endotel hücrelerinde eksprese edilen bir tirozin kinaz reseptörü olup, endotel fonksiyonunu ve anjiogenesisi düzenlemektedir. Adropin, VEGFR2 ekspresyonunu arttırarak PI3K/Akt ve Erk1/2 yolaklarını aktive eder, eNOS'u arttırarak nitrik oksit (NO) biyoyararlanımını modüle etmektedir (Lovren ve ark., 2010).

Hipoksik şartlar hipoksi-uyarıcı faktör-1 α (HIF-1 α) ve VEGFR2 gen ekspresyonunu uyarmaktadır (Mu ve ark., 2003). HIF-1 α degradasyonunda anahtar bir enzim görevi gören prolilhidroksilaz inhibitörleri ile mezenşimal hücreler uyarılırsa, mezenşimal kök

hücrelerin nöron benzeri hücrelere dönüşümü sağlanmaktadır (Pacary ve ark., 2006). İskemik şartlar altında HIF-1 α üretimi eritropoietin (EPO), p21 ve VEGF gibi nörojenik faktörlerin yapımını indüklemektedir (Jin ve ark., 2002; X. B. Yu ve ark., 2002; Pacary ve ark., 2006). İskemik inme oluşturulan hayvan modellerinde VEGF'in nöroprotektif etki gösterdiği (daha küçük infarct alanı), nörogenezde rol oynadığı (nöronal prekürsörlerin erken ve geç fazında) ve anjiogeneze katkıda bulunduğu (endotel hücre proliferasyonu, hücre göçü, sağ kalımı ve vasküler geçirgenlik) gösterilmiştir (Jin, Mao, ve ark., 2001; Sun ve ark., 2003; Shimotake ve ark., 2010). Nörogenez ve anjiogenezin birlikte geliştiği bilinmesine rağmen, VEGF'nin nörotrofik potansiyeli anjiyogenezden bağımsızdır. VEGF bu fonksiyonu, aksonal büyümeyi uyararak, bununla birlikte kalpain ve kaspaz-3 bağımlı mekanizmalar aracılığı ile hücre ölümünü baskılayarak yapmaktadır (Sondell ve ark., 2000; Jin, Mao, ve ark., 2001; Shimotake ve ark., 2010).

Son yapılan çalışmalarda Rho/Rho ilişkili protein kinaz (ROCK) sinyal yolağının inhibisyonunun HIF-1 α aktivitesini arttırdığı ve EPO, VEGF ve p21 proteinlerini upregüle ederek nörogenezi uyardığı tespit edilmiştir (Pacary ve ark., 2007; Pacary ve ark., 2008). Adropinin VEGF seviyesini etkilemeksizin Rho/ROCK yolağını inhibe ederek nörogeneze katkıda bulunabileceği düşünülmektedir (Yang ve ark., 2016).

Adropin ve G Protein-bağlı Reseptör (GPR19)

Stein ve arkadaşları 2016 yılında adropinin potansiyel reseptörü olarak GPR19'u tanımlanmışlardır (Stein ve ark., 2016). GPR19, Nöropeptid-Y reseptörüne benzer özellikler gösteren, dopamin D2 reseptör ailesinden bir transmembran reseptördür (O'Dowd ve ark., 1996). GPR19 reseptörü serebellum, kaudat, putamen, talamus, hipotalamus, hipokampus, frontal korteks ve olfaktör bulbusta eksprese olmaktadır (O'Dowd ve ark., 1996; Hoffmeister-Ullerich ve ark., 2004). GPR19 transkriptlerinin erken embriyogenesiste nöroektodermal orjinli dokularda bulunduğu tespit edilmiştir (Hoffmeister-Ullerich ve ark., 2004). Serebral nöronlarda bu reseptörün uyarılması ile birlikte Erk1/2 ve Akt fosforilasyonunun arttığı gösterilmiştir (Hossain ve ark., 2016). Yakın zamanlarda Stein ve arkadaşları, adropinin GPR19 reseptörü ile su alımının inhibisyonuna neden olduğunu bulmuştur (Stein ve ark., 2016). Dolayısıyla, GPR19

reseptörünün dağılımı ve altında yer alan potansiyel sinyal yolları nöronal gelişim ve korumada adropinin önemli etkilere sahip olabileceğini göstermektedir.

Adropin ve Nitrik Oksit Sentaz (NOS)

Adropinin endotel üzerine koruyucu fonksiyonundan biri de NO biyoyararlanımının düzenlenmesi ildir (Lovren ve ark., 2010). NO anjiogenezi ve vaskülogenezisi uyarırken, anti-aterosklerotik, anti-inflamatuvar ve anti-trombotik faktör olarak da etki göstermektedir.

Nitrik oksit oluşmasını sağlayan NOS enziminin ekspresyonu, PI3K/Akt ve Erk1/2 sinyal yolları ile arttırılmaktadır (Lovren ve ark., 2010; B. Peng ve ark., 2012). NOS polimorfizmi veya endotelial NOS ekspresyonunun azalması spontan serebral thrombosis ve infarktüsü, kan beyin bariyeri bozulması ve Alzheimer hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıklara neden olan kognitif bozukluklar ile ilişkilidir (Hassan ve ark., 2004; Jeynes ve Provias, 2009; Tan ve ark., 2015).

Adropin *in vitro* ve *in vivo* endotel hücrelerinde NOS ekspresyonunu arttırarak proliferasyona, migrasyona ve kapiller benzeri tüp oluşumuna neden olmakta; bununla birlikte bu hücrelerin apoptozunu ve permeabilitesini azaltmaktadır (Lovren ve ark., 2010). Ayrıca NOS'un upregülasyonu, serebral kan akımını arttırırken serebral iskemi, apoptoz, inflamasyon ve stres-indüklü hipotansiyonun önlenmesini sağlamaktadır (H. Y. Lin ve ark., 2010).

Adropin ve Ekstrasellüler Sinyal-Düzenleyici Kinazlar 1/2 (Erk1/2)

Erk1/2 mitojen-aktif protein kinaz ailesinin bir üyesidir. Adropin VEGFR2 aracılı ile Erk1/2 yolağını aktive ederek BDNF gibi proteinlerin ekspresyonunu arttırmaktadır (Lovren ve ark., 2010). BDNF, beyin hasarı ve iskemisini takiben nöronal gelişim, farklılaşma, sağ kalım ve nörolojik fonksiyonların düzelmesi gibi olaylara katkıda bulunmaktadır (Y. M. Zhu ve ark., 2013; Y. Zhao ve ark., 2014; H. Wu ve ark., 2015). İskemi sonrası Erk1/2 yolağı aracılığı ile BDNF üretimini arttırmakta ve reperfüzyon hasarını azaltmaktadır (H. Wu ve ark., 2015). Ek olarak, Erk1/2 aktivasyonu nükleer faktör eritroid 2-ilşkili faktör 2 (Nrf2)'yi uyarmakta ve beta-amiloid indüklü hücre ölümü ve oksidatif strese karşı nöronları korumaktadır.

Adropin ve PI3K/Akt Sinyal Yolağı

PI3K VEGF, sitokinler, insülin ve diğer hücresel stimuluslara cevaben Akt'nin fosforilasyonunu uyarmaktadır. Akt'nin aktivasyonu 308. pozisyonda treonin ve 473. pozisyonda serin amino asidinin fosforlanmasını gerektirmektedir. Ser-473 pozisyonundan fosforlandığında Akt diğer fosforlanmaya gerek duymadan aktive olmaktadır (H. Y. Wang, Wang, ve ark., 2009). Adropin Ser-473 bölgesinden fosforillenmeyi uyarak Akt'yi aktive edebilmektedir (Lovren ve ark., 2010).

Fosforile olan Akt hücre siklusunun devamı, proliferasyon, farklılaşma ve sağ kalımı uyarmaktadır (Manning ve Cantley, 2007). Ayrıca bu yolak anjiogenesis, nöronal rejenerasyon, sinaptik plastisite, inflamatuvar cevap ve apoptosis gibi önemli olaylarda rolü olan rapamisin'inin memeli hedefi (mTOR) hücre içi ligandının tetikleyicisidir (Annovazzi ve ark., 2009).

Alzheimer, Parkinson ve Huntington Hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıklar defektif Akt sinyali ile ilişkilidir (Colin ve ark., 2005; Saavedra ve ark., 2010). Benzer şekilde, hasarlı Akt/GSK3 β sinyali şizofreni, bipolar bozukluk gibi çeşitli nöropsikiyatrik hastalıkların patofizyolojisinde görev almaktadır (Emamian 2004; Jope 2011). Adropin ile aktive olan PI3K/Akt aktivasyonunun şizofreni, Parkinson gibi hastalıklarda terapötik bir potansiyele sahip olabileceği yapılan araştırmalar ile öne sürülmüştür (Burke 2007; Timmons 2009; Schwab 2005).

Adropinin lokomotor aktiviteyi ve motor koordinasyonu düzenleyici etkisi bilinmekle birlikte, öğrenme ve bellek üzerindeki etkisini inceleyen herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Projemizde adropinin uzaysal öğrenme ve bellek üzerine olan etkisi ve mekanizması araştırılmıştır. Adropinin öğrenme ve bellek oluşumunda rol oynayan AKT, CREB, BDNF, MAPK, GSK3 β , NMDA reseptörü NR2B proteinlerinin ekspresyon seviyesi, glutamin ve glutamik asit miktarı üzerine etkisini belirleyen ve davranış deneyleri ile destekleyen ilk araştırmadır.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında gerçekleştirilen bu çalışmada 3 aylık, ortalama 280-320 gr ağırlığında, erkek Sprague-Dawley sıçanlar kullanılmıştır. Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Bakım ve Üretim Ünitesi'nden temin edilen hayvanlar, sıcaklığı $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ olan ve 12 saat aydınlık-karanlık periyodunda bir odada barındırılmıştır. Sıçanlar ticari yem ve çeşme suyu ile beslenmiştir. Deneysel çalışmalar için Akdeniz Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi, Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan etik kurul onayı alınmıştır (B.30.2.AKD.0.05.07.00/50).

3.1. Deney Gruplarının Oluşturulması

Sıçanlar deneyin başlangıcında rastgele bir şekilde iki gruba ayrılmıştır.

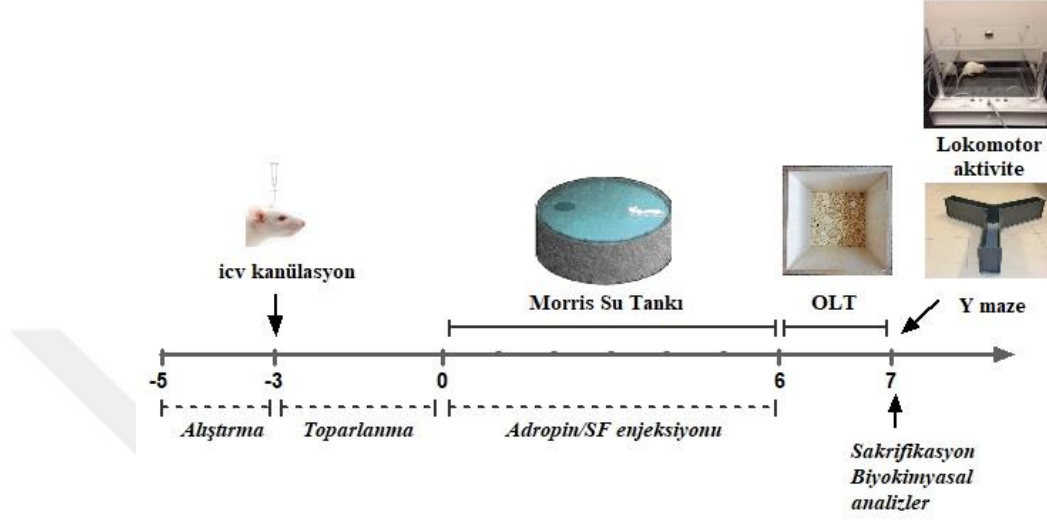
Tablo 3.1. Deneysel prosedürler için belirlenen deney grupları

Deney Grupları	İlaç Uygulamaları
Kontrol (n=15)	% 0.9'luk NaCl (icv)
Adropin (n=15)	1 nmol dozda % 0.9'luk NaCl içinde çözülmüş adropin (icv)

3.2. Deney Protokolü

Hayvanlar deneylerden birkaç gün önce deney yapılacak davranış laboratuvarına alınarak deney ortamına alışmaları sağlanmıştır. Bu alışma sürecini takiben lateral ventriküle kanül yerleşimi yapıp 3 gün boyunca toparlanma periyoduna sokulmuştur. Kanül yerleşimi doğrulandıktan sonra her gün aynı saatte adropin grubu sıçanlara 1 nmol dozda adropin enjekte edilmiştir, kontrol grubu hayvanlara da adropinin çözücüsü % 0.9'luk NaCl aynı oranda uygulanmıştır. Adropin uygulaması ile birlikte uzaysal hafızayı değerlendiren Morris Su Tankı testi ve enjeksiyon bitimini takiben 6 ve 7. günlerde obje lokalizasyon testi gerçekleştirilmiştir. 7. Günde sıçanların motor aktivite davranışları lokomotor aktivite testiyle ölçülmüştür ve takiben Y maze testi ile uzaysal çalışma belleği değerlendirilmiştir. Davranış deneyleri ardından sakrifiye edilen sıçan

hipokampüsleri izole edilerek biyokimyasal analizler için -80° 'de saklanmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Deney protokolü. OLT: Obje lokalizasyon testi, icv: intraserebroventriküler.

3.3. İntraserebroventriküler Kanülasyon (İCV) Uygulaması

Hayvanlar ketamin (60 mg/kg) ve ksilazin (12 mg/kg) anestezisinin intraperitoneal olarak uygulanması ile anestezide alınıp 37°C 'lik ısı pedi üzerinde stereotaksik çerçeveye sabitlenmiştir. Göz kurumasını engellemek amacıyla 1 gr vazelin her iki göze kulak çubuğu yardımıyla uygulanmıştır. Ardından sagittal bir suture yardımıyla perioste temizlenerek bregma açığa çıkarılmıştır (Şekil 3.2). Bregma ve lambda noktaları referans alınarak rostro-kaudal ekseninde eğim ortadan kaldırıldıktan sonra sağ lateral ventriküle yerleştirilecek olan kanülasyon işlemi için bregma referans alınarak 0.8 mm anteroposterior (AP); -1.4 mm mediolateral (ML); -2.2 mm dorsoventral (DV) koordinatlarında kafatasına 1 mm çapında bir delik açılmıştır. 26G kalınlığındaki plastik kanül bu koordinatlarda sağ lateral ventriküle yerleştirilmiştir. Kanül, dental sement ile kafatasına sabitlenmiştir ve 3.0 cerrahi ipek iplik ile cilt kapatılmıştır. Cerrahi işlemler sırasında gerçekleşen su kaybını önlemek için 1 ml SF subkutan olarak enjekte edilmiştir. Cerrahi işlemleri takiben iki gün boyunca ağrı kesici olarak 1 mg/kg dozda meloksikam intraperitoneal olarak uygulanmıştır. İntraserebroventriküler kanül yerleşimini doğrulamak için cerrahi işleminden üç gün sonra sıçanlara yerleştirilen kanül aracılığıyla 150 ng anjiyotensin-II uygulanmıştır. Enjeksiyon sonrası, sıçanlar kafeslerine

konmuş ve suya erişimine izin verilmiştir. 120 sn içinde su tüketmeyen hayvanlar kanülasyon işleminin lateral ventriküle gerçekleşmemesinden dolayı deney dışı bırakılmış, 120 sn içerisinde su tüketen hayvanlar deney prosedürüne devam ettirilmiştir (Bulbul ve ark., 2019).



Şekil 3.2. Stereotaksik çerçeveye sıçanların yerleştirilmesi.

3.4. Adropin Uygulaması

Üç günlük toparlanma sürecinin ardından adropin grubu hayvanların lateral ventriküllerine adropin (Phoenix Pharmaceuticals, USA) steril % 0.9'luk NaCl içerisinde çözülerek, 1 nmol dozda, 5 µl hacminde, altı gün boyunca aynı saatte enjekte edilmiştir. Kontrol grubu hayvanlara ise lateral ventriküle steril % 0.9'luk NaCl uygulanmıştır. Uygun adropin dozu çalışma öncesinde denenmiştir. Beyin dokusunda eksprese olan ng adropin/mg doku miktarına göre adropin dozu seçilmiştir (Aydın ve ark., 2013; Stein ve ark., 2016).

3.5. Parametreler

3.5.1. Ağırlık Takibi

Deney süresi boyunca hayvanların ağırlıkları takip edilerek kaydedilmiştir.

3.5.2. Motor Aktivitenin Belirlenmesi

Lokomotor aktivite, açık alan aktivite izleme sistemi (MAY 9908 model aktivite görüntüleyici sistem: Commat LTD, Türkiye) kullanılarak ölçülmüştür. 42 cm x 42 cm x 42 cm boyutlarına sahip bu sistem, deney hayvanının hareketini algılayan kızılötesi fotoseller ile donatılmıştır. Kafeslerin yan bloklarında, yerden 4,5 cm yükseklikte ve 2,5 cm aralıklarla on beş yayıcı ve algılayıcı fotosel çifti bulunmaktadır. Diğer on beş fotosel çifti ise yerden 8 cm yukarıya yerleştirilmiştir. Deney hayvanının bu açık alanın ortasına konması ile 5 dakika süre ile tek bir kayıt alınmıştır. Fotosel ışınlarının kesilmesi IBM-uyumlu bir bilgisayar sistemi ile belirlenmiştir ve deney hayvanlarının lokasyonu 0,1 sn hassasiyetle yazılım ile hesaplanmıştır (Ozkan ve ark., 2016).

Deney hayvanının lokasyonunun tamamen değişmesi ile oluşan aktivite ambulator aktivite (deneğin kafes içinde dikilme haricinde yaptığı her türlü hareket) olarak kaydedilmiştir. Bu sistem ile alınan mesafeye ek olarak, hayvanın vertikal, horizontal ve ambulator hareketlerinin tamamını kapsayan toplam lokomotor aktivitesi de ölçülmüştür.



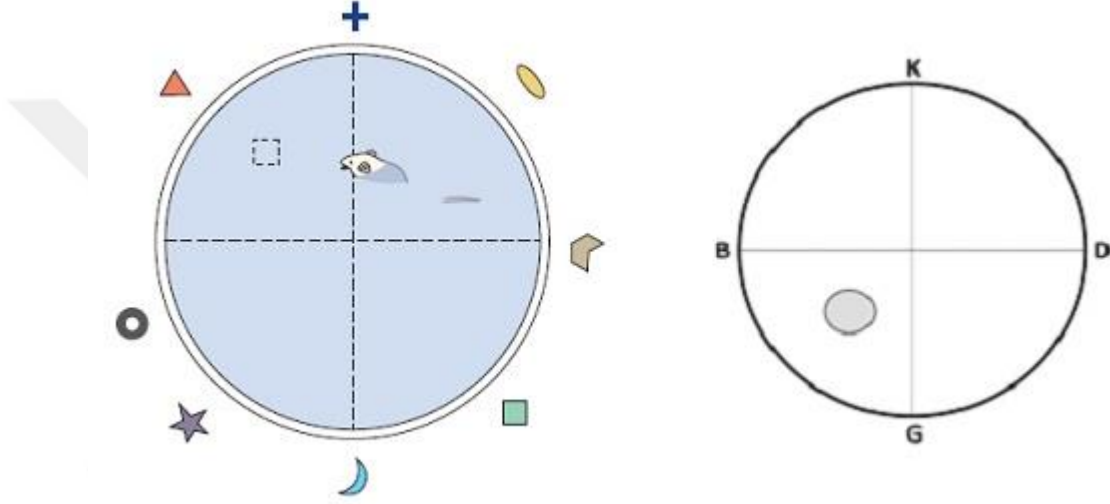
Şekil 3.3. Locomotor aktivite kafesi.

3.5.3. Uzaysal Hafıza ve Öğrenmenin Değerlendirilmesi

Morris Su Tankı (Morris Water Maze = MWM) Testi

Uzaysal hafıza ve belleğin değerlendirilmesinde kullanılan Morris Su Tankı Testi (MWM) çapı 150 cm, yüksekliği 60 cm olan zemini ve iç duvarları siyah renkte olan,

daire şeklinde su dolu bir öğrenme testidir. Bu dairesel tank dört eşit kadrana bölünmüş ve kadranslardan birine suyun 1,5 cm altında kalacak şekilde Plexiglas özellikte platform yerleştirilmiştir. Havuz sıcaklığı dışarıdan sıcak su eklemesi ile 19-22°C arasına getirilmiştir. Platform tüm denemeler boyunca aynı pozisyonda tutulmuştur, fakat probrial gününde havuzdan kaldırılmıştır. Dört farklı ipucu objesi tüm deney boyunca aynı pozisyonda kalacak şekilde tankın çevresine yerleştirilmiştir (Alaei ve ark., 2007) .



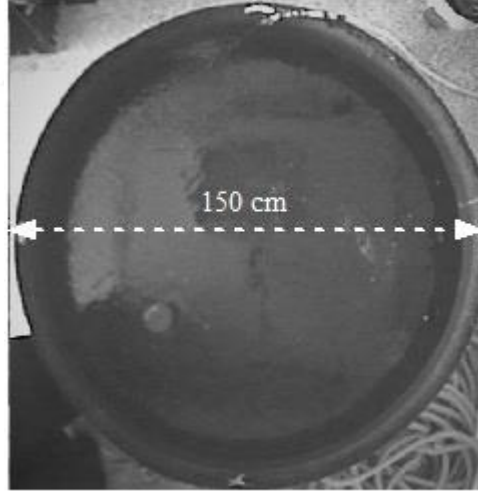
Şekil 3.4. Morris Su Tankı testinin şematize hali. D: Doğu, B: Batı, G: Güney, K: Kuzey

İntraserebroventriküler kanülasyon cerrahisini takiben üç günlük iyileşme periyodu tamamlanınca birinci günden itibaren öğrenme aşamasındaki sıçanların her gün 120 sn tankta yüzmelerine izin verilmiştir ve bu süre içinde platformu bulan hayvanların 15 sn süre ile platform üzerinde kalarak uzaysal ipuçlarını keşfetmelerine izin verilmiştir (Şekil 3.3). 120 sn içinde platformu bulamayan sıçanlar yavaşça platforma yönlendirilip 15 sn platform üzerinde durmaları sağlanmıştır. Bu test, 5 gün süre ile 5 dakika aralıklarla günde 4 trial uygulanmıştır ve sıçanlar bu 5 gün boyunca belirli yönlerden (Tablo 3.2) yüzü tankın yan çeperine bakacak şekilde, kuyruğundan tutularak, aynı kişi tarafından suya konulmuştur.

Tablo 3.2. Morris Su Tankı testi deneme koordinatları (K: Kuzey; D: Doğu; GD: Güneydoğu; KB: Kuzeybatı; KD: Kuzeydoğu)

Günler	1.gün	2.gün	3.gün	4.gün	5.gün	6.gün
Yönler	K	GD	KB	D	K	KD
	D	K	GD	KB	GD	
	GD	KB	D	K	D	
	KB	D	K	GD	KB	

Beş gün süre ile gerçekleştirilen trialler sonrasında 6.gün platform tankın içinden kaldırılmıştır ve öğrenmenin gerçekleşip gerçekleşmediği platformsuz su tankında yapılan 30 sn'lik yüzdürme trialı (prob trial) ile değerlendirilmiştir. Sıçanların platform bulunan kadranda geçirdikleri süre, tankta kat ettikleri yol ve yüzme hızları Noldus Ethovision XT System (the Netherlands) programı ile kaydedilmiştir.



Şekil 3.5. Deneylerde kullanılan Morris Su Tankı.

Obje Lokalizasyon Testi (OLT)

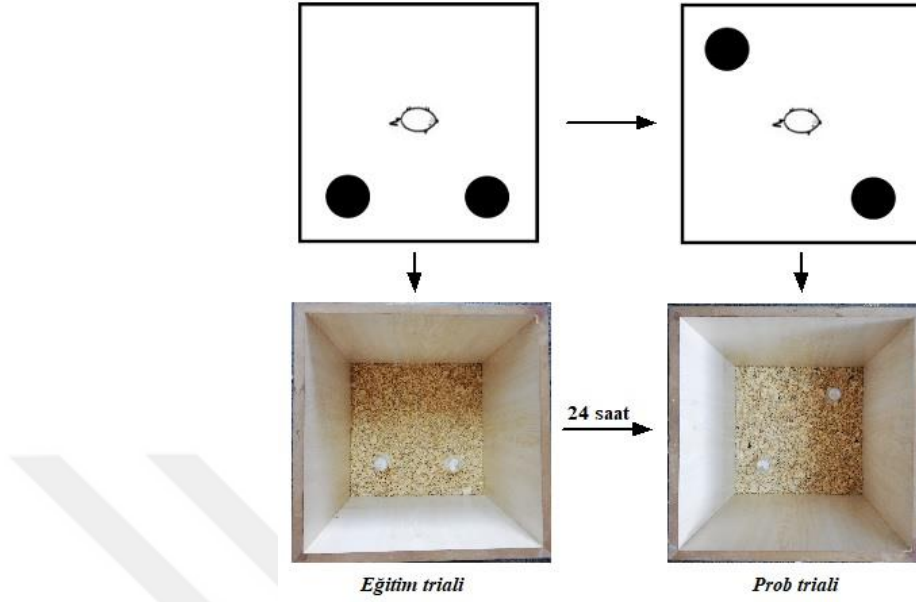
Nesnenin yerini konumlandırma hafızasını ölçmek için yapılan obje lokalizasyon testi, uzun süreli belleğin analiz edilmesinde kullanılmaktadır. Eksplisit belleğin kodlama, depolama, birleştirme ve geri çağırma aşamalarının hepsini içeren OLT'de alıştırma, eğitim ve prob trialı olmak üzere 3 basamak bulunmaktadır. Alıştırma periyodunda hayvanlar davranış deneyi yapılan laboratuvara getirilerek ortama alışması sağlanmıştır

ve ele alıştırmaya protokolü uygulanmıştır. Ahşaptan yapılmış, 40 x 40 x 40 cm boyutlarında, üzeri açık kutu şeklindeki düzenek yaklaşık 1 cm yüksekliğinde otoklavlanmış talaş ile kaplanmıştır. Düzenek loş bir odaya yerleştirildikten sonra hayvanlar kuyruklarından tutulup hızlıca düzenek içine bırakılmıştır ve alanı tanımasına izin verilmiştir. Keşif sonrası kafeslerine yerleştirilen sıçanlar 24 saat sonra eğitim trialine alınmıştır. Eğitim trialinde talaşla kaplı zemin içerisine iki adet aynı renk ve boyutta nesne düzeneğin köşelerinden 5'er cm uzağına yerleştirilmiştir ve 3 dakika boyunca iki özdeş objeyi keşfetmesine izin verilmiştir. Her bir denek arası koku izlerinin bulunmasını önlemek için talaş karıştırılmış ve nesneler %70'lik etanol ile temizlenerek birkaç dakika havalandırılması sağlanmıştır.

Eğitim trialinden 24 saat sonra özdeş nesnelerden birinin yeri değiştirilerek hayvanlar tekrar deneye alınmıştır (prob trial). Deney düzeneğine bırakılan hayvanın 3 dakika süre ile gezmesine izin verilmiştir ve her nesneyi keşfetmek için harcanan süre ve her iki nesneyi keşfetmek için harcanan toplam süre kaydedilmiştir. Bir nesnenin keşfi hayvanın burnuyla nesneyi işaret etmesi ve/veya burnu ile dokunması olarak tanımlanmıştır. Bir nesnenin etrafında dolaşmak, tırmanmak veya oturmak keşif davranışı olarak değerlendirilmemiştir.

Sıçanların kognitif fonksiyonu diskriminasyon indeksi (DI) = [(yeni obje keşif süresi-eski obje keşif süresi)/toplam keşif zamanı x 100] olarak verilmiştir.

Diskriminasyon indeksinin sıfır olması, iki objenin eşit şekilde tercih edildiğini gösterirken, uzun veya kısa süreli bellek diskriminasyon indeksi değeri 20-45 arasında değişmektedir.

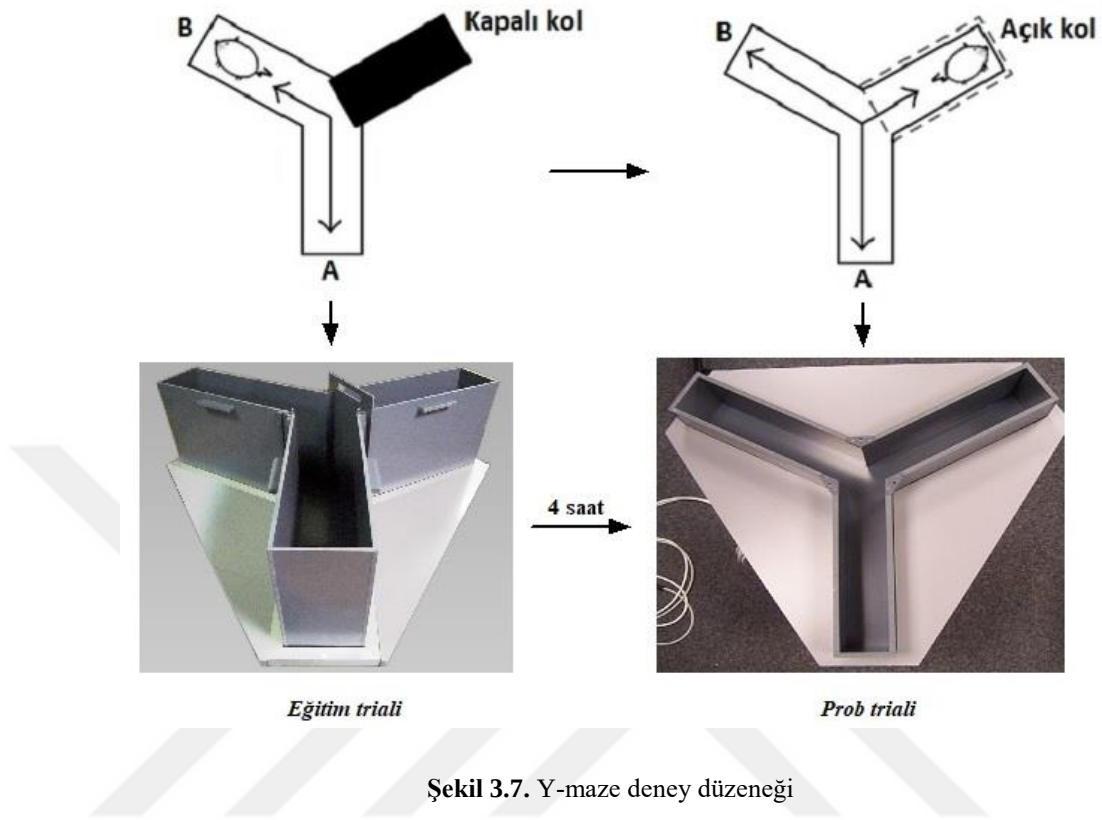


Şekil 3.6. Obje lokalizasyon test prosedürü.

Y-Maze Testi ile Öğrenmenin Değerlendirilmesi

Uzaysal çalışma belleğinin değerlendirilmesi için kullanılan Y-maze testi, 40 cm uzunluğunda, 20 cm duvar yüksekliğinde ve 10 cm genişliğinde üç koldan ibaret bir labirenttir. Zemini siyah renkte bulunan bu düzeneğin kolları arasında 120°'lik açı bulunmaktadır ve deneyin öğrenme aşamasında hayvanlar deney yapılacak odaya 30 dakika önce getirilmiştir. Labirentin üç kolundan bir tanesi öğrenme aşamasında kapatılmıştır ve düzeneğin çevresine çeşitli görsel ipuçları yerleştirilmiştir. Deney düzeneğine yerleştirilen sıçanların 15 dakika süre ile diğer iki kolu keşfetmesine izin verilmiştir. 15 dakika sonunda sıçanlar kafeslerine geri konulmuştur ve deney sırasında koku duyusuna göre hareket etmelerini engellemek için Y-maze zemini ve duvarları %70'lik etil alkol ile temizlenip havalandırılmıştır.

4 saat sonra kolda bulunan engel kaldırılmıştır ve hayvanlar daha önce bırakıldıkları koldan Y-maze düzeneğine bırakılarak 5 dakika süre ile her üç kolda gezmelerine izin verilmiştir. Kamera ile kayıt altına alınan bu davranışlar, Noldus Ethovision XT System (the Netherlands) ile değerlendirilmiştir. Bu süre sonunda katedilen toplam mesafe, ortalama hız, yeni kola giriş frekansı ve yeni kolda geçirilen süre hesaplanmıştır.



Şekil 3.7. Y-maze deney düzeneği

3.5.4. Biyokimyasal Analizler

Deneyin Sonlandırılması ve Dokuların Çıkarılması

Davranış deney prosedürlerinin bitimini takiben sıçanlar hızlıca intraperitoneal olarak uygulanan 1 gr/kg dozda üretan anestezine alınmıştır. Uygulanan orta hat kesisi ile abdomen ve göğüs kafesi açılmıştır. Aortanın iliak bölgesine yerleştirilen ucu künt şekilde kesilmiş bir enjektör ucu yardımıyla heparinli serum fizyolojik verilerek dokular perfüze edilmiştir. Biyokimyasal analizler için kullanılacak hipokampus dokuları hızlıca izole edilerek -80°C 'ye kaldırılarak saklanmıştır.

Protein Tayini

Biyokimyasal analizler için kullanılacak sıçan hipokampus dokularında protein tayini modifiye Bradford yöntemine dayanan bir prosedür ile yapılmıştır (Bradford, 1976).

1 μl doku supernatantı 999 μl distile su ile dilüe edildikten sonra üzerine 1 ml CPPA reaktifi (Coomassie Plus Protein Assay Reagent, Pierce-1856210) eklenmiştir ve 595 nm'deki absorbansı spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Standart (2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ bovin

serum albümin, BSA, Sigma, A-8022) çalışması ise numune yerine artan konsantrasyonlarda 1:1000 sulandırmaya sahip BSA kullanılarak yapılmıştır. Sıçan doku örneklerindeki protein miktarı standart grafik çizilerek hesaplanmıştır.

3.5.5. Western Blot Analizi

Dokuların Homojenizasyonu

Sıçanlardan hızlıca izole edilen beyin dokuları soğuk bir tabla üzerine alınmıştır ve bir bisturi/kaşık yardımıyla hipokampus bölgesi izole edilerek, isimlendirilmiş ependorflara aktarılmıştır. Herhangi bir işleme tabi tutulmayan dokular lizis tamponunda (0.1 M Tris (Merck: 1.08.387.0500), 100x sodyum-orthovanadat, pH: 7.4) sonike edilmiştir. Bu işlem 0.2 gr doku başına 600 µl lizis tamponu, 10 µl proteaz inhibitörü (S8820, Sigma Aldrich) ve 10 µl fosfataz inhibitörü (4906845001, Sigma Aldrich) ile yapılmıştır. Örnekler bir saat buz üzerinde bekletildikten sonra 15.000 g'de 10 dakika, +4°C'de santrifüj edilip süpernatantlar yeni bir ependorfa aktarılmıştır. Numuneler biyokimyasal çalışmalar yapılana kadar bu şekilde -20°C'de saklanmıştır.

Doku Örneklerinin Hazırlanması

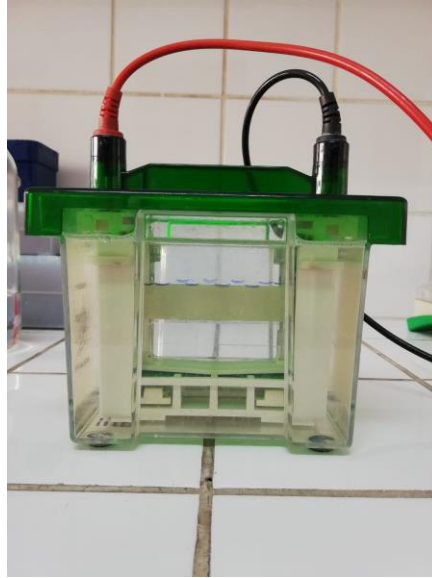
-20°C'de saklanan numunelerdeki protein miktarı belirlendikten sonra aynı miktarda protein içeren örnekler 5x Laemli (%4 SDS, %20 Gliserol, %10 2-merkaptoetanol, % 0.004 brom fenol blue, 0.125 M Tris-HCl, pH: 6.8) eklenmiştir ve 5 dakika 95-100°C'lik kaynar suda kaynatılmıştır ve örnekler jele yüklenmeye hazır hale gelmiştir.

Elektroforez ve Blotlama İşlemi

Örneklerin SDS-PAGE yöntemi ile analizleri için Laemli tarafından bildirilen yöntemde bazı değişiklikler yapılarak kullanılmıştır.

%12'lik toplama (alt) jel iyice karıştırılmıştır ve 0.75 mm'lik iki cam arasına doldurulmuştur. Jel doldurulduktan sonra üzerine su eklenerek oksijenle reaksiyonu engellenmiş ve polimerizasyonun gerçekleşmesi için 20 dakika beklenmiştir. Ardından üzerindeki su dökülmüş ve hazırlanan ayırıcı (üst) jel camlar arasına eklenmiştir. İstenen sayıda kuyucuğa uygun tarak takılmış ve polimerizasyon işlemi için 30 dakika beklenmiştir. Jelin donmasını takiben Laemli ile kaynatılıp buz üzerine alınan örnekler

moleküler ağırlık standardı başta olmak üzere her kuyucuğa 50 µg protein içerecek şekilde yüklenmiştir. 3.5 saat boyunca 80 voltluk gerilim altında elektroforez yapılmıştır. Jelde moleküler ağırlıklarına göre ayrılmış proteinler, nitroselüloz membrana transfer sandviçi oluşturularak aktarılmıştır. Transfer işlemi +4°C’de, 32 voltta gece boyu akım uygulanarak gerçekleştirilmiştir. Transfer işleminin tamamlanması ile her bir membran biri 10 dakika olmak üzere dört kez TBS-T (%0.1 Tween-20 içeren TBS) ile yıkanmıştır ve yine TBS-T’de çözölmüş %5’lik süt tozu ile oda ısısında bir saat inkübe edilmiştir. Ardından membranlar yine %5’lik süt tozu içeren 1:200 oranında seyreltilmiş BDNF, 1:250 oranında seyreltilmiş NR2B, 1:500 oranında seyreltilmiş MAPK, 1:1000 oranında seyreltilmiş p-MAPK, 1:500 oranında seyreltilmiş CREB, 1:1000 oranında seyreltilmiş p-CREB, 1:500 oranında seyreltilmiş Akt, 1:1000 oranında seyreltilmiş p-Akt, 1:500 oranında seyreltilmiş GSK3β, 1:1000 oranında seyreltilmiş p-GSK3β veya β-aktin antikorlarını içeren solüsyon ile gece boyunca, 4°C’de, çalkalayıcı üzerinde inkübe edilmiştir. Gece boyunca antikorla muamele edilmiş membranlar TBS-T ile 40 dakika boyunca yıkanmıştır ve 1:80.000 oranında seyreltilmiş işaretli horseradish peroksidaz sekonder antikorlar ile oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında membranlar tekrar TBS-T ile yıkanarak görüntülemeye hazır hale getirilmiştir.



Şekil 3.8. Western blot elektroforez işlemi.

Tablo 3.3. Western blot işlemlerinde kullanılan antikorlar

Antikor	Marka	Katalog No	Kaynak	Dilüsyon
BDNF	Santa Cruz	sc-65513	Tavşan Monoklonal	1:200
MAPK	Cell Signaling	#9102	Tavşan Poliklonal	1:500
p-MAPK	Cell Signaling	#9101	Tavşan Poliklonal	1:1000
NR2B	Abcam	ab65783	Tavşan Poliklonal	1:250
CREB	Cell Signaling	#9197	Tavşan Monoklonal	1:500
p-CREB	Sigma-Aldrich	06-519	Tavşan Poliklonal	1:1000
Akt	Cell Signaling	#4691	Tavşan Monoklonal	1:500
p-Akt	Cell Signaling	#4060	Tavşan Monoklonal	1:1000
GSK3 β	Cell Signaling	#12456	Tavşan Monoklonal	1:500
p-GSK3 β	Cell Signaling	#5558	Tavşan Monoklonal	1:1000
β -aktin	Abcam	ab6276	Fare Monoklonal	1:1000
Sekonder anti-tavşan antikor	Sigma-Aldrich	A2074	Tavşan Monoklonal	1:80.000
Sekonder anti-fare antikor	Sigma-Aldrich	A0168	Fare Poliklonal	1:80.000

Görüntüleme

Sekonder antikor ile işaretlenmiş ilgili proteinler, konjuge peroksidaz enziminin kemilüminesans oluşturan ürünü için substrat içeren ECL reaksiyon karışımı ile muamele edilmiştir. 5 dakika inkübasyon sonrasında fotoğraf filmi ile görüntülenerek spesifik antikor bağlanma yerleri film üzerinde tespit edilmiştir.

Taranarak bilgisayar ortamına aktarılan film paternlerinin Image J programı ile yarı kantitatif analizi yapılmıştır. Sonuçlar β -aktin proteinine oranlanmıştır ve ayrı ayrı hesaplanarak ifade edilmiştir.

3.5.6. Glutamin ve Glutamik Asit Miktarının Belirlenmesi

Doku Hazırlanması

Hipokampus dokuları 0.1 M formik asit solüsyonu ile 1:10 oranında sonikatör yardımı ile homojenize edilmiştir. Homojenatlar, 4°C’de 18.000 x g’de 20 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatantlar toplanarak analiz edilene kadar -80°C’de saklanmıştır.

Kütle Spektrometrisi

Glutamin ve glutamik asit standartları Sigma-Aldrich (St. Louis, MO ABD) firmasından temin edildikten sonra bu standard solüsyonları 10 ml’lik bir cam tüp içerisine 0.01 gr bileşik tartarak hazırlanmıştır. Üzerine 1 ml %98-100 formik asit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO ABD) ve 9 ml sıvı kromatografi (LC) sınıfı su eklenmiştir. Glutamin ve glutamik asit tandem kütle spektrometresi (MS/MS) ile birleştirilmiş ultra hızlı sıvı kromatografisi (UFLC, LC-20 AD UFLC XR, Shimadzu, Japonya) kullanılarak optimize edilmiş ve çoklu reaksiyon izleme (MRM) yöntemi ile ölçülmüştür (Santos-Fandila ve ark., 2013). Kromatografik ayrımlar yüksek hızlı sıvı kromatografisi (HPLC) kolonu (Inertsil ODS-4, 3 x 100 mm, 2 µm, GL Sciences Inc. Tokyo, Japonya) kullanılarak 25°C’de gerçekleştirilmiştir. Glutamin ve glutamik asit miktarı 0.4 ml/dk akış hızı olan bir gradient elüsyonu kullanılarak tespit edilmiştir. Mobil faz solvent A %0.1 formik asit ve %1 asetonitril içeren sudan oluşmakta iken; solvent B %0.1 formik asit içeren asetonitrilden oluşmaktadır. Solvent B için gradient %5-50 (0-1 dk), %50-95 (1-2 dk) ve %95 (2-3 dk) ve %5 (3-4 dk) olmuştur ve enjeksiyon volümü 5 µl’dir. MRM geçişi ve cevapları pozitif elektrosprey iyonizasyonda (ESI) glutamin ve glutamik asit için optimize edilmiştir. Pozitif ESI-MS’de prekürsör ve ürün m/z değerleri şu şekilde olmuştur: glutamin için prekürsör 146.9 ve ürün iyonu 84.1/130.2; glutamik asit için prekürsör iyon 147.9 ve ürün iyonu 84.1/129.7. Saklama (retention) süresi glutamin ve glutamik asit için sırası ile 1.05 ve 1.07 olmuştur. Glutamin ve glutamik asit cevapları 50-1000 ng/ml’lik lineer bir kalibrasyon aralığı içerisinde optimize edilmiş ve sonuçlar doku protein miktarına oranlanarak µg/mg protein olarak verilmiştir (Bulbul ve ark., 2019).

3.5.7. ELİSA Yöntemi ile Adropin Miktarının Belirlenmesi

Perfüzyon sonrası alınan hipokampüs dokuları, 1 gr başına 9 ml fosfat tuzu tamponu (PBS) (0.01 M, pH=7.4) olacak şekilde sonikatör yardımıyla homojenize edilmiştir. 5 dakika 5000 x g'de 4°C'de santrifüj sonrası toplanan süpernatantlardaki adropin miktarı, ticari olarak satın alınan sıçan adropin sandviç ELİSA (Mybiosource, MBS760446) metodu ile ölçülmüştür. Kit içinden çıkan standartların ve hipokampüs doku örneklerinin 96'lık plate'e yüklenmesinden sonra dilüsyon buffer ve biyotin işaretli antikorlar eklenmiştir ve 60 dakika 37°C'de inkübe edilmiştir. Aspire edilen kuyucuk içeriği beş kez yıkandıktan sonra substratı eklenmiş, 15 dakika 37 °C'de ışıktan koruyarak inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda stop solüsyonu eklenmiş ve reaksiyon sonlandırılmıştır. Stop solüsyonun eklenmesi ile maviden sarıya dönen kuyucuk içerikleri 450 nm absorbansta okunarak numunelerdeki adropin miktarı (pg/mg) standart eğri yoluyla karşılık gelen absorbans değerinden hesaplanmıştır. Örneklerdeki adropin miktarı pg/mg doku proteini olarak ifade edilmiştir.

3.5.8. Sonuçların Değerlendirilmesi

İstatistiksel değerlendirme SPSS paket programı kullanılarak yapılmış ve sonuçlar ortalama $\pm$ standart hata olarak gösterilmiştir. Anlamlılık düzeyi $p \leq 0.05$ olarak belirlenmiş ve her değişken için normallik testi uygulanmıştır. İstatistiksel farklılıklar unpaired two-tailed Student's *t*-test testi ile belirlenmiştir. Morris Su Tankı testinde platform bulma süresi two-way ANOVA (repeated measure) takibinde Bonferroni doğrulama testi uygulanmıştır. Şekillerin çiziminde Graphpad paket programı kullanılmıştır.

4. BULGULAR

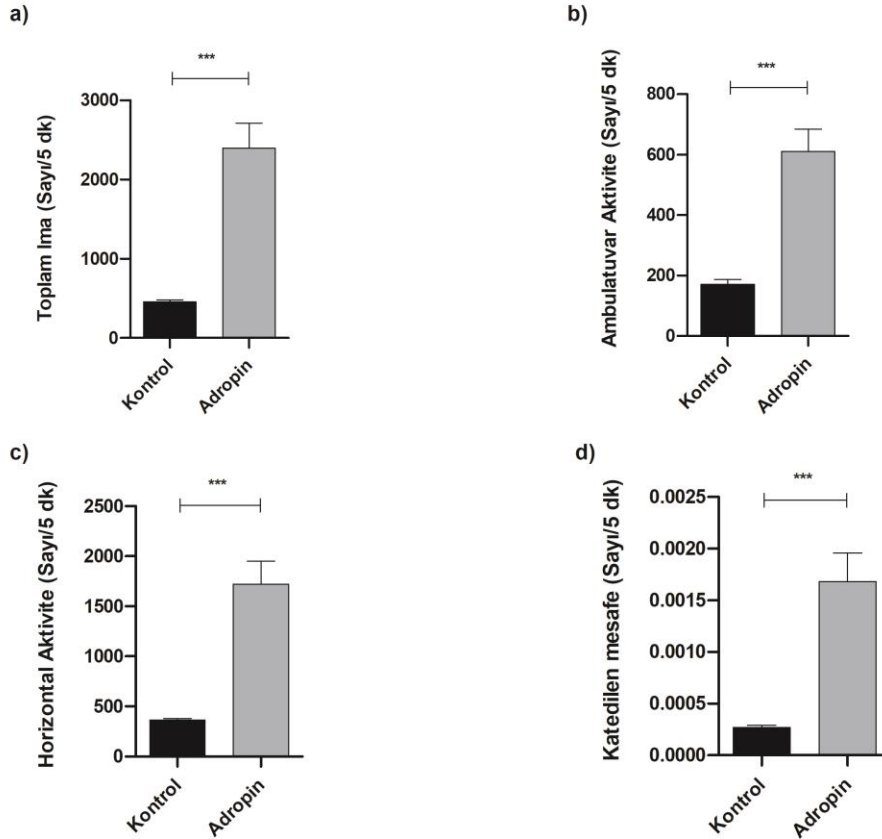
4.1. Genel Görünüm

Deneye alınan sıçanlarda sağlık ve morfoloji açısından herhangi bir farklılık görülmemiştir.

4.2. Davranış Deneyleri

4.2.1. Lokomotor Aktivite Testi

Lokomotor aktivite kafesine konulup hareketleri izlenen hayvanların vertikal, horizontal ve ambulatuvar hareketlerinin toplamını gösteren toplam lokomotor aktivitenin, adropin verilen grupta kontrol grubuna göre artış gösterdiği tespit edilmiştir (Kontrol 459.2 ± 22.5 ve adropin 2400 ± 314.1 ; $t=6.164$, Şekil 4.1.a, $p<0.0001$ ***).



Şekil 4.1. Lokomotor aktivite testi. a) Toplam lokomotor aktivite (İma) (Sayı/5 dk), b) ambulatuvar aktivite (Sayı/5 dk), c) horizontal aktivite (Sayı/5 dk), d) katedilen mesafe (Sayı/5 dk). ***: $p<0.0001$ düzeyinde Kontrol grubundan fark ($n=10$).

Kafes içerisindeki lokasyonun değişmesini gösteren bir parametre olan ambulator hareket de adropin enjeksiyonu ile kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir şekilde artış göstermiştir (Kontrol 171.6 ± 15.4 ve adropin 611.0 ± 73.7 ; $t=5.830$, Şekil 4.1.b $***p<0.0001$). Ayrıca adropin uygulaması ile sıçanların horizontal aktivitesi artış gösterirken (Kontrol 364.6 ± 14.5 ve adropin 1720 ± 229.3 ; $t=5.901$, Şekil 4.1.c $***p<0.0001$); hayvanların kafes içerisinde 5 dakikada katettikleri mesafe de adropin enjeksiyonu ile kontrol grubuna göre istatistiksel olarak artmıştır (Kontrol 0.00026 ± 0.0001 ve adropin 0.00168 ± 0.0002 ; $t=5.084$, Şekil 4.1.d, $p<0.0001***$).

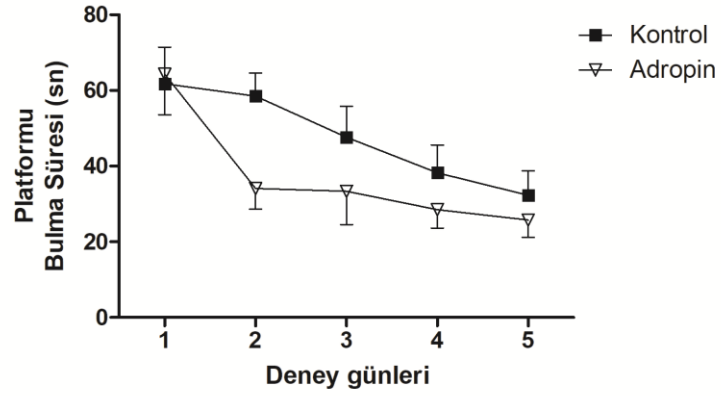
4.2.2. Morris Su Tankı (MWM)

Morris Su Tankı (MWM) testinde su tankına bırakılan hayvanların ilk beş günde platformu bulma süreleri Tablo 4.1’de gösterilmiştir.

Tablo 4.1. 5 gün boyunca sıçanların platformu bulma süreleri (sn).

	Kontrol	Adropin
1. Gün	61,79±9,63	64,3±10,7
2. Gün	58,48±6,13	34,12±5,46
3. Gün	47,63±8,19	33,36±8,79
4. Gün	38,21±7,37	28,5±4,86
5. Gün	32,31±6,47	25,78±4,6

Öğrenme kapasitesinin değerlendirilmesi amacıyla yapılan edinim (kazanç) alıştırmaları deneyin ilk 5 günü her iki deney grubunda gerçekleştirilmiştir. İlk 5 günde sıçanların platformu bulma süreleri analiz edildiğinde, her iki grupta da alıştırmaya yapılan gün sayısına bağlı olarak platformu bulma süresinde azalma olduğu tespit edilmiştir. Kontrol grubu ile kıyaslandığında, adropin grubunun platformu daha kısa sürede bulduğu fakat gruplar arasında istatistiksel bir anlamlılık bulunmadığı belirlenmiştir (Şekil 4.2).



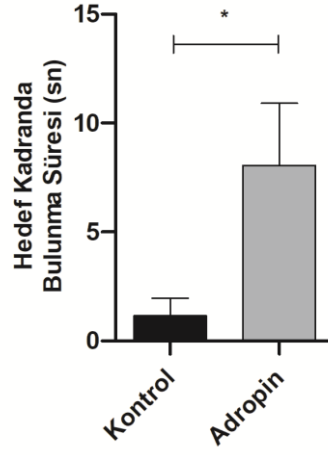
Şekil 4.2. 5 gün boyunca sıçanların platformu bulma süreleri (sn) (n=7).

Davranış testinin 6.gününde yapılan prob trial deneyi bellek kapasitesinin belirlenmesi amacıyla yapılmaktadır. Buna bağlı olarak hedef kadranda bulunma süresi, hedef kadrana giriş frekansı, katedilen toplam mesafe ve ortalama hız parametreleri değerlendirilmiştir (Tablo 4.2).

Tablo 4.2. Prob trialde (6. Gün) değerlendirilen parametreler

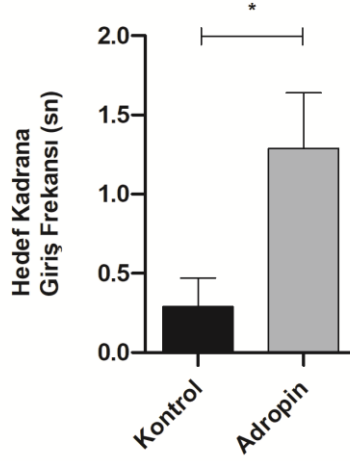
Parametre	Kontrol	Adropin
Hedef Kadranda Bulunma Süresi (sn)	1,16±0,81	8,06±2,85*
Hedef Kadrana Giriş Frekansı	0,33±0,17	1,33±0,35*
Katedilen Toplam Mesafe (cm)	80,97 ± 20,89	84,14 ± 22,30
Ortalama Hız (cm/sn)	7,21± 1,86	12,66 ± 1,83

Prob trialde hedef kadranda bulunma sürelerine bakıldığında, adropin grubunun platformun bulunduğu kadranda bulunma süresinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu belirlenmiştir (Kontrol 1.160±0.806 ve Adropin 8.064±2.854; t=2.328, Şekil 4.4, $p<0.05^*$).



Şekil 4.3. Prob trialde sıçanların hedef kadranda bulunma süreleri (sn). *: $p<0.05$ düzeyinde Kontrol grubundan fark ($n=7$).

Prob trialde hedef kadrana giriş frekansları kıyaslandığında, adropin verilen grubun platformun bulunduğu kadrana giriş sıklığının kontrol grubu sıçanlarına göre anlamlı derecede yüksek olduğu saptanmıştır (Kontrol 0.332 ± 0.17 ve Adropin 1.333 ± 0.35 ; $t=2.510$, Şekil 4.5, $p<0.05^*$).



Şekil 4.4. Prob trialde sıçanların hedef kadrana giriş frekansları (sn). *: $p<0.05$ düzeyinde Kontrol grubundan fark ($n=7$).



Kontrol grubunun izlediği yol



Adropin grubunun izlediği yol

Şekil 4.5. Kontrol ve adropin gruplarının prob trialde (6. günde) arena üzerinde takip ettiği yol

Deneyin 6.günü gerçekleştirilen prob trialde katedilen mesafe ve ortalama hız parametrelerinin adropin uygulanan hayvanlarda kontrol grubuna göre herhangi bir değişiklik göstermediği saptanmıştır (Tablo 4.2).

Beş günlük eğitim triali esnasında hem adropin hem kontrol grubu hayvanların platformu bulma süresi kısalmış fakat anlamlılık bulunmamıştır.

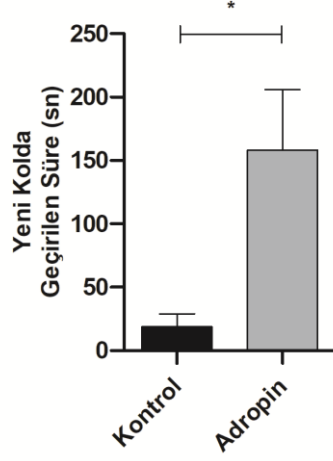
4.2.3. Y-Maze Testi

Uzaysal çalışma belleğinin değerlendirilmesinde kullanılan Y-maze testi, son adropin enjeksiyonunu takiben deney hayvanlarının biri kapalı, 3 adet kolu bulunan Y şeklindeki labirente yerleştirilmesi ile başlamıştır. Sıçanların 15 dakika boyunca alanı keşfetmesine izin verilmiştir ve ardından kafeslerine alınmıştır. 4 saat sonunda düzeneğin kapalı kolundaki engel kaldırılmıştır ve sıçanlar labirente yerleştirilmiştir. 5 dakika boyunca labirent içindeki davranışları kaydedilen hayvanların yeni kolda geçirdikleri süre, yeni kola giriş frekansı, katedilen toplam mesafe ve ortalama hız parametreleri değerlendirilmiştir (Tablo 4.3).

Tablo 4.3. Y maze testinde değerlendirilen parametreler.

Parametre	Kontrol	Adropin
Yeni Kolda Geçirilen Süre (sn)	18,83 ± 10,31	158,32 ± 47,61*
Yeni Kola Giriş Frekansı	1,85 ± 0,96	5,85 ± 3,33
Katedilen Toplam Mesafe (cm)	758,34 ± 124,36	807,81 ± 157,00
Ortalama Hız (cm/sn)	2,82 ± 0,49	3,38 ± 0,63

Yeni kolda geçirilen süreler bakıldığında, adropin grubu hayvanların bu kolda geçirdiği sürenin kontrol grubuna göre 8 kat artarak istatistiksel bir farklılık oluşturduğu belirlenmiştir (Şekil 4.6, $p<0.05^*$).



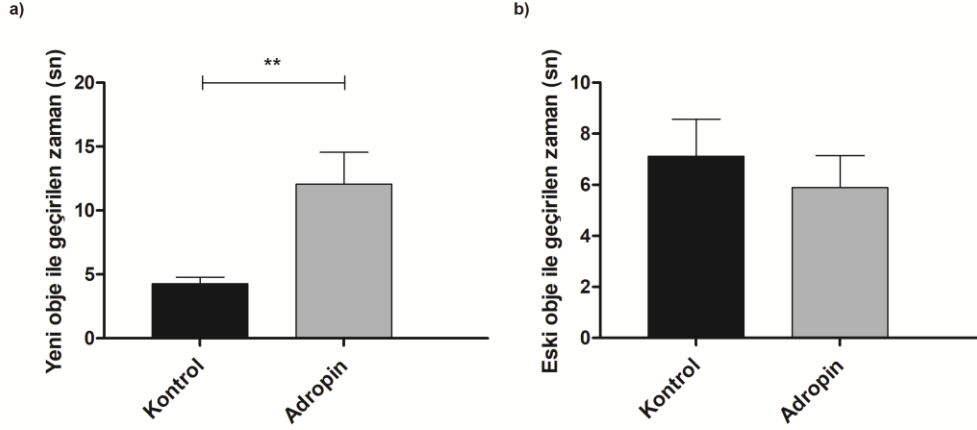
Şekil 4.6. Sıçanların yeni kolda geçirdikleri süre (sn). *: $p<0.05$ düzeyinde Kontrol grubundan fark ($n=7$).

Yeni kola giriş frekanslarına bakıldığında adropin grubu ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir. Katedilen toplam mesafe ve ortalama hız parametrelerinde de her iki grup arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır (Tablo 4.3).

Bu sonuçlar, adropin uygulamasının hipokampus bağımlı öğrenme ve bellek kapasitesine olumlu katkı sağladığını ve bu düzelme esnasında motor koordinasyonun bozulmadığını göstermiştir.

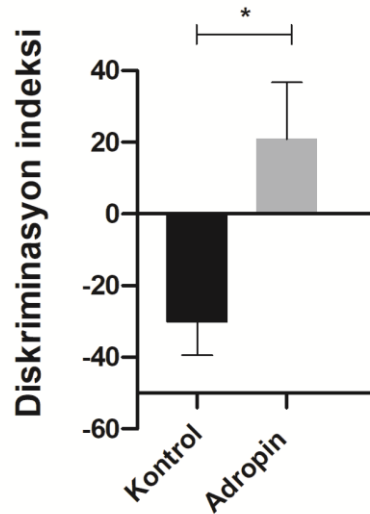
4.2.4. Obje Lokalizasyon Testi (OLT)

Obje lokalizasyon testinde sıçanların yeni bir konuma taşınan nesneyi keşfetme tercihi, onun yer tanıma belleği yeteneğini yansıtmaktadır. Lateral ventriküle yapılan adropin enjeksiyonunun yeni objeye olan ilgiyi istatistiksel olarak arttırdığı tespit edilmiştir (Kontrol 4.271 ± 0.51 ve Adropin 12.06 ± 2.48 ; $t=3.073$, Şekil 4.7.a, $p<0.01^{**}$). Eski obje ile geçirilen zamanın ise gruplar arasında farklılık göstermediği tespit edilmiştir (Kontrol 7.114 ± 1.45 ve Adropin 5.886 ± 1.26 ; $t=0.63$, Şekil 4.7.b, $p>0.05$).



Şekil 4.7. Keşif zamanı (sn). **: $p < 0.01$ düzeyinde Kontrol grubundan fark (Kontrol grubu için $n=10$, adropin grubu için $n=7$).

Sıfır değerindeki bir diskriminasyon indeksi herhangi bir keşif tercihinin olmadığını gösterirken, bu indeksin pozitif bir değerde olması yeni objeyi keşfetmek için daha fazla zaman harcadığını ve bunun tercihen yapıldığı anlamına gelmektedir. Şekil 4.8’de görüldüğü üzere adropin grubundaki sıçanlar kontrol grubuna göre pozitif bir diskriminasyon indeksi vermiştir (Kontrol -30.10 ± 9.3 ve Adropin 20.92 ± 15.7 ; $t = 2.776$, Şekil 4.8, $*p < 0.05$). Bu da ekzojen adropin uygulamasının hipokampus bağımlı tanıma belleğine olumlu yönde katkı sağladığını göstermiştir.

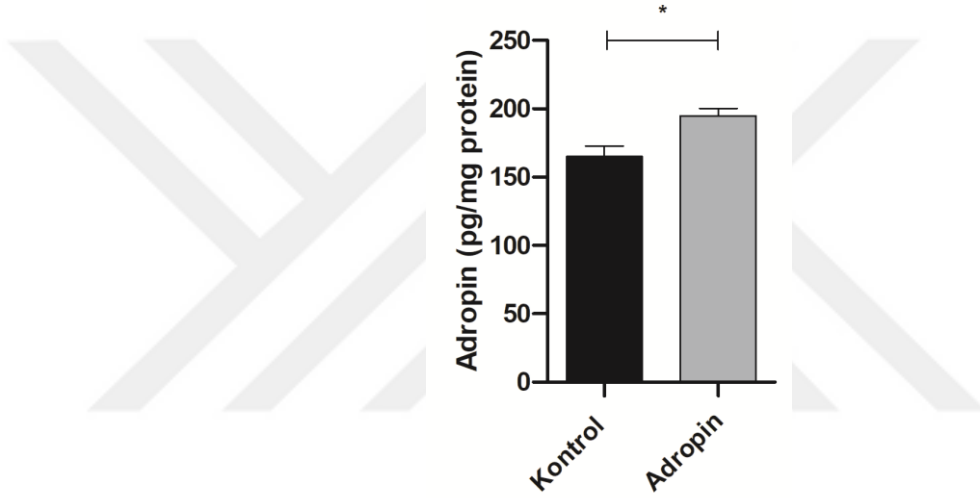


Şekil 4.8. Diskriminasyon indeksi. *: $p < 0.05$ düzeyinde Kontrol grubundan fark.

4.3. Biyokimyasal Analiz Sonuçları

4.3.1. Adropin Miktarının ELISA Yöntemi ile Belirlenmesi

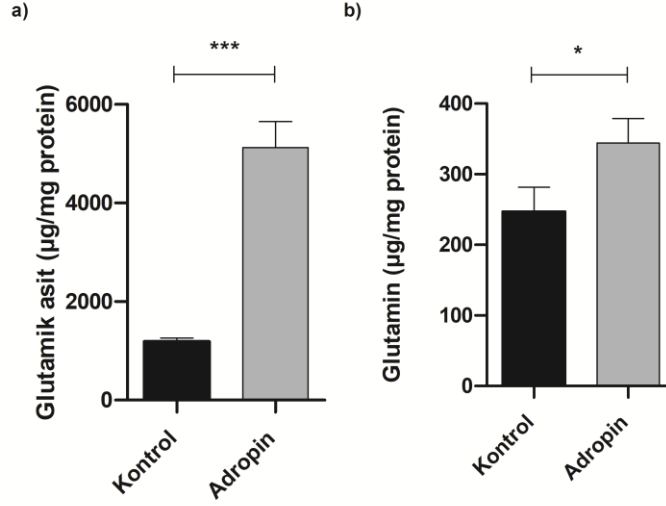
Davranış deneylerini takiben feda edilen sıçanların perfüze edilmiş hipokampus dokularında adropin miktarı belirlenmiştir. Buna göre, intraserebroventriküler enjeksiyon ile adropin verilen grubun hipokampus dokusunda adropin proteininin miktarı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak artış göstermiştir (Kontrol 165.2 ± 7.51 ve Adropin 194.9 ± 5.43 ; $t=3.201$, Şekil 4.9, $p<0.05^*$).



Şekil 4.9. Hipokampus dokusunda adropin miktarı (pg/mg protein). *: $p<0.05$ düzeyinde Kontrol grubundan fark ($n=5$).

4.3.2. Kütle Spektrometresi ile Glutamik Asit ve Glutamin Tayini

Sıçanların hipokampus dokusunda glutamik asit analizi yapıldığında, kontrol grubu ve adropin uygulanan grup arasında anlamlı bir fark bulunmuştur (Kontrol 1195 ± 70.0 ve Adropin 5130 ± 523.1 ; $t=7.457$, 4.10.a, $p<0.0001^{***}$). Glutamin miktarının adropin verilmesi ile hipokampus dokusunda anlamlı bir artış gösterdiği belirlenmiştir (Kontrol 242.2 ± 30.7 ve Adropin 344.1 ± 34.7 ; $t=2.188$, Şekil 4.10.b, $p<0.05^*$).



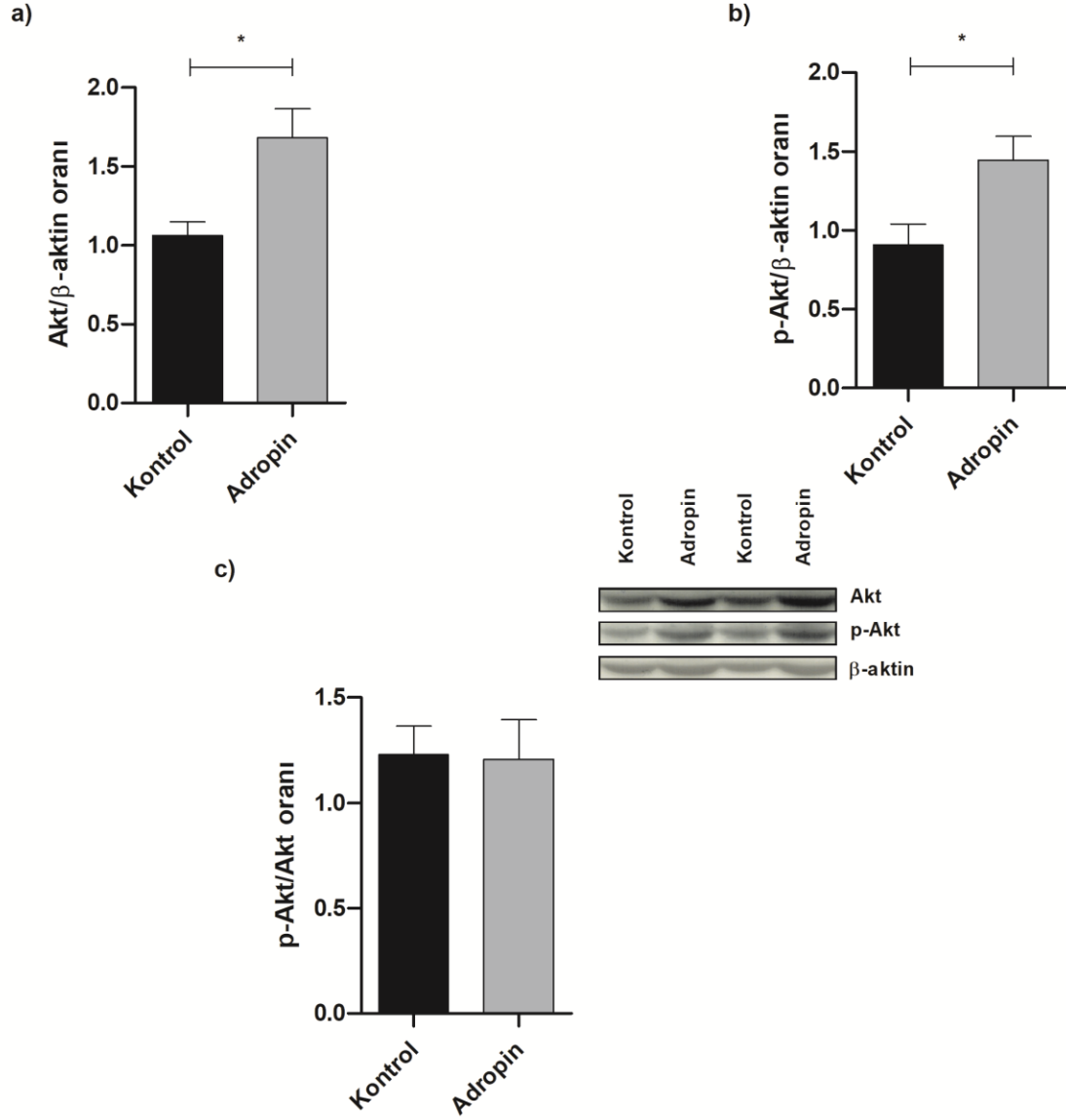
Şekil 4.10. Hipokampus dokusunda glutamik asit ve glutamin seviyeleri (µg/mg protein). *: $p < 0.05$; ***: $p < 0.0001$ düzeyinde Kontrol grubundan fark ($n=9$).

4.4. Western Blot ile Protein Ekspresyonunun Değerlendirmesi

4.4.1. Akt ve p-Akt Protein Ekspresyonları

Lateral ventriküle adropin enjeksiyonu yapılan hayvanlarda Akt protein ekspresyonu kontrol grubuna kıyasla artmış iken (Kontrol 1.063 ± 0.08 ve Adropin 1.681 ± 0.18 ; $t=3.032$, Şekil 4.11.a, $p < 0.05^*$); serin 473.pozisyonundan fosforillenen p-Akt proteininin ekspresyonu da Akt ile benzer profilde olmuş ve adropin verilen grupta kontrol grubuna göre artış gözlemlenmiştir (Kontrol 0.906 ± 0.13 ve Adropin 1.445 ± 0.14 ; $t=2.687$, Şekil 4.11.b, $p < 0.05^*$).

Hipokampus dokusundaki fosforile Akt miktarı toplam Akt ile oranlandığında ise, kontrol grubunda bu oranın 1.228 ± 0.137 değerinde olduğu, adropin enjeksiyonu ile bu oranın 1.207 ± 0.18 ; $t=0.089$ olduğu saptanmıştır (Şekil 4.11.c).

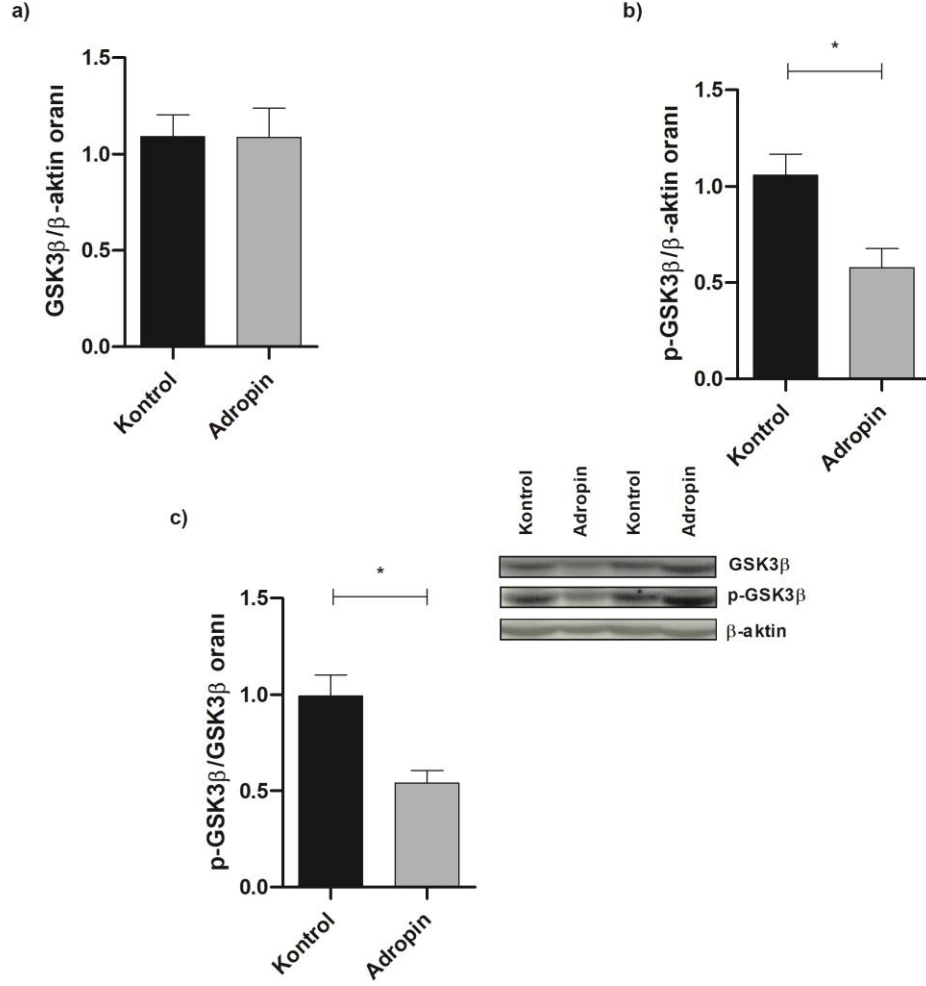


Şekil 4.11. Akt ve p-Akt protein ekspresyon düzeyleri (Relatif protein ekspresyon değerleri oranlanarak verilmiştir). *: $p < 0.05$ düzeyinde Kontrol grubundan fark ($n=4$).

4.4.2. GSK3β ve p-GSK3β Protein Ekspresyonları

Adropin grubunda GSK3β protein ekspresyonunun kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel bir fark tespit edilmemiştir (Kontrol 1.091 ± 0.11 ve Adropin 1.087 ± 0.15 ; $t=0.021$, Şekil 4.12.a, $p > 0.05$). Fakat p-Akt tarafından serin 9 pozisyonundan fosforlanan GSK3β'nın adropin grubunda kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir düşüş gösterdiği bulunmuştur (Kontrol 1.058 ± 0.10 ve Adropin 0.577 ± 0.09 ; $t=3.273$, Şekil 4.12.b, $p < 0.05^*$).

p-GSK β /GSK β oranına bakıldığında, icv adropin enjeksiyonu yapılan gruptaki p-GSK β /GSK β oranının kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir azalma gösterdiği saptanmıştır (Kontrol 0.992 ± 0.10 ve Adropin 0.540 ± 0.06 ; $t=3.566$, Şekil 4.12.c, $p<0.05^*$).

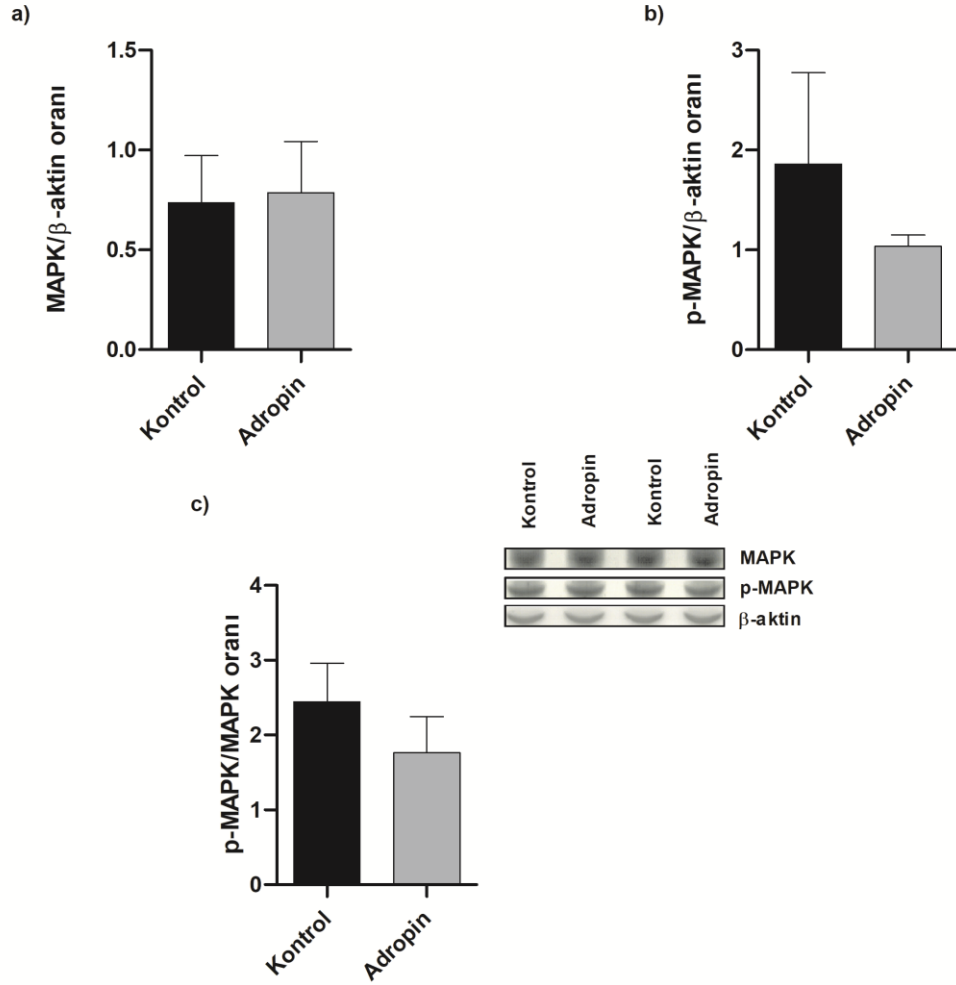


Şekil 4.12. GSK3 β ve p-GSK3 β protein ekspresyon düzeyleri (Relatif protein ekspresyon değerleri oranlanarak verilmiştir). *: $p<0.05$ düzeyinde Kontrol grubundan fark ($n=4$).

4.4.3. MAPK ve p-MAPK Protein Ekspresyonları

MAPK ekspresyonu adropin verilen grupta kontrol grubuna göre anlamlı bir değişiklik göstermemiştir (Kontrol 0.736 ± 0.23 ve Adropin 0.787 ± 0.25 ; $t=0.145$, Şekil 4.13.a, $p>0.05$). Buna ek olarak p-MAPK seviyesi de gruplar arasında farklılık göstermemiştir (Kontrol 1.862 ± 0.91 ve Adropin 1.073 ± 0.11 ; $t=0.894$, Şekil 4.13.b, $p>0.05$).

p-MAPK/MAPK oranı da yolaktaki diğer MAPK protein ekspresyonları gibi gruplar arasında anlamlı bir değişiklik göstermemiştir (Kontrol 2.446 ± 0.51 ve Adropin 1.763 ± 0.48 ; $t=0.968$, Şekil 4.13.c, $p>0.05$).

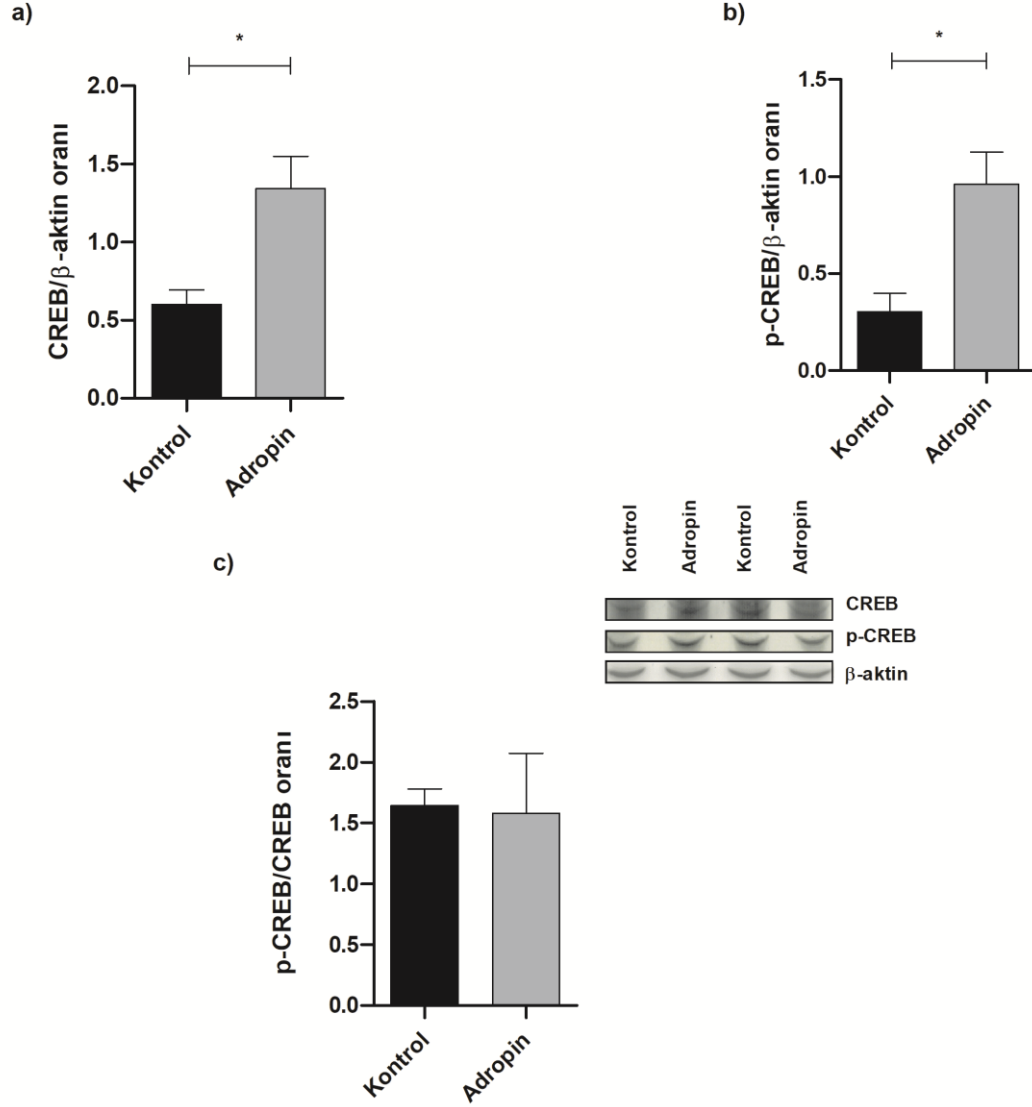


Şekil 4.13. MAPK ve p-MAPK protein ekspresyon düzeyleri (Relatif protein ekspresyon değerleri oranlanarak verilmiştir) (n=4).

4.4.4. CREB ve p-CREB Protein Ekspresyonları

CREB protein ekspresyonu gruplar arasında karşılaştırıldığında adropin uygulanan grupta kontrol grubuna göre anlamlı bir artış olduğu tespit edilmiştir (Kontrol 0.602 ± 0.09 ve Adropin 1.343 ± 0.23 ; $t=3.281$, Şekil 4.14.a, $p<0.05^*$). Fosforile CREB düzeyinin de gruplar arasında istatistiksel bir farklılık gösterdiği saptanmıştır (Kontrol 0.303 ± 0.09 ve Adropin 0.962 ± 0.16 ; $t=3.501$, Şekil 4.14.b, $p<0.05^*$).

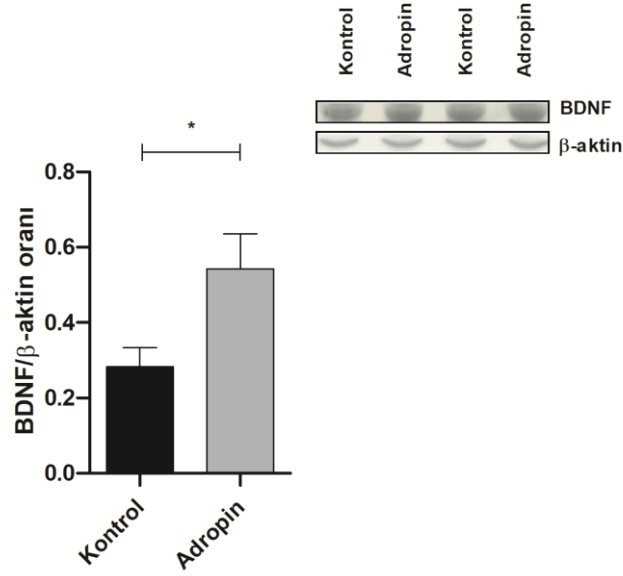
p-CREB/CREB oranı incelendiğinde, icv olarak adropin enjeksiyonu yapılmış grupta kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir artış görülmemiştir (Kontrol 1.645 ± 0.13 ve Adropin 1.582 ± 0.49 ; $t=0.123$, Şekil 4.14.c).



Şekil 4.14. CREB ve p-CREB protein ekspresyon düzeyleri (Relatif protein ekspresyon değerleri oranlanarak verilmiştir). *: $p < 0.05$ düzeyinde Kontrol grubundan fark ($n=4$).

4.4.5. BDNF Protein Ekspresyonu

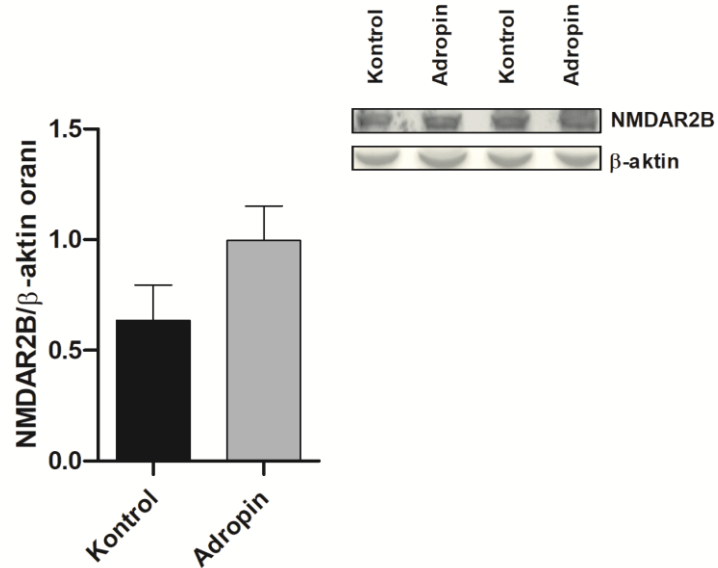
BDNF proteininin ekspresyon profili adropin grubunda kontrol ile karşılaştırıldığında anlamlı bir artış göstermektedir (Kontrol 0.282 ± 0.05 ve Adropin 0.543 ± 0.09 ; $t=2.472$, Şekil 4.15, $p < 0.05^*$).



Şekil 4.15. BDNF protein ekspresyon düzeyi (Relatif protein ekspresyon değerleri oranlanarak verilmiştir). *: $p<0.05$ düzeyinde Kontrol grubundan fark ($n=4$).

4.4.6. NMDA Reseptörü NR2B Alt Birimi Ekspresyonu

Her iki deneysel hayvan grubunda NR2B ekspresyon profili kıyaslandığında adropin uygulaması ile ekspresyonun arttığı fakat istatistiksel anlamlılığa ulaşmadığı belirlenmiştir (Kontrol 0.635 ± 0.15 ve Adropin 0.995 ± 0.15 ; $t=1.621$, Şekil 4.16, $p>0.05$).



Şekil 4.16. NMDA Reseptörü NR2B alt birimi protein ekspresyon düzeyi (Relatif protein ekspresyon değerleri oranlanarak verilmiştir) ($n=4$).

5. TARTIŞMA

Glikoz ve lipid homeostazisinin düzenlenmesinin yanı sıra endotel üzerine koruyucu etki gösteren adropinin merkezi sinir sistemi üzerine etkisini araştıran çalışmalar oldukça kısıtlıdır (Kumar ve ark., 2008; Lovren ve ark., 2010). Wong ve arkadaşları adropinin biyokimyasal özelliklerini ve merkezi sinir sistemindeki etkisini karakterize etmek için yaptıkları bir çalışmada, adropinin kontaktin ailesinden bir molekül olan NB3 aracılığı ile Notch1 sinyal yolağını modüle ettiğini ve böylece sinir sistemi gelişimi esnasında hücre-yüzey etkileşimine aracılık ederek lokomotor aktivite ve motor koordinasyonu düzenlediğini ortaya koymuştur (C. M. Wong ve ark., 2014). Bununla birlikte, adropin knockout farelerde motor koordinasyonun azaldığı ve serebellumda sinaps oluşumunun bozulduğu tespit edilmiştir (C. M. Wong ve ark., 2014). Çalışmamızda adropin dozu, beyin dokusunda eksprese olan ng adropin/mg doku miktarına göre seçilmiştir (Stein ve ark., 2016). Literatüre uygun şekilde, lateral ventriküle altı gün boyunca 1 nmol dozda icv olarak verilen adropinin altıncı gün sonunda motor aktivite testleri gerçekleştirildiğinde, adropinin toplam lokomotor aktivite, katedilen mesafe, ambulator ve horizontal aktiviteyi kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede arttırdığı bulunmuştur.

Yetişkin memeli beyinde hipokampusün subgranüler zonu (SGZ) ve lateral ventrikülün subventriküler zonunda (SVZ) gerçekleşen nörogenez sonucunda fonksiyonel nöronlar ve sinir ağları oluşmaktadır (Eriksson ve ark., 1998; Jin, Minami, ve ark., 2001). Erken nöronal gelişim sırasında Notch1, nöronal prekürsör hücrelerde yüksek oranda eksprese edilir ve nöronal proliferasyon ve farklılaşmanın düzenlenmesinde kritik bir rol oynamaktadır (Artavanis-Tsakonas ve ark., 1999). Öğrenme, bellek ve ruh hali modülasyonu gibi çeşitli beyin fonksiyonlarından sorumlu olan hipokampal nöronlar, Notch1'i yüksek seviyede eksprese etmektedir (J. Song ve ark., 2012; Ding ve ark., 2016). Costa ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, Notch1^{+/-} mutasyonu bulunan heterozigot farelerde uzun süreli spasyal hafızanın bozulduğu gösterilmiştir (Costa ve ark., 2003). Morris Su Tankı testi ile değerlendirilen uzaysal hafızada, Notch1^{+/-} farelerin platform bulma süresinin deneme triallerinde kontrol grubuna kıyasla değişmediği saptanmıştır. 6.gün yapılan prob trial testinde ise Notch1^{+/-} heterozigot

hayvanların kontrol grubuna göre platform bulunan kadranda geçirilen sürenin daha kısa olduğu bulunmuştur. Ek olarak, Notch1^{+/-} ve kontrol grubu hayvanlarda yüzme davranışının ve hızının farklılık göstermediği tespit edilmiştir (Costa ve ark., 2003). Spasyal öğrenme ve bellek oluşumunda hipokampüsün rolünün araştırılmasında kullanılan bir test olan Morris Su Tankı davranış testi, çalışmamızda icv adropin enjeksiyonunun ilk gününden itibaren 6 gün süreyle uygulanmıştır. Sıçanların öğrenme yeteneklerinin değerlendirildiği ilk 5 günlük süreçte, hem adropin hem de kontrol grubu hayvanların platformu bulma süresinin kısaldığı fakat gruplar arasında anlamlı bir farka neden olmadığı tespit edilmiştir. Adropin enjeksiyonunun 6.gününde bellek kapasitesi prob trial deneyi ile belirlenmiştir. Motor fonksiyonlardaki bozukluğun Morris Su Tankı testini etkileyip etkilemediğini değerlendirmek için hayvanların ortalama hız parametresi incelenmiştir. Bu şüphe, prob trial gününde gruplar arasında ortalama hız bakımından bir farklılık görülmemesi ile giderilmiştir. Prob trial testinde 1 nmol dozda 6 gün boyunca uygulanan adropinin hedef kadranda bulunma süresi ve hedef kadrana giriş frekansını kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir şekilde arttırdığı bulunmuştur. Literatür ile uyumlu olan bu verilerimize ek olarak prob trial testinde katedilen toplam mesafe parametresi de değişiklik göstermemiştir. Bu bilgiler doğrultusunda adropinin spasyal öğrenme ve bellek üzerine olan olumlu etkisinin Notch1 sinyal yolağı aracılığı ile olabileceğini düşündürmektedir.

Uzaysal çalışma belleğinin analiz edilmesinde kullanılan bir diğer davranış deneyi olan Y. maze testi, hayvanın Y şeklindeki labirentin üç kolunu da özgürce keşfetmesine izin verilerek değerlendirilmektedir (Kraeuter ve ark., 2019). Kemirgenlerin doğuştan gelen keşfetme merakının söz konusu olduğu bu testte, iyi bir çalışma belleğine sahip hayvan daha önce gezdiği labirentin kollarını tanımalı ve daha az ziyaret ettiği kola girme eğilimi göstermelidir. Beynin hipokampüs ve prefrontal korteks gibi birkaç farklı bölgesinin etkileşimini gerektiren Y maze testinde, test düzeneğinin bir kolu kapalı iken 15 dakikalık alıştırma süresince uzaysal referans bellek ölçülmektedir (Kraeuter ve ark., 2019). Çalışmamızda 4 saatlik süre sonunda Y maze test düzeneğine geri konan adropin grubu hayvanların yeni kolda geçirdiği süre kontrol grubu sıçanların yaklaşık 9 katına çıkmıştır. Daha önce yapılan çalışmalarda hipokampüste p-Akt, p-CREB ve BDNF sinyal yollarının aktive olmasını takiben hem Y-maze hem de Morris Su Tankı

davranış testlerinde uzaysal öğrenmenin ve belleğin artış gösterdiği belirlenmiştir (Pariyar ve ark., 2017; Ahmed ve ark., 2019). Literatür ile uyumlu şekilde çalışmamızda, icv adropin uygulamasının hipokampüste PI3K/Akt sinyal yolağını aktive ettiği, p-CREB ekspresyonunun artışı ile birlikte BDNF üretimini arttırdığı ve davranış tesleri ile bu artışların doğrulandığı tespit edilmiştir.

Uzun süreli belleğin ölçülmesinde kullanılan bir davranış testi olan obje lokalizasyon testinde, hipokampüsteki kodlama, depolama, birleştirme ve geri çağırma aşamalarının oluşumu gerekmektedir (Haettig ve ark., 2011). OLT davranış deneyinde eğitim ve prob trialı arasında 24 ila 48 saat arasında bir süre geçmesi uzun süreli bellek ile ilgili yeni proteinlerin transkripsiyonunu ve translasyonunu sağlamaktadır (Vogel-Ciernia ve Wood, 2014). Kemirgenin doğuştan gelen yenilik tercihinin dayanarak yapılan bu davranış testinin Morris Su Tankı testine göre daha az stresli olması ve kolay uygulanabilirliği tercih konusu olmaktadır (Vogel-Ciernia ve Wood, 2014). OLT testinde sıçanların yeni ve eski lokasyondaki nesneler ile geçirdiği süre ölçülmüştür. Çalışmamızda 6 gün boyunca icv adropin uygulanan sıçanların yeni obje ile geçirdikleri zamanın kontrol grubuna kıyasla oldukça fazla olduğu saptanmıştır. Bu davranışın tercihen gerçekleşip gerçekleşmediğini gösteren diskriminasyon indeksi de adropin uygulanan hayvanda kontrol grubuna göre anlamlı bir artış göstermiştir. Yapılan çalışmalarda hipokampüste BDNF artışını takiben obje lokalizasyon belleğinin arttığı ve TrkB reseptörleri aracılığıyla sinaptik plastisiteye katkı sağladığı tespit edilmiştir (Intlekofer ve ark., 2013; W. Li ve ark., 2017). Çalışmamızda da literatür ile uyumlu şekilde, adropin uygulaması ile hipokampus dokusunda Akt/CREB yolağı aktivasyonu gerçekleşmiş ve buna bağlı olarak da BDNF ekspresyonu kontrol grubuna göre anlamlı bir artış gösterdiği saptanmıştır.

Nöronal aktivasyon durumunda CREB proteininin aktivasyonunu sağlayan diğer bir sinyal yolağı olan Notch1, uzun süreli bellek oluşumunda rol oynayan önemli bir hücre yüzey reseptörüdür (Ge ve ark., 2004). Fosforile şekilde nükleusa girerek plastisite ve bellek ile ilişkili genlerin ekspresyonunu tetikleyen p-CREB, Notch1'in spesifik olarak dentat girusta knockout yapıldığı hayvanlarda azalma göstermiştir (Feng ve ark., 2017). Notch1, apolipoprotein reseptör 2 (ApoER2) ve NMDA reseptörü gibi postsinaptik

reseptörler ile etkileşime girmektedir ve glutamaterjik nörotransmisyonu azaltarak CREB sinyalizasyonunu azaltmaktadır (Brai ve ark., 2015b). Çalışmamızda hipokampus dokusundaki toplam CREB protein düzeyi ile fosforile CREB seviyesi belirlenmiştir. Bizim çalışmamızda adropin uygulamasının p-CREB düzeyini arttığı tespit edilmiştir.

Notch1 sinyal yolağı, sinaptik plastisite ve bellek üzerine olan etkisini diğer bir ekstrasellüler matriks glikoproteini olan reelin ile yapmaktadır (Tissir ve ark., 2003). Reelin protein, yetişkin beyinde sinaptik plastisite, aksonal gelişim ve dendrit morfolojisinin düzenlenmesini sağlamaktadır (Fatemi, 2005). Reelin eksprese eden nöronlar entorinal korteksin II.tabakasındaki glutamaterjik piramidal nöronlardır ve hipokampüsün CA1 ve DG bölgelerine projekte olmaktadır (Santos-Fandila ve ark., 2013). Aksonların soma ve sinaptik terminallerinden salınan reelin, ApoER2 ve düşük yoğunluklu lipoprotein reseptörü (LDLR) gibi reseptörlere bağlanarak NMDA reseptör fonksiyonu ve buna bağlı olarak LTP'nin artmasına neden olmaktadır (Y. Chen, Beffert, ve ark., 2005). Brai ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, Notch1'in hipokampüste reelin reseptör etkileşimini arttırarak hücre içerisinde CREB sinyalini uyardığı ve NMDA reseptörü ekspresyonunu düzenlediği bulunmuştur (Brai ve ark., 2015a). Reelin, hücre içerisinde PI3K/Akt yolağını aktive etmekle birlikte NMDA reseptörü NR2B alt biriminin ekspresyonunu ve membrana lokalizasyonunu arttırmaktadır (Paxinos, 1997; Qiu ve Weeber, 2007). Reelin proteinini overeksprese eden transgenik farelerde dendritik spinlerin uzadığı, glutamaterjik nörotransmisyon ve LTP'nin arttığı tespit edilmiştir (Teixeira ve ark., 2011). Akut reelin uygulaması ile uzaysal öğrenme ve bellek artarken; reelin sinyalizasyonunun bozulması ile hipokampus bağımlı Morris Su Tankı testinde performansın azaldığı gösterilmiştir (Pujadas ve ark., 2010; Stranahan ve ark., 2011). Bizim çalışmamızda, icv adropin uygulaması ile Akt/CREB yolağının aktive olması, NMDA reseptörünün NR2B alt biriminin ekspresyonunun artması ve Morris Su Tankı ile Y maze testlerinde uzaysal öğrenmenin gerçekleşmesi, hipokampüste reelin üzerinden adropin bağımlı bir sinyalizasyonun olabileceğini düşündürmektedir.

Sitokinler, insülin, VEGF ve diğer bazı büyüme faktörleri PI3K'ı uyararak Akt'nin fosforile olmasına neden olmaktadır. 308. pozisyonda bulunan treonin ve 473.

pozisyonundaki serin amino asidinin fosforillenmesi ile aktive olan Akt, yalnızca Serin-473 bölgesinden fosforlanarak da aktive olabilen bir protein kinazdır (H. Y. Wang, Wang, ve ark., 2009). Endotel hücreleri üzerinde adropinin etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, adropin uygulamasının Akt'nin serin 473 pozisyonundan fosforilasyonunu arttırdığı, bunu da VEGFR2 üzerinden gerçekleştirdiği bildirilmiştir (Lovren ve ark., 2010). Benzer şekilde çalışmamızda ekzojen olarak uyguladığımız adropin, fosforile Akt düzeyini kontrol grubuna kıyasla anlamlı şekilde arttırmıştır. Serin 473 bölgesinden fosforile olan Akt, sinyal kaskadında bulunan bir diğer aracı protein olan GSK3 β 'nin 9.pozisyonunda bulunan serin amino asitini fosforile ederek aktif GSK3 β 'yı inaktif forma dönüştürmektedir (Grimes ve Jope, 2001b). Grimes ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, lityum uygulaması ile inaktif hale getirilen GSK3 β 'nin CREB'in DNA'ya bağlanma aktivitesini arttırdığı saptanmıştır (Grimes ve Jope, 2001a). Çalışmamızda serin 473 pozisyonundan fosforile olan Akt'nin ekspresyonu western blot yöntemi ile analiz edilmiştir. 1 nmol dozda 6 gün boyunca icv olarak uygulanan adropin hipokampüste p-Akt ekspresyonunu kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir şekilde arttırmıştır. Akt'nin sinyal kaskadında altında bulunan ve aktivitesini düzenlediği bir enzim olan p-GSK3 β 'nin ekspresyonu ise adropin grubu hayvanların hipokampüsünde azalma göstermiştir. Literatür ile uyumlu olmayan bu sonuç Akt'nin CREB fosforilasyonunu GSK3 β olmaksızın yaptığını göstermektedir. GSK3 β 'nin bu sinyal yolağındaki rolünün tam olarak anlaşılabilmesi için inhibitörü olan lityum veya SB216763 kimyasallarının ayrı bir hayvan grubunda uygulanarak test edilmesi gerekmektedir. Bunlara ek olarak nöronların nükleusunda bulunan CREB, hücre içerisindeki PKA, CaMKII, MAPK ve diğer kinazlar ile fosforlanarak hedefi olan CRE bağlanıp farklılaşma, nörogenez, uzun dönem sinaptik değişiklik ve sağ kalım ile ilgili birçok genin ekspresyonunu düzenlemektedir (Alberini, 2009). Hipokampal nöronların aktive olması ile uyarılan MAPK sinyal yolağı, öğrenme ve bellek oluşumunda görev alan CREB'i serin 133.pozisyonundan fosforile etmektedir (G. Y. Wu ve ark., 2001). Çalışmamızda MAPK ve p-MAPK protein ekspresyonunun adropin uygulaması ile değişiklik göstermediği saptanmıştır. Bu sonuçlar adropinin uzaysal öğrenme ve bellek performansı üzerine olan olumlu etkisinin MAPK yolundan ziyade PI3K/Akt üzerinden gerçekleştiğini göstermektedir.

Luck ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen bir araştırmada, hem *in vitro* hem de *in vivo*'da hipokampus CA3 nöronları aksonal dallanmasının VEGF/VEGFR2 sinyalizasyonu ile düzenlendiği gösterilmiştir (Luck ve ark., 2019). VEGF'nin intraserebral uygulandığı sıçanlarda veya VEGF overeksprese eden transgenik hayvan modellerinde, VEGFR2 aracılı nörogenez ve hipokampus bağımlı kognisyon artışı tespit edilmiştir (Jin ve ark., 2002; Cao ve ark., 2004; Schanzer ve ark., 2004). Buna ek olarak, endojen VEGF blokajının hipokampüste asosiyatif öğrenmeyi bozduğu gösterilmiştir (Licht ve ark., 2011). Son yıllarda yapılmış bir diğer araştırmada, VEGF'nin NMDA reseptörü NR2B alt biriminin dağılımını düzenlediği ve bu reseptörlerin membrandaki düzeyini arttırdığı bulunmuştur (De Rossi ve ark., 2016). Yine aynı çalışmada nöronal hücrelerde VEGFR2 ekspresyonunun susturulması ile hipokampus bağımlı sinaptik plastisitenin ve emosyonel bellek konsolidasyonunun bozulduğu tespit edilmiştir (De Rossi ve ark., 2016). Çalışmamızda da ekzojen olarak lateral ventriküle uygulanan adropinin, hipokampüste VEGFR2 aracılı ile hücre içi sinyal yollarını aktive ederek NMDA reseptörü NR2B alt birimi ekspresyonunu uyarmış olduğunu işaret etmektedir.

Uzaysal hafıza ve öğrenme işlemlerinin birçoğunda aktive olan CREB proteini, BDNF'nin promotor dizisine bağlanarak ekspresyonunu uyarmaktadır ve nörogeneze katkıda bulunmaktadır (Sekerer ve ark., 2010). Yapılan araştırmalarda BDNF'nin kendi tropomiyozin reseptör kinaz (Trk) B reseptörlerine bağlanarak da CREB'i aktive edebildiği ortaya konmuştur (Finkbeiner ve ark., 1997). Jain ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, sıçanlarda BDNF'nin TrkB reseptörü aracılığı ile PI3K/Akt yollarını aktive ederek GSK3 β inaktivasyonunu sağladığı ve bunu takiben CREB'in fosforilasyonunu uyarak nükleusa translokasyonunu arttırdığı bulunmuştur (Jain ve ark., 2013). Bizim çalışmamızda da, lateral ventriküle verilen adropinin CREB fosforilasyonu artışına paralel olarak BDNF ekspresyonunu arttırdığı saptanmıştır. Tüm bu çalışmalar, adropin ile artan BDNF seviyesi ile uyarılan TrkB reseptör aktivasyonunun hücre içerisinde PI3K/Akt yolağını aktifleştirerek CREB fosforilasyonuna neden olduğunu, dolayısı ile uzaysal hafızayı etkilediği ve nörodejenereasyona karşı koruyucu etkinin bu yollar üzerinden ortaya konabileceğini göstermektedir.

Nöronal hücre popülasyonları üzerinde protektif etki gösteren ve gelişimi düzenleyen nörotrofinlerden BDNF, TrkB reseptörü aracılığıyla MAPK, PI3K/Akt ve CaMKIV yollarını aktive ederek CREB'in nükleusa lokasyonunu arttırmaktadır (Deak ve ark., 1998; Finsterwald ve ark., 2010). BDNF ve TrkB, NMDA reseptörüne bağlı oluşan LTP ve hem presinaptik hem de postsinaptik mekanizma ile sinaps oluşumunda rol oynamaktadır (Pang ve ark., 2004). Ayrıca NMDA reseptörleri ile birlikte lokalize olan PSD-95'in membranda TrkB reseptörleri ile de birlikte bulunduğu saptanmıştır (K. Wu ve ark., 1996; Hering ve ark., 2003). Hipokampal sinapsların postsinaptik membranında bulunan TrkB reseptörü, PI3K ve Akt yollarını uyararak yeni protein yapımını sağlamaktadır (Tang ve ark., 2002). Ayrıca dendritik uzantılarda bulunan PI3K'nın NMDA'nın da içinde bulunduğu birçok hücre yüzey iyon kanalının trafiğini düzenlediği bilinmektedir (Viard ve ark., 2004). Hipokampal sinapslarda BDNF stimülasyonu sonucunda, PI3K ve Akt yollarının aktive olması birçok protein sentezi ile birlikte NMDA aracılı LTP oluşumuna neden olmaktadır (Kovalchuk ve ark., 2002; Yoshii ve Constantine-Paton, 2007). Çalışmamızda adropin verilen sıçanların hipokampus dokusunda MAPK ekspresyonunun artış göstermediği saptanmış; fakat adropinin hipokampüste PI3K ve Akt yollarını aktive ederek NMDA reseptörü ekspresyonunda artışa neden olabileceğini düşündürmüştür. Bununla birlikte lateral ventriküle yedi gün boyunca uygulanan adropinin, VEGF2 reseptörüne bağlanarak da hücre içerisinde Akt yolağını uyarabileceği, bunun sonucunda yeni BDNF ve NMDA reseptör yapımını sağlayabileceği öngörülmektedir.

Artan BDNF düzeyi ile birlikte PI3K/Akt yolağı aktive olduktan sonra bir aracı protein (Girdin) yardımıyla NMDA reseptörünün NR2B alt birimi fosforlanarak LTP oluşumu uyarılmaktadır (Lu ve ark., 1998; Salter ve Kalia, 2004). Guscott ve arkadaşları tarafından yapılan bir araştırmada, selektif bir NR2B antagonisinin sıçanlara verilmesini takiben yapılan Morris Su tankı deneyinde uzaysal hafızanın bozulmadığı ortaya konmuştur (Guscott ve ark., 2003). Yapılan bir diğer çalışmada, NR2B aktivitesinin sinaptik potansiyalizasyon ve LTP için gerekli olmadığı gösterilmiştir (Liu ve ark., 2004).

Dopamin D2 reseptör ailesinden bir transmembran reseptör olan GPR19, adropinin potansiyel reseptörü olarak tanımlanmıştır (O'Dowd ve ark., 1996; Stein ve ark., 2016). Serebellum, putamen, talamus gibi bölgelere ek olarak hipokampüste de ekspresyonu tespit edilen GPR19 reseptörü, adropin uygulaması ile aktive olarak hücre içerisinde Akt ve MAPK yollarını uyarmaktadır (Stein ve ark., 2016). Çalışmamızda 1 nmol dozda adropin uygulaması ile Akt fosforilasyonunun artarak CREB'in nükleusa translokasyonunu uyarması, etkinin hipokampüsteki GPR19 reseptörü aracılığıyla olabileceğini göstermektedir.

Memeli beyinde bulunan majör eksitator nörotransmitter glutamatin, sinaptik aralıkta yüksek konsantrasyonda bulunması toksik etki göstererek nöronal ölümü tetiklemektedir (Greene ve Greenamyre, 1996). Fizyolojik nörotransmisyon sonrası eksitotoksisiteyi önlemek için glutamat hızlıca sinaptik aralıktan uzaklaştırılarak glial hücrelerde glutamine dönüştürülmektedir ve ardından tekrar presinaptik nörona taşınarak glutaminaz enzimi aracılığı ile glutamata dönüştürülmektedir (Bak ve ark., 2006; Walton ve Dodd, 2007). Dolayısı ile bu glutamat-glutamin döngüsünün sıkı bir şekilde kontrol edilmesi gerekmektedir (Pomara ve ark., 1992). Jing ve arkadaşlarının esansiyel amino asitlerden glutamin ve glutamatin uzaysal hafıza ve öğrenme üzerine etkisini araştırdıkları bir çalışmada, glutamince zengin (%2) içerikli diyet ile beslenen sıçanların aktif sakınma cevap sürelerinin (latans) uzadığı, beyin nitrik oksit sentaz (NOS) ve NMDA reseptör aktivitesini arttığı bulunmuştur. Araştırmacılar glutaminin bu artışının, beyindeki amino asit kompozisyonunu değiştirerek yapabileceğini bildirmişlerdir (Jing ve ark., 2000). Kognitif fonksiyonlarda nöromodülatör olarak rol alan glutamin, GABA ile bir denge içerisinde bulunmaktadır. Beyindeki yüksek GABA düzeyi kortikal eksitabiliteyi azaltırken, glutamin seviyesinin artması ise kognitif fonksiyonlarda gelişmeye neden olmaktadır (Jongkees ve ark., 2017). Bununla birlikte, yüksek glutamin seviyesi ile birlikte artış gösteren LTP'ye NMDA reseptör aktivasyonu neden olmaktadır (Ziemann ve Siebner, 2008). Nikolova ve arkadaşları tarafından yapılan bir araştırmada glutamin-glutamat içeriğinin yüksek olduğu hipokampuslarda sözlü hafıza performanslarının yüksek olduğu tespit edilmiştir (Nikolova ve ark., 2017). Kütle spektrometrisi ile hipokampus dokusunda glutamin ve glutamik asit düzeylerini belirlediğimizde, intraserebroventriküler adropin verilen grupta glutamin ve glutamik

asit seviyelerinin kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede arttığını görmekteyiz. Bununla birlikte, adropin uygulanan grupta literatür ile uyumlu şekilde NMDA reseptörü NR2B alt birimi ekspresyonunun kontrol grubuna kıyasla artış gösterdiği saptanmıştır. Uzaysal öğrenme ve hafızanın ölçüldüğü Morris Su Tankı ve Y maze davranış testleri ile de adropinin bellek performansını arttırdığı bulunmuştur. Ayrıca, uzaysal kognitif yetenekleri ölçmek amacıyla gerçekleştirdiğimiz obje lokalizasyon testinde adropinin hipokampus bağımlı obje tanıma belleğine kattığı bu olumlu etkinin glutamin ve glutamat aracılığı ile olduğunu işaret etmektedir.

Sonuç olarak çalışmamızda, Sprague Dawley sıçanlarının lateral ventriküllerine yerleştirilen bir kanül aracılığıyla 6 gün boyunca 1 nmol dozda adropin verilmesinin hipokampal öğrenme ve bellek üzerine olumlu etkisinin olduğu; bulgularımızın ışığı altında adropinin MAPK ve GSK3 β yolağından ziyade Akt/CREB yolağı ile BDNF ve NMDA reseptörü NR2B alt birimi ekspresyonunu sağlayarak etki ettiğini göstermektedir. Ayrıca adropinin VEGFR2 ve GPR19 reseptörleri aracılığıyla da hücre içi yolakları uyarıp bellek performansını etkileyebileceği öngörülmektedir. Adropinin etki ettiği bu mekanizmaların aydınlatılması için daha ileri çalışmalara gereksinim duyulmaktadır.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

- 1) Adropin uygulamasının sıçanlarda spasyal bellek ile ilgili parametreleri olumlu yönde etkilediği saptanmıştır.
- 2) Lateral ventriküle verilen adropinin hipokampüs dokusunda Akt sinyal yolağını aktive ettiği bulunmuştur.
- 3) Fosforile Akt artışı ile paralel olarak CREB transkripsiyon faktörünün ekspresyonunda da artış olduğu saptanmıştır.
- 4) Spasyal öğrenmenin göstergesi olan sinaptik plastisite proteini BDNF'nin adropin verilen grubun hipokampüs dokusunda arttığı izlenmiştir.
- 5) MAPK ve GSK3 β sinyal yolağı proteinlerinin düzeyi adropin uygulaması ile değişiklik göstermemiştir.
- 6) Adropin uygulaması ile hipokampüs dokusunda NMDA reseptörü NR2B alt birimi kontrol grubuna kıyasla artış göstermiş fakat istatistiksel bir anlamlılık seviyesine ulaşmamıştır.
- 7) Glutamin ve glutamik asit düzeylerinin kontrol grubuna göre adropin uygulamasıyla anlamlı bir şekilde arttığı tespit edilmiştir.

KAYNAKLAR

- Adams, J. P., & Dudek, S. M. Late-phase long-term potentiation: Getting to the nucleus. *Nature Reviews Neuroscience*. 2005; 6 (9): 737-743.
- Ahmed, A., Zeng, G., Jiang, D., Lin, H., Azhar, M., Farooq, A. D., . . . Wang, Q. Time-dependent impairments in learning and memory in streptozotocin-induced hyperglycemic rats. *Metabolic brain disease*. 2019; 34 (5): 1431-1446.
- Alaei, H., Moloudi, R., Sarkaki, A. R., Azizi-Malekabadi, H., & Hanninen, O. Daily running promotes spatial learning and memory in rats. *Journal of sports science & medicine*. 2007; 6 (4): 429-433.
- Alberini, C. M. Transcription factors in long-term memory and synaptic plasticity. *Physiological Reviews*. 2009; 89 (1): 121-145.
- Alonso, M., Medina, J. H., & Pozzo-Miller, L. Erk1/2 activation is necessary for bdnf to increase dendritic spine density in hippocampal ca1 pyramidal neurons. *Learning & Memory*. 2004; 11 (2): 172-178.
- Alonso, M., Vianna, M. R., Depino, A. M., Mello e Souza, T., Pereira, P., Szapiro, G., . . . Medina, J. H. Bdnf-triggered events in the rat hippocampus are required for both short- and long-term memory formation. *Hippocampus*. 2002; 12 (4): 551-560.
- Amaral, M. D., & Pozzo-Miller, L. Trpc3 channels are necessary for brain-derived neurotrophic factor to activate a nonselective cationic current and to induce dendritic spine formation. *Journal of Neuroscience*. 2007; 27 (19): 5179-5189.
- Annovazzi, L., Mellai, M., Caldera, V., Valente, G., Tessitore, L., & Schiffer, D. Mtor, s6 and akt expression in relation to proliferation and apoptosis/autophagy in glioma. *Anticancer Research*. 2009; 29 (8): 3087-3094.
- Aoki, C., Wu, K., Elste, A., Len, G., Lin, S., McAuliffe, G., & Black, I. B. Localization of brain-derived neurotrophic factor and trkb receptors to postsynaptic densities of adult rat cerebral cortex. *Journal of Neurosci Research*. 2000; 59 (3): 454-463.
- Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M. D., & Lake, R. J. Notch signaling: Cell fate control and signal integration in development. *Science*. 1999; 284 (5415): 770-776.

- Atkinson, R. C., & Shiffrin, R. M. (1968). Human memory: A proposed system and its control processes. In J. T. S. Kenneth W. Spence (Ed.), *Psychology of learning and motivation* (Vol. 2, pp. 89-195): Academic Press.
- Aydin, S. Three new players in energy regulation: Preptin, adropin and irisin. *Peptides*. 2014; 56: 94-110.
- Aydin, S., Kuloglu, T., Aydin, S., Eren, M. N., Yilmaz, M., Kalayci, M., . . . Kendir, Y. Expression of adropin in rat brain, cerebellum, kidneys, heart, liver, and pancreas in streptozotocin-induced diabetes. *Molecular and Cell Biochemistry*. 2013; 380 (1-2): 73-81.
- Bailey, C. H., & Chen, M. Morphological basis of long-term habituation and sensitization in aplysia. *Science*. 1983; 220 (4592): 91-93.
- Bailey, C. H., Kandel, E. R., & Harris, K. M. Structural components of synaptic plasticity and memory consolidation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2015; 7 (7): a021758.
- Bak, L. K., Schousboe, A., & Waagepetersen, H. S. The glutamate/gaba-glutamine cycle: Aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer. *Journal of Neurochemistry*. 2006; 98 (3): 641-653.
- Baltzis, D., Pluquet, O., Papadakis, A. I., Kazemi, S., Qu, L. K., & Koromilas, A. E. The eif2alpha kinases perk and pkr activate glycogen synthase kinase 3 to promote the proteasomal degradation of p53. *The Journal of biological chemistry*. 2007; 282 (43): 31675-31687.
- Barde, Y. A., Edgar, D., & Thoenen, H. Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBO Journal*. 1982; 1 (5): 549-553.
- Barth, A. I., Caro-Gonzalez, H. Y., & Nelson, W. J. Role of adenomatous polyposis coli (apc) and microtubules in directional cell migration and neuronal polarization. *Seminars in cell & developmental biology*. 2008; 19 (3): 245-251.
- Bartsch, D., Casadio, A., Karl, K. A., Serodio, P., & Kandel, E. R. Creb1 encodes a nuclear activator, a repressor, and a cytoplasmic modulator that form a regulatory unit critical for long-term facilitation. *Cell*. 1998; 95 (2): 211-223.

- Bashir, Z. I., Alford, S., Davies, S. N., Randall, A. D., & Collingridge, G. L. Long-term potentiation of nmda receptor-mediated synaptic transmission in the hippocampus. *Nature*. 1991; 349 (6305): 156-158.
- Beattie, E. C., Carroll, R. C., Yu, X., Morishita, W., Yasuda, H., von Zastrow, M., & Malenka, R. C. Regulation of ampa receptor endocytosis by a signaling mechanism shared with ltd. *Nature neuroscience*. 2000; 3 (12): 1291-1300.
- Beaulieu, J. M., Del'guidice, T., Sotnikova, T. D., Lemasson, M., & Gainetdinov, R. R. Beyond camp: The regulation of akt and gsk3 by dopamine receptors. *Frontiers in molecular neuroscience*. 2011; 4: 38.
- Bhat, R. V., Shanley, J., Correll, M. P., Fieles, W. E., Keith, R. A., Scott, C. W., & Lee, C. M. Regulation and localization of tyrosine216 phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 β in cellular and animal models of neuronal degeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000; 97 (20): 11074-11079.
- Bliss, T. V., & Collingridge, G. L. A synaptic model of memory: Long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*. 1993; 361 (6407): 31-39.
- Bliss, T. V., & Lomo, T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *Journal of Physiology*. 1973; 232 (2): 331-356.
- Blum, S., Moore, A. N., Adams, F., & Dash, P. K. A mitogen-activated protein kinase cascade in the ca1/ca2 subfield of the dorsal hippocampus is essential for long-term spatial memory. *Journal of Neuroscience*. 1999; 19 (9): 3535-3544.
- Boku, S., Nakagawa, S., Masuda, T., Nishikawa, H., Kato, A., Kitaichi, Y., . . . Koyama, T. Glucocorticoids and lithium reciprocally regulate the proliferation of adult dentate gyrus-derived neural precursor cells through gsk-3 β and beta-catenin/tcf pathway. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*. 2009; 34 (3): 805-815.
- Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 1976; 72: 248-254.

- Bradley, C. A., Peineau, S., Taghibiglou, C., Nicolas, C. S., Whitcomb, D. J., Bortolotto, Z. A., . . . Collingridge, G. L. A pivotal role of gsk-3 in synaptic plasticity. *Frontiers in molecular neuroscience*. 2012; 5: 13.
- Brai, E., Marathe, S., Astori, S., Fredj, N. B., Perry, E., Lamy, C., . . . Alberi, L. Notch1 regulates hippocampal plasticity through interaction with the reelin pathway, glutamatergic transmission and creb signaling. *Frontiers in cellular neuroscience*. 2015a; 9: 447.
- Brai, E., Marathe, S., Astori, S., Fredj, N. B., Perry, E., Lamy, C., . . . Alberi, L. Notch1 regulates hippocampal plasticity through interaction with the reelin pathway, glutamatergic transmission and creb signaling. *Frontiers in cellular neuroscience*. 2015b; 9: 447.
- Bramham, C. R., & Messaoudi, E. Bdnf function in adult synaptic plasticity: The synaptic consolidation hypothesis. *Progress in Neurobiology*. 2005; 76 (2): 99-125.
- Bramham, C. R., & Wells, D. G. Dendritic mrna: Transport, translation and function. *Nature Reviews Neuroscience*. 2007; 8 (10): 776-789.
- Bulbul, M., Sinen, O., Ozkan, A., Aslan, M. A., & Agar, A. Central neuropeptide-s treatment improves neurofunctions of 6-ohda-induced parkinsonian rats. *Experimental Neurology*. 2019; 317: 78-86.
- Caldeira, M. V., Melo, C. V., Pereira, D. B., Carvalho, R. F., Carvalho, A. L., & Duarte, C. B. Bdnf regulates the expression and traffic of nmda receptors in cultured hippocampal neurons. *Molecular and Cellular Neuroscience*. 2007; 35 (2): 208-219.
- Cao, L., Jiao, X., Zuzga, D. S., Liu, Y., Fong, D. M., Young, D., & During, M. J. Vegf links hippocampal activity with neurogenesis, learning and memory. *Nature genetics*. 2004; 36 (8): 827-835.
- Carew, T. J., Walters, E. T., & Kandel, E. R. Classical conditioning in a simple withdrawal reflex in *aplysia californica*. *Journal of Neuroscience*. 1981; 1 (12): 1426-1437.

- Castellucci, V. F., & Kandel, E. R. A quantal analysis of the synaptic depression underlying habituation of the gill-withdrawal reflex in aplysia. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1974; 71 (12): 5004-5008.
- Celik, A., Balin, M., Kobat, M. A., Erdem, K., Baydas, A., Bulut, M., . . . Aydin, S. Deficiency of a new protein associated with cardiac syndrome x; called adropin. *Cardiovascular therapeutics*. 2013; 31 (3): 174-178.
- Chao, M. V. Neurotrophins and their receptors: A convergence point for many signalling pathways. *Nature Reviews Neuroscience*. 2003; 4 (4): 299-309.
- Chen, P., Gu, Z., Liu, W., & Yan, Z. Glycogen synthase kinase 3 regulates n-methyl-d-aspartate receptor channel trafficking and function in cortical neurons. *Molecular pharmacology*. 2007; 72 (1): 40-51.
- Chen, Y., Beffert, U., Ertunc, M., Tang, T. S., Kavalali, E. T., Bezprozvanny, I., & Herz, J. Reelin modulates nmda receptor activity in cortical neurons. *J Neurosci*. 2005; 25 (36): 8209-8216.
- Chen, Z. Y., Ieraci, A., Tanowitz, M., & Lee, F. S. A novel endocytic recycling signal distinguishes biological responses of trk neurotrophin receptors. *Molecular Biology of the Cell*. 2005; 16 (12): 5761-5772.
- Clark, G. The organization of behavior: A neuropsychological theory. D. O. Hebb. John wiley and sons, inc., new york, 1949, 335 pages, 19 illustrations, 288 references.
- Journal of Comparative Neurology. 1950; 93 (3): 459-460.
- Cohen, S., Levi-Montalcini, R., & Hamburger, V. A nerve growth-stimulating factor isolated from sarcom as 37 and 180. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1954; 40 (10): 1014-1018.
- Colin, E., Régulier, E., Perrin, V., Dürr, A., Brice, A., Aebischer, P., . . . Saudou, F. Akt is altered in an animal model of huntington's disease and in patients. *European Journal of Neuroscience*. 2005; 21 (6): 1478-1488.
- Collingridge, G. L., Isaac, J. T., & Wang, Y. T. Receptor trafficking and synaptic plasticity. *Nature Reviews Neuroscience*. 2004; 5 (12): 952-962.
- Conn, P. J., & Pin, J. P. Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annual review of pharmacology and toxicology*. 1997; 37: 205-237.

- Costa, R. M., Honjo, T., & Silva, A. J. Learning and memory deficits in notch mutant mice. *Current Biology*. 2003; 13 (15): 1348-1354.
- Crowder, R. J., & Freeman, R. S. Phosphatidylinositol 3-kinase and akt protein kinase are necessary and sufficient for the survival of nerve growth factor-dependent sympathetic neurons. *J Neurosci*. 1998; 18 (8): 2933-2943.
- Crozier, R. A., Bi, C., Han, Y. R., & Plummer, M. R. Bdnf modulation of nmda receptors is activity dependent. *Journal of neurophysiology*. 2008; 100 (6): 3264-3274.
- Cuesto, G., Enriquez-Barreto, L., Carames, C., Cantarero, M., Gasull, X., Sandi, C., . . . Morales, M. Phosphoinositide-3-kinase activation controls synaptogenesis and spinogenesis in hippocampal neurons. *Journal of Neuroscience*. 2011; 31 (8): 2721-2733.
- Cui, H., Meng, Y., & Bulleit, R. F. Inhibition of glycogen synthase kinase 3 β activity regulates proliferation of cultured cerebellar granule cells. *Brain research Developmental brain research*. 1998; 111 (2): 177-188.
- Cull-Candy, S. G., & Leszkiewicz, D. N. Role of distinct nmda receptor subtypes at central synapses. *Science Signaling*. 2004; 2004 (255): re16.
- D'Mello, S. R., Anelli, R., & Calissano, P. Lithium induces apoptosis in immature cerebellar granule cells but promotes survival of mature neurons. *Experimental cell research*. 1994; 211 (2): 332-338.
- De Rossi, P., Harde, E., Dupuis, J. P., Martin, L., Chounlamountri, N., Bardin, M., . . . Meissirel, C. A critical role for vegf and vegfr2 in nmda receptor synaptic function and fear-related behavior. *Molecular psychiatry*. 2016; 21 (12): 1768-1780.
- Deak, M., Clifton, A. D., Lucocq, L. M., & Alessi, D. R. Mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (msk1) is directly activated by mapk and sapk2/p38, and may mediate activation of creb. *EMBO Journal*. 1998; 17 (15): 4426-4441.
- Deng, W., Aimone, J. B., & Gage, F. H. New neurons and new memories: How does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? *Nature Reviews Neuroscience*. 2010; 11 (5): 339-350.

- Derkach, V. A., Oh, M. C., Guire, E. S., & Soderling, T. R. Regulatory mechanisms of ampa receptors in synaptic plasticity. *Nature Reviews Neuroscience*. 2007; 8 (2): 101-113.
- Diehl, J. A., Cheng, M., Roussel, M. F., & Sherr, C. J. Glycogen synthase kinase-3 β regulates cyclin d1 proteolysis and subcellular localization. *Genes & development*. 1998; 12 (22): 3499-3511.
- Dieni, S., Matsumoto, T., Dekkers, M., Rauskolb, S., Ionescu, M. S., Deogracias, R., . . . Barde, Y. A. Bdnf and its pro-peptide are stored in presynaptic dense core vesicles in brain neurons. *Journal of Cell Biology*. 2012; 196 (6): 775-788.
- Dill, J., Wang, H., Zhou, F., & Li, S. Inactivation of glycogen synthase kinase 3 promotes axonal growth and recovery in the cns. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2008; 28 (36): 8914-8928.
- Ding, X. F., Gao, X., Ding, X. C., Fan, M., & Chen, J. Postnatal dysregulation of notch signal disrupts dendrite development of adult-born neurons in the hippocampus and contributes to memory impairment. *Scientific reports*. 2016; 6: 25780.
- Dingledine, R., Borges, K., Bowie, D., & Traynelis, S. F. The glutamate receptor ion channels. *Pharmacological reviews*. 1999; 51 (1): 7-61.
- Drake, C. T., Milner, T. A., & Patterson, S. L. Ultrastructural localization of full-length trkb immunoreactivity in rat hippocampus suggests multiple roles in modulating activity-dependent synaptic plasticity. *Journal of Neuroscience*. 1999; 19 (18): 8009-8026.
- Dunn, N., Holmes, C., & Mullee, M. Does lithium therapy protect against the onset of dementia? *Alz Dis Assoc Dis*. 2005; 19 (1): 20-22.
- English, J. D., & Sweatt, J. D. Activation of p42 mitogen-activated protein kinase in hippocampal long term potentiation. *Journal of Biological Chemistry*. 1996; 271 (40): 24329-24332.
- English, J. D., & Sweatt, J. D. A requirement for the mitogen-activated protein kinase cascade in hippocampal long term potentiation. *Journal of Biological Chemistry*. 1997; 272 (31): 19103-19106.
- Eom, T. Y., Roth, K. A., & Jope, R. S. Neural precursor cells are protected from apoptosis induced by trophic factor withdrawal or genotoxic stress by inhibitors

- of glycogen synthase kinase 3. *The Journal of biological chemistry*. 2007; 282 (31): 22856-22864.
- Eriksson, P. S., Perfilieva, E., Bjork-Eriksson, T., Alborn, A. M., Nordborg, C., Peterson, D. A., & Gage, F. H. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nature medicine*. 1998; 4 (11): 1313-1317.
- Fatemi, S. H. Reelin glycoprotein: Structure, biology and roles in health and disease. *Mol Psychiatry*. 2005; 10 (3): 251-257.
- Feng, S., Shi, T., Qiu, J., Yang, H., Wu, Y., Zhou, W., . . . Wu, H. Notch1 deficiency in postnatal neural progenitor cells in the dentate gyrus leads to emotional and cognitive impairment. *FASEB Journal*. 2017; 31 (10): 4347-4358.
- Ferraguti, F., Crepaldi, L., & Nicoletti, F. Metabotropic glutamate 1 receptor: Current concepts and perspectives. *Pharmacological reviews*. 2008; 60 (4): 536-581.
- Figurov, A., Pozzo-Miller, L. D., Olafsson, P., Wang, T., & Lu, B. Regulation of synaptic responses to high-frequency stimulation and ltp by neurotrophins in the hippocampus. *Nature*. 1996; 381 (6584): 706-709.
- Finkbeiner, S., Tavazoie, S. F., Maloratsky, A., Jacobs, K. M., Harris, K. M., & Greenberg, M. E. Creb: A major mediator of neuronal neurotrophin responses. *Neuron*. 1997; 19 (5): 1031-1047.
- Finsterwald, C., Fiumelli, H., Cardinaux, J. R., & Martin, J. L. Regulation of dendritic development by bdnf requires activation of crtc1 by glutamate. *Journal of Biological Chemistry*. 2010; 285 (37): 28587-28595.
- Gao, S., McMillan, R. P., Zhu, Q., Lopaschuk, G. D., Hulver, M. W., & Butler, A. A. Therapeutic effects of adropin on glucose tolerance and substrate utilization in diet-induced obese mice with insulin resistance. *Molecular metabolism*. 2015; 4 (4): 310-324.
- Ge, X., Hannan, F., Xie, Z., Feng, C., Tully, T., Zhou, H., . . . Zhong, Y. Notch signaling in drosophila long-term memory formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2004; 101 (27): 10172-10176.
- Goda, Y., & Stevens, C. F. Synaptic plasticity: The basis of particular types of learning. *Current biology : CB*. 1996; 6 (4): 375-378.

- Greene, J. G., & Greenamyre, J. T. Bioenergetics and glutamate excitotoxicity. *Progress in Neurobiology*. 1996; 48 (6): 613-+.
- Grimes, C. A., & Jope, R. S. Creb DNA binding activity is inhibited by glycogen synthase kinase-3 beta and facilitated by lithium. *Journal of Neurochemistry*. 2001a; 78 (6): 1219-1232.
- Grimes, C. A., & Jope, R. S. The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3beta in cellular signaling. *Progress in Neurobiology*. 2001b; 65 (4): 391-426.
- Grosshans, D. R., Clayton, D. A., Coultrap, S. J., & Browning, M. D. Ltp leads to rapid surface expression of nmda but not ampa receptors in adult rat ca1. *Nature neuroscience*. 2002; 5 (1): 27-33.
- Guo, W., Murthy, A. C., Zhang, L., Johnson, E. B., Schaller, E. G., Allan, A. M., & Zhao, X. Inhibition of gsk3beta improves hippocampus-dependent learning and rescues neurogenesis in a mouse model of fragile x syndrome. *Human molecular genetics*. 2012; 21 (3): 681-691.
- Guscott, M. R., Clarke, H. F., Murray, F., Grimwood, S., Bristow, L. J., & Hutson, P. H. The effect of (+/-)-cp-101,606, an nmda receptor nr2b subunit selective antagonist, in the morris watermaze. *European Journal of Pharmacology*. 2003; 476 (3): 193-199.
- Haettig, J., Stefanko, D. P., Multani, M. L., Figueroa, D. X., McQuown, S. C., & Wood, M. A. Hdac inhibition modulates hippocampus-dependent long-term memory for object location in a cbp-dependent manner. *Learn Mem*. 2011; 18 (2): 71-79.
- Harney, S. C., Jane, D. E., & Anwyl, R. Extrasynaptic nr2d-containing nmdars are recruited to the synapse during ltp of nmdar-epses. *Journal of Neuroscience*. 2008; 28 (45): 11685-11694.
- Hartigan, J. A., & Johnson, G. V. Transient increases in intracellular calcium result in prolonged site-selective increases in tau phosphorylation through a glycogen synthase kinase 3beta-dependent pathway. *The Journal of biological chemistry*. 1999; 274 (30): 21395-21401.
- Hartmann, M., Heumann, R., & Lessmann, V. Synaptic secretion of bdnf after high-frequency stimulation of glutamatergic synapses. *EMBO Journal*. 2001; 20 (21): 5887-5897.

- Hassan, A., Gormley, K., O'Sullivan, M., Knight, J., Sham, P., Vallance, P., . . . Markus, H. Endothelial nitric oxide gene haplotypes and risk of cerebral small-vessel disease. *Stroke*. 2004; 35 (3): 654-659.
- Hering, H., Lin, C. C., & Sheng, M. Lipid rafts in the maintenance of synapses, dendritic spines, and surface ampa receptor stability. *Journal of Neuroscience*. 2003; 23 (8): 3262-3271.
- Hernandez, F., Borrell, J., Guaza, C., Avila, J., & Lucas, J. J. Spatial learning deficit in transgenic mice that conditionally over-express gsk-3beta in the brain but do not form tau filaments. *Journal of Neurochemistry*. 2002; 83 (6): 1529-1533.
- Hoeflich, K. P., Luo, J., Rubie, E. A., Tsao, M. S., Jin, O., & Woodgett, J. R. Requirement for glycogen synthase kinase-3 beta in cell survival and nf-kappa b activation. *Nature*. 2000; 406 (6791): 86-90.
- Hoffmeister-Ullerich, S. A., Susens, U., & Schaller, H. C. The orphan g-protein-coupled receptor gpr19 is expressed predominantly in neuronal cells during mouse embryogenesis. *Cell and tissue research*. 2004; 318 (2): 459-463.
- Horwood, J. M., Dufour, F., Laroche, S., & Davis, S. Signalling mechanisms mediated by the phosphoinositide 3-kinase/akt cascade in synaptic plasticity and memory in the rat. *European Journal of Neuroscience*. 2006; 23 (12): 3375-3384.
- Hoshi, M., Sato, M., Kondo, S., Takashima, A., Noguchi, K., Takahashi, M., . . . Imahori, K. Different localization of tau protein kinase i/glycogen synthase kinase-3 beta from glycogen synthase kinase-3 alpha in cerebellum mitochondria. *Journal of biochemistry*. 1995; 118 (4): 683-685.
- Hossain, M. S., Mineno, K., & Katafuchi, T. Neuronal orphan g-protein coupled receptor proteins mediate plasmalogens-induced activation of erk and akt signaling. *PLoS One*. 2016; 11 (3): e0150846.
- Huang, E. J., & Reichardt, L. F. Trk receptors: Roles in neuronal signal transduction. *Annual Review of Biochemistry*. 2003; 72: 609-642.
- Hunt, D. L., & Castillo, P. E. Synaptic plasticity of nmda receptors: Mechanisms and functional implications. *Current opinion in neurobiology*. 2012; 22 (3): 496-508.
- Intlekofer, K. A., Berchtold, N. C., Malvaez, M., Carlos, A. J., McQuown, S. C., Cunningham, M. J., . . . Cotman, C. W. Exercise and sodium butyrate transform

- a subthreshold learning event into long-term memory via a brain-derived neurotrophic factor-dependent mechanism. *Neuropsychopharmacology* : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology. 2013; 38 (10): 2027-2034.
- Itoh, N., Enomoto, A., Nagai, T., Takahashi, M., & Yamada, K. Molecular mechanism linking bdnf/trkb signaling with the nmda receptor in memory: The role of girdin in the cns. *Reviews in the neurosciences*. 2016; 27 (5): 481-490.
- Jain, V., Baitharu, I., Prasad, D., & Ilavazhagan, G. Enriched environment prevents hypobaric hypoxia induced memory impairment and neurodegeneration: Role of bdnf/pi3k/gsk3beta pathway coupled with creb activation. *PLoS One*. 2013; 8 (5): e62235.
- Jeynes, B., & Provias, J. Significant negative correlations between capillary expressed enos and alzheimer lesion burden. *Neuroscience letters*. 2009; 463 (3): 244-248.
- Ji, Y., Lu, Y., Yang, F., Shen, W., Tang, T. T., Feng, L., . . . Lu, B. Acute and gradual increases in bdnf concentration elicit distinct signaling and functions in neurons. *Nature neuroscience*. 2010; 13 (3): 302-309.
- Jin, K., Mao, X. O., Batteur, S. P., McEachron, E., Leahy, A., & Greenberg, D. A. Caspase-3 and the regulation of hypoxic neuronal death by vascular endothelial growth factor. *Neuroscience*. 2001; 108 (2): 351-358.
- Jin, K., Minami, M., Lan, J. Q., Mao, X. O., Batteur, S., Simon, R. P., & Greenberg, D. A. Neurogenesis in dentate subgranular zone and rostral subventricular zone after focal cerebral ischemia in the rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2001; 98 (8): 4710-4715.
- Jin, K., Zhu, Y., Sun, Y., Mao, X. O., Xie, L., & Greenberg, D. A. Vascular endothelial growth factor (vegf) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2002; 99 (18): 11946-11950.
- Jing, H., Cheng, Y., Li, S., & Zhang, G. [effects of glutamate and glutamine on learning and memory of rats]. *Wei Sheng Yan Jiu*. 2000; 29 (1): 40-42.
- Jongkees, B. J., Immink, M. A., & Colzato, L. S. Influences of glutamine administration on response selection and sequence learning: A randomized-controlled trial. *Scientific reports*. 2017; 7 (1): 2693.

- Kandel, E. R. The molecular biology of memory storage: A dialog between genes and synapses. *Bioscience reports*. 2001a; 21 (5): 565-611.
- Kandel, E. R. The molecular biology of memory storage: A dialogue between genes and synapses. *Science*. 2001b; 294 (5544): 1030-1038.
- Kandel, E. R., & Schwartz, H. J. (2013). Cellular mechanisms of implicit memory storage and the biological basis of individuality. In E. R. Kandel, H. J. Schwartz, T. M. Jessell, S. A. Siegelbaum, & A. J. Hudspeth (Eds.), *Principles of neural science* (Vol. Fifth Edition, pp. 1461-1485): The McGraw-Hill Companies.
- Kaplan, D. R., & Miller, F. D. Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Current opinion in neurobiology*. 2000; 10 (3): 381-391.
- Kasai, H., Fukuda, M., Watanabe, S., Hayashi-Takagi, A., & Noguchi, J. Structural dynamics of dendritic spines in memory and cognition. *Trends in Neurosciences*. 2010; 33 (3): 121-129.
- Kaytor, M. D., & Orr, H. T. The gsk3 beta signaling cascade and neurodegenerative disease. *Current opinion in neurobiology*. 2002; 12 (3): 275-278.
- Kelleher, R. J., 3rd, Govindarajan, A., Jung, H. Y., Kang, H., & Tonegawa, S. Translational control by mapk signaling in long-term synaptic plasticity and memory. *Cell*. 2004; 116 (3): 467-479.
- Kim, E., & Sheng, M. Pdz domain proteins of synapses. *Nature Reviews Neuroscience*. 2004; 5 (10): 771-781.
- Kimura, T., Yamashita, S., Nakao, S., Park, J. M., Murayama, M., Mizoroki, T., . . . Takashima, A. Gsk-3 beta is required for memory reconsolidation in adult brain. *PloS one*. 2008; 3 (10).
- Korte, M., Carroll, P., Wolf, E., Brem, G., Thoenen, H., & Bonhoeffer, T. Hippocampal long-term potentiation is impaired in mice lacking brain-derived neurotrophic factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1995; 92 (19): 8856-8860.
- Kovalchuk, Y., Hanse, E., Kafitz, K. W., & Konnerth, A. Postsynaptic induction of bdnf-mediated long-term potentiation. *Science*. 2002; 295 (5560): 1729-1734.

- Kraeuter, A. K., Guest, P. C., & Sarnyai, Z. The y-maze for assessment of spatial working and reference memory in mice. *Methods in molecular biology*. 2019; 1916: 105-111.
- Kumar, K. G., Trevaskis, J. L., Lam, D. D., Sutton, G. M., Koza, R. A., Chouljenko, V. N., . . . Butler, A. A. Identification of adropin as a secreted factor linking dietary macronutrient intake with energy homeostasis and lipid metabolism. *Cell Metabolism*. 2008; 8 (6): 468-481.
- Lang, S. B., Stein, V., Bonhoeffer, T., & Lohmann, C. Endogenous brain-derived neurotrophic factor triggers fast calcium transients at synapses in developing dendrites. *Journal of Neuroscience*. 2007; 27 (5): 1097-1105.
- Lau, C. G., & Zukin, R. S. Nmda receptor trafficking in synaptic plasticity and neuropsychiatric disorders. *Nature Reviews Neuroscience*. 2007; 8 (6): 413-426.
- Leal, G., Bramham, C. R., & Duarte, C. B. Bdnf and hippocampal synaptic plasticity. *Vitamins and hormones*. 2017; 104: 153-195.
- Leroy, K., & Brion, J. P. Developmental expression and localization of glycogen synthase kinase-3beta in rat brain. *Journal of chemical neuroanatomy*. 1999; 16 (4): 279-293.
- Lesort, M., Jope, R. S., & Johnson, G. V. Insulin transiently increases tau phosphorylation: Involvement of glycogen synthase kinase-3beta and fyn tyrosine kinase. *Journal of neurochemistry*. 1999; 72 (2): 576-584.
- Levine, E. S., Crozier, R. A., Black, I. B., & Plummer, M. R. Brain-derived neurotrophic factor modulates hippocampal synaptic transmission by increasing n-methyl-d-aspartic acid receptor activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1998; 95 (17): 10235-10239.
- Lewin, G. R., & Barde, Y. A. Physiology of the neurotrophins. *Annual Review of Neuroscience*. 1996; 19: 289-317.
- Li, L., Xie, W., Zheng, X. L., Yin, W. D., & Tang, C. K. A novel peptide adropin in cardiovascular diseases. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2016; 453: 107-113.
- Li, W., Bellot-Saez, A., Phillips, M. L., Yang, T., Longo, F. M., & Pozzo-Miller, L. A small-molecule trkb ligand restores hippocampal synaptic plasticity and object

- location memory in rett syndrome mice. *Disease models & mechanisms*. 2017; 10 (7): 837-845.
- Li, Y., Jia, Y. C., Cui, K., Li, N., Zheng, Z. Y., Wang, Y. Z., & Yuan, X. B. Essential role of trpc channels in the guidance of nerve growth cones by brain-derived neurotrophic factor. *Nature*. 2005; 434 (7035): 894-898.
- Lian, W., Gu, X., Qin, Y., & Zheng, X. Elevated plasma levels of adropin in heart failure patients. *Internal medicine*. 2011; 50 (15): 1523-1527.
- Licht, T., Goshen, I., Avital, A., Kreisel, T., Zubedat, S., Eavri, R., . . . Keshet, E. Reversible modulations of neuronal plasticity by vegf. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2011; 108 (12): 5081-5086.
- Lin, D. T., Makino, Y., Sharma, K., Hayashi, T., Neve, R., Takamiya, K., & Huganir, R. L. Regulation of ampa receptor extrasynaptic insertion by 4.1n, phosphorylation and palmitoylation. *Nature neuroscience*. 2009; 12 (7): 879-887.
- Lin, H. Y., Wu, C. L., & Huang, C. C. The akt-endothelial nitric oxide synthase pathway in lipopolysaccharide preconditioning-induced hypoxic-ischemic tolerance in the neonatal rat brain. *Stroke*. 2010; 41 (7): 1543-1551.
- Linnarsson, S., Bjorklund, A., & Ernfors, P. Learning deficit in bdnf mutant mice. *European Journal of Neuroscience*. 1997; 9 (12): 2581-2587.
- Linseman, D. A., Butts, B. D., Precht, T. A., Phelps, R. A., Le, S. S., Laessig, T. A., . . . Heidenreich, K. A. Glycogen synthase kinase-3beta phosphorylates bax and promotes its mitochondrial localization during neuronal apoptosis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2004; 24 (44): 9993-10002.
- Liu, L., Wong, T. P., Pozza, M. F., Lingenhoehl, K., Wang, Y., Sheng, M., . . . Wang, Y. T. Role of nmda receptor subtypes in governing the direction of hippocampal synaptic plasticity. *Science*. 2004; 304 (5673): 1021-1024.
- Lovren, F., Pan, Y., Quan, A., Singh, K. K., Shukla, P. C., Gupta, M., . . . Verma, S. Adropin is a novel regulator of endothelial function. *Circulation*. 2010; 122 (11 Suppl): S185-192.

- Lu, Y. M., Roder, J. C., Davidow, J., & Salter, M. W. Src activation in the induction of long-term potentiation in ca1 hippocampal neurons. *Science*. 1998; 279 (5355): 1363-1367.
- Luck, R., Urban, S., Karakatsani, A., Harde, E., Sambandan, S., Nicholson, L., . . . Ruiz de Almodovar, C. Vegf/vegfr2 signaling regulates hippocampal axon branching during development. *eLife*. 2019; 8.
- Luo, J. Glycogen synthase kinase 3beta (gsk3beta) in tumorigenesis and cancer chemotherapy. *Cancer letters*. 2009; 273 (2): 194-200.
- Lynch, M. A. Long-term potentiation and memory. *Physiological Reviews* 2004; 84 (1): 87-136.
- Ma, C., Wang, J., Gao, Y., Gao, T. W., Chen, G., Bower, K. A., . . . Luo, J. The role of glycogen synthase kinase 3beta in the transformation of epidermal cells. *Cancer research*. 2007; 67 (16): 7756-7764.
- MacAulay, K., Doble, B. W., Patel, S., Hansotia, T., Sinclair, E. M., Drucker, D. J., . . . Woodgett, J. R. Glycogen synthase kinase 3alpha-specific regulation of murine hepatic glycogen metabolism. *Cell Metab*. 2007; 6 (4): 329-337.
- Malenka, R. C. The long-term potential of ltp. *Nature Reviews Neuroscience*. 2003; 4 (11): 923-926.
- Malenka, R. C., & Bear, M. F. Ltp and ltd: An embarrassment of riches. *Neuron*. 2004; 44 (1): 5-21.
- Manning, B. D., & Cantley, L. C. Akt/pkb signaling: Navigating downstream. *Cell*. 2007; 129 (7): 1261-1274.
- Manoukian, A. S., & Woodgett, J. R. Role of glycogen synthase kinase-3 in cancer: Regulation by wnts and other signaling pathways. *Advances in cancer research*. 2002; 84: 203-229.
- Markowitsch, H. J. Memory and self-neuroscientific landscapes. *ISRN neuroscience*. 2013; 2013: 176027.
- Matsuda, N., Lu, H., Fukata, Y., Noritake, J., Gao, H., Mukherjee, S., . . . Poo, M. M. Differential activity-dependent secretion of brain-derived neurotrophic factor from axon and dendrite. *Journal of Neuroscience*. 2009; 29 (45): 14185-14198.

- Maurer, M. H., Bromme, J. O., Feldmann, R. E., Jr., Jarve, A., Sabouri, F., Burgers, H. F., . . . Kuschinsky, W. Glycogen synthase kinase 3beta (gsk3beta) regulates differentiation and proliferation in neural stem cells from the rat subventricular zone. *Journal of proteome research*. 2007; 6 (3): 1198-1208.
- Messaoudi, E., Bardsen, K., Srebro, B., & Bramham, C. R. Acute intrahippocampal infusion of bdnf induces lasting potentiation of synaptic transmission in the rat dentate gyrus. *Journal of neurophysiology*. 1998; 79 (1): 496-499.
- Minichiello, L., Korte, M., Wolfer, D., Kuhn, R., Unsicker, K., Cestari, V., . . . Klein, R. Essential role for trkb receptors in hippocampus-mediated learning. *Neuron*. 1999; 24 (2): 401-414.
- Mizuno, M., Yamada, K., Olariu, A., Nawa, H., & Nabeshima, T. Involvement of brain-derived neurotrophic factor in spatial memory formation and maintenance in a radial arm maze test in rats. *Journal of Neuroscience*. 2000; 20 (18): 7116-7121.
- Mizuno, M., Yamada, K., Takei, N., Tran, M. H., He, J., Nakajima, A., . . . Nabeshima, T. Phosphatidylinositol 3-kinase: A molecule mediating bdnf-dependent spatial memory formation. *Molecular psychiatry*. 2003; 8 (2): 217-224.
- Monyer, H., Burnashev, N., Laurie, D. J., Sakmann, B., & Seeburg, P. H. Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four nmda receptors. *Neuron*. 1994; 12 (3): 529-540.
- Morris, R. G. M., Inglis, J., Ainge, J. A., Olverman, H. J., Tulloch, J., Dudai, Y., & Kelly, P. A. T. Memory reconsolidation: Sensitivity of spatial memory to inhibition of protein synthesis in dorsal hippocampus during encoding and retrieval. *Neuron*. 2006; 50 (3): 479-489.
- Mowla, S. J., Farhadi, H. F., Pareek, S., Atwal, J. K., Morris, S. J., Seidah, N. G., & Murphy, R. A. Biosynthesis and post-translational processing of the precursor to brain-derived neurotrophic factor. *Journal of Biological Chemistry*. 2001; 276 (16): 12660-12666.
- Mu, D., Jiang, X., Sheldon, R. A., Fox, C. K., Hamrick, S. E., Vexler, Z. S., & Ferriero, D. M. Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha and induction of vascular endothelial growth factor in a rat neonatal stroke model. *Neurobiology of disease*. 2003; 14 (3): 524-534.

- Munoz-Montano, J. R., Lim, F., Moreno, F. J., Avila, J., & Diaz-Nido, J. Glycogen synthase kinase-3 modulates neurite outgrowth in cultured neurons: Possible implications for neurite pathology in alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*. 1999; 1 (6): 361-378.
- Nader, K., Schafe, G. E., & LeDoux, J. E. The labile nature of consolidation theory. *Nat Rev Neurosci*. 2000; 1 (3): 216-219.
- Neely, J. H. Semantic priming and retrieval from lexical memory: Roles of inhibitionless spreading activation and limited-capacity attention. *Journal of Experimental Psychology: General*. 1977; 106 (3): 226-254.
- Nikolova, S., Stark, S. M., & Stark, C. E. L. 3t hippocampal glutamate-glutamine complex reflects verbal memory decline in aging. *Neurobiology of aging*. 2017; 54: 103-111.
- O'Dowd, B. F., Nguyen, T., Lynch, K. R., Kolakowski, L. F., Jr., Thompson, M., Cheng, R., . . . George, S. R. A novel gene codes for a putative g protein-coupled receptor with an abundant expression in brain. *FEBS Lett*. 1996; 394 (3): 325-329.
- Orme, M. H., Giannini, A. L., Vivanco, M. D., & Kypta, R. M. Glycogen synthase kinase-3 and axin function in a beta-catenin-independent pathway that regulates neurite outgrowth in neuroblastoma cells. *Molecular and cellular neurosciences*. 2003; 24 (3): 673-686.
- Owen, R., & Gordon-Weeks, P. R. Inhibition of glycogen synthase kinase 3beta in sensory neurons in culture alters filopodia dynamics and microtubule distribution in growth cones. *Molecular and cellular neurosciences*. 2003; 23 (4): 626-637.
- Ozkan, A., Parlak, H., Tanriover, G., Dilmac, S., Ulker, S. N., Birsen, I., & Agar, A. The protective mechanism of docosahexaenoic acid in mouse model of parkinson: The role of hemeoxygenase. *Neurochem Int*. 2016.
- Pacary, E., Legros, H., Valable, S., Duchatelle, P., Lecocq, M., Petit, E., . . . Bernaudin, M. Synergistic effects of cocl(2) and rock inhibition on mesenchymal stem cell differentiation into neuron-like cells. *Journal of cell science*. 2006; 119 (Pt 13): 2667-2678.

- Pacary, E., Petit, E., & Bernaudin, M. Concomitant inhibition of prolyl hydroxylases and rock initiates differentiation of mesenchymal stem cells and pc12 towards the neuronal lineage. *Biochemical and biophysical research communications*. 2008; 377 (2): 400-406.
- Pacary, E., Tixier, E., Coulet, F., Roussel, S., Petit, E., & Bernaudin, M. Crosstalk between hif-1 and rock pathways in neuronal differentiation of mesenchymal stem cells, neurospheres and in pc12 neurite outgrowth. *Molecular and cellular neurosciences*. 2007; 35 (3): 409-423.
- Pang, P. T., Teng, H. K., Zaitsev, E., Woo, N. T., Sakata, K., Zhen, S., . . . Lu, B. Cleavage of probdnf by tpa/plasmin is essential for long-term hippocampal plasticity. *Science*. 2004; 306 (5695): 487-491.
- Paoletti, P. Molecular basis of nmda receptor functional diversity. *European Journal of Neuroscience*. 2011; 33 (8): 1351-1365.
- Pariyar, R., Yoon, C. S., Svay, T., Kim, D. S., Cho, H. K., Kim, S. Y., . . . Seo, J. Vitis labruscana leaf extract ameliorates scopolamine-induced impairments with activation of akt, erk and creb in mice. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology*. 2017; 36: 8-17.
- Patterson, S. L., Abel, T., Deuel, T. A., Martin, K. C., Rose, J. C., & Kandel, E. R. Recombinant bdnf rescues deficits in basal synaptic transmission and hippocampal ltp in bdnf knockout mice. *Neuron*. 1996; 16 (6): 1137-1145.
- Paxinos, C. W. The rat brain in stereotaxic coordinates, 3 rd ed. Academic press, san francisco. 1997.
- Peng, B., Guo, Q. L., He, Z. J., Ye, Z., Yuan, Y. J., Wang, N., & Zhou, J. Remote ischemic postconditioning protects the brain from global cerebral ischemia/reperfusion injury by up-regulating endothelial nitric oxide synthase through the pi3k/akt pathway. *Brain research*. 2012; 1445: 92-102.
- Peng, Y., Zhao, J., Gu, Q. H., Chen, R. Q., Xu, Z., Yan, J. Z., . . . Lu, W. Distinct trafficking and expression mechanisms underlie ltp and ltd of nmda receptor-mediated synaptic responses. *Hippocampus*. 2010; 20 (5): 646-658.
- Pereira, D. B., Rebola, N., Rodrigues, R. J., Cunha, R. A., Carvalho, A. P., & Duarte, C. B. Trkb receptors modulation of glutamate release is limited to a subset of nerve

- terminals in the adult rat hippocampus. *Journal of Neuroscience Research*. 2006a; 83 (5): 832-844.
- Pereira, D. B., Rebola, N., Rodrigues, R. J., Cunha, R. A., Carvalho, A. P., & Duarte, C. B. Trkb receptors modulation of glutamate release is limited to a subset of nerve terminals in the adult rat hippocampus. *J Neurosci Res*. 2006b; 83 (5): 832-844.
- Perkinton, M. S., Ip, J. K., Wood, G. L., Crossthwaite, A. J., & Williams, R. J. Phosphatidylinositol 3-kinase is a central mediator of nmda receptor signalling to map kinase (erk1/2), akt/pkb and creb in striatal neurones. *Journal of Neurochemistry*. 2002; 80 (2): 239-254.
- Polster, M. R., Nadel, L., & Schacter, D. L. Cognitive neuroscience analyses of memory: A historical perspective. *Journal of cognitive neuroscience*. 1991; 3 (2): 95-116.
- Polter, A. M., & Li, X. H. Glycogen synthase kinase-3 is an intermediate modulator of serotonin neurotransmission. *Frontiers in molecular neuroscience*. 2011; 4.
- Pomara, N., Singh, R., Deptula, D., Chou, J. C., Schwartz, M. B., & LeWitt, P. A. Glutamate and other csf amino acids in alzheimer's disease. *American Journal of Psychiatry*. 1992; 149 (2): 251-254.
- Pujadas, L., Gruart, A., Bosch, C., Delgado, L., Teixeira, C. M., Rossi, D., . . . Soriano, E. Reelin regulates postnatal neurogenesis and enhances spine hypertrophy and long-term potentiation. *J Neurosci*. 2010; 30 (13): 4636-4649.
- Qiu, S., & Weeber, E. J. Reelin signaling facilitates maturation of ca1 glutamatergic synapses. *J Neurophysiol*. 2007; 97 (3): 2312-2321.
- Saavedra, A., Garcia-Martinez, J. M., Xifro, X., Giralt, A., Torres-Peraza, J. F., Canals, J. M., . . . Perez-Navarro, E. Ph domain leucine-rich repeat protein phosphatase 1 contributes to maintain the activation of the pi3k/akt pro-survival pathway in huntington's disease striatum. *Cell Death and Differentiation*. 2010; 17 (2): 324-335.
- Salter, M. W., & Kalia, L. V. Src kinases: A hub for nmda receptor regulation. *Nature Reviews Neuroscience*. 2004; 5 (4): 317-328.
- Santos-Fandila, A., Zafra-Gomez, A., Barranco, A., Navalon, A., Rueda, R., & Ramirez, M. Quantitative determination of neurotransmitters, metabolites and derivates in microdialysates by uhplc-tandem mass spectrometry. *Talanta*. 2013; 114: 79-89.

- Sarbassov, D. D., Ali, S. M., & Sabatini, D. M. Growing roles for the mtor pathway. *Current Opinion in Cell Biology*. 2005; 17 (6): 596-603.
- Schanzer, A., Wachs, F. P., Wilhelm, D., Acker, T., Cooper-Kuhn, C., Beck, H., . . . Kuhn, H. G. Direct stimulation of adult neural stem cells in vitro and neurogenesis in vivo by vascular endothelial growth factor. *Brain pathology*. 2004; 14 (3): 237-248.
- Seidah, N. G., Benjannet, S., Pareek, S., Chretien, M., & Murphy, R. A. Cellular processing of the neurotrophin precursors of nt3 and bdnf by the mammalian proprotein convertases. *FEBS Letters*. 1996; 379 (3): 247-250.
- Sekeres, M. J., Neve, R. L., Frankland, P. W., & Josselyn, S. A. Dorsal hippocampal creb is both necessary and sufficient for spatial memory. *Learning & Memory*. 2010; 17 (6): 280-283.
- Shaywitz, A. J., & Greenberg, M. E. Creb: A stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. *Annual Review of Biochemistry*. 1999; 68: 821-861.
- Shimotake, J., Derugin, N., Wendland, M., Vexler, Z. S., & Ferriero, D. M. Vascular endothelial growth factor receptor-2 inhibition promotes cell death and limits endothelial cell proliferation in a neonatal rodent model of stroke. *Stroke*. 2010; 41 (2): 343-349.
- Sondell, M., Sundler, F., & Kanje, M. Vascular endothelial growth factor is a neurotrophic factor which stimulates axonal outgrowth through the flk-1 receptor. *The European journal of neuroscience*. 2000; 12 (12): 4243-4254.
- Song, J., Christian, K. M., Ming, G. L., & Song, H. Modification of hippocampal circuitry by adult neurogenesis. *Developmental neurobiology*. 2012; 72 (7): 1032-1043.
- Song, L., De Sarno, P., & Jope, R. S. Central role of glycogen synthase kinase-3beta in endoplasmic reticulum stress-induced caspase-3 activation. *The Journal of biological chemistry*. 2002; 277 (47): 44701-44708.
- Spittaels, K., Van den Haute, C., Van Dorpe, J., Geerts, H., Mercken, M., Bruynseels, K., . . . Van Leuven, F. Glycogen synthase kinase-3beta phosphorylates protein tau and rescues the axonopathy in the central nervous system of human four-

- repeat tau transgenic mice. *The Journal of biological chemistry*. 2000; 275 (52): 41340-41349.
- Spittaels, K., Van den Haute, C., Van Dorpe, J., Terwel, D., Vandezande, K., Lasrado, R., . . . Van Leuven, F. Neonatal neuronal overexpression of glycogen synthase kinase-3 beta reduces brain size in transgenic mice. *Neuroscience*. 2002; 113 (4): 797-808.
- Sprengel, R., Suchanek, B., Amico, C., Brusa, R., Burnashev, N., Rozov, A., . . . Seeburg, P. H. Importance of the intracellular domain of nr2 subunits for nmda receptor function in vivo. *Cell*. 1998; 92 (2): 279-289.
- Squire, L. R. Memory and the hippocampus: A synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. *Psychological review*. 1992; 99 (2): 195-231.
- Squire, L. R. Memory systems of the brain: A brief history and current perspective. *Neurobiology of learning and memory*. 2004; 82 (3): 171-177.
- Stein, L. M., Yosten, G. L., & Samson, W. K. Adropin acts in brain to inhibit water drinking: Potential interaction with the orphan g protein-coupled receptor, gpr19. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2016; 310 (6): R476-480.
- Stranahan, A. M., Salas-Vega, S., Jiam, N. T., & Gallagher, M. Interference with reelin signaling in the lateral entorhinal cortex impairs spatial memory. *Neurobiology of learning and memory*. 2011; 96 (2): 150-155.
- Strange, B. A., Witter, M. P., Lein, E. S., & Moser, E. I. Functional organization of the hippocampal longitudinal axis. *Nature Reviews Neuroscience*. 2014; 15 (10): 655-669.
- Sui, Z., Sniderhan, L. F., Fan, S., Kazmierczak, K., Reisinger, E., Kovacs, A. D., . . . Maggirwar, S. B. Human immunodeficiency virus-encoded tat activates glycogen synthase kinase-3beta to antagonize nuclear factor-kappaB survival pathway in neurons. *The European journal of neuroscience*. 2006; 23 (10): 2623-2634.
- Sun, Y., Jin, K., Xie, L., Childs, J., Mao, X. O., Logvinova, A., & Greenberg, D. A. Vegf-induced neuroprotection, neurogenesis, and angiogenesis after focal

- cerebral ischemia. *The Journal of clinical investigation*. 2003; 111 (12): 1843-1851.
- Sutton, G., & Chandler, L. J. Activity-dependent nmda receptor-mediated activation of protein kinase b/akt in cortical neuronal cultures. *Journal of Neurochemistry*. 2002; 82 (5): 1097-1105.
- Sweatt, J. D. Toward a molecular explanation for long-term potentiation. *Learning & Memory*. 1999; 6 (5): 399-416.
- Szatmari, E., Habas, A., Yang, P., Zheng, J. J., Hagg, T., & Hetman, M. A positive feedback loop between glycogen synthase kinase 3 β and protein phosphatase 1 after stimulation of nr2b nmda receptors in forebrain neurons. *Journal of Biological Chemistry*. 2005; 280 (45): 37526-37535.
- Takadera, T., Fujibayashi, M., Kaniyu, H., Sakota, N., & Ohyashiki, T. Caspase-dependent apoptosis induced by thapsigargin was prevented by glycogen synthase kinase-3 inhibitors in cultured rat cortical neurons. *Neurochemical research*. 2007; 32 (8): 1336-1342.
- Takahashi, M., Yasutake, K., & Tomizawa, K. Lithium inhibits neurite growth and tau protein kinase i/glycogen synthase kinase-3 β -dependent phosphorylation of juvenile tau in cultured hippocampal neurons. *Journal of neurochemistry*. 1999; 73 (5): 2073-2083.
- Tan, X. L., Xue, Y. Q., Ma, T., Wang, X., Li, J. J., Lan, L., . . . Liao, F. F. Partial enos deficiency causes spontaneous thrombotic cerebral infarction, amyloid angiopathy and cognitive impairment. *Molecular neurodegeneration*. 2015; 10: 24.
- Tang, S. J., Reis, G., Kang, H., Gingras, A. C., Sonenberg, N., & Schuman, E. M. A rapamycin-sensitive signaling pathway contributes to long-term synaptic plasticity in the hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2002; 99 (1): 467-472.
- Teixeira, C. M., Martin, E. D., Sahun, I., Masachs, N., Pujadas, L., Corvelo, A., . . . Soriano, E. Overexpression of reelin prevents the manifestation of behavioral phenotypes related to schizophrenia and bipolar disorder.

- Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology. 2011; 36 (12): 2395-2405.
- Tissir, F., Lambert De Rouvroit, C., Sire, J. Y., Meyer, G., & Goffinet, A. M. Reelin expression during embryonic brain development in *crocodylus niloticus*. The Journal of comparative neurology. 2003; 457 (3): 250-262.
- Traynelis, S. F., Wollmuth, L. P., McBain, C. J., Menniti, F. S., Vance, K. M., Ogden, K. K., . . . Dingledine, R. Glutamate receptor ion channels: Structure, regulation, and function. Pharmacological reviews. 2010; 62 (3): 405-496.
- Tulving, E. Episodic memory: From mind to brain. Annual review of psychology. 2002; 53: 1-25.
- Valerio, A., Ghisi, V., Dossena, M., Tonello, C., Giordano, A., Frontini, A., . . . Nisoli, E. Leptin increases axonal growth cone size in developing mouse cortical neurons by convergent signals inactivating glycogen synthase kinase-3 β . The Journal of biological chemistry. 2006; 281 (18): 12950-12958.
- Viard, P., Butcher, A. J., Halet, G., Davies, A., Nurnberg, B., Heblich, F., & Dolphin, A. C. Pi3k promotes voltage-dependent calcium channel trafficking to the plasma membrane. Nature neuroscience. 2004; 7 (9): 939-946.
- Vogel-Ciernia, A., & Wood, M. A. Examining object location and object recognition memory in mice. Current protocols in neuroscience. 2014; 69: 8 31 31-17.
- Walton, H. S., & Dodd, P. R. Glutamate-glutamine cycling in alzheimer's disease. Neurochem Int. 2007; 50 (7-8): 1052-1066.
- Wang, D., Cui, Z., Zeng, Q., Kuang, H., Wang, L. P., Tsien, J. Z., & Cao, X. Genetic enhancement of memory and long-term potentiation but not ca1 long-term depression in nr2b transgenic rats. PLoS One. 2009; 4 (10): e7486.
- Wang, H. Y., Wang, G. L., Yu, Y. H., & Wang, Y. The role of phosphoinositide-3-kinase/akt pathway in propofol-induced postconditioning against focal cerebral ischemia-reperfusion injury in rats. Brain Research. 2009; 1297: 177-184.
- Waterhouse, E. G., & Xu, B. New insights into the role of brain-derived neurotrophic factor in synaptic plasticity. Molecular and Cellular Neuroscience. 2009; 42 (2): 81-89.

- Wildburger, N. C., & Laezza, F. Control of neuronal ion channel function by glycogen synthase kinase-3: New prospective for an old kinase. *Frontiers in molecular neuroscience*. 2012; 5: 80.
- Wong, C. M., Wang, Y., Lee, J. T., Huang, Z., Wu, D., Xu, A., & Lam, K. S. Adropin is a brain membrane-bound protein regulating physical activity via the nb-3/notch signaling pathway in mice. *Journal of Biological Chemistry*. 2014; 289 (37): 25976-25986.
- Wong, Y. H., Lee, C. M., Xie, W., Cui, B., & Poo, M. M. Activity-dependent bdnf release via endocytic pathways is regulated by synaptotagmin-6 and complexin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2015; 112 (32): E4475-4484.
- Woodgett, J. R. Molecular cloning and expression of glycogen synthase kinase-3/factor a. *The EMBO journal*. 1990; 9 (8): 2431-2438.
- Wu, G. Y., Deisseroth, K., & Tsien, R. W. Activity-dependent creb phosphorylation: Convergence of a fast, sensitive calmodulin kinase pathway and a slow, less sensitive mitogen-activated protein kinase pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 98 (5): 2808-2813.
- Wu, H., Yang, S. F., Dai, J., Qiu, Y. M., Miao, Y. F., & Zhang, X. H. Combination of early and delayed ischemic postconditioning enhances brain-derived neurotrophic factor production by upregulating the erk-creb pathway in rats with focal ischemia. *Molecular medicine reports*. 2015; 12 (5): 6427-6434.
- Wu, K., Xu, J. L., Suen, P. C., Levine, E., Huang, Y. Y., Mount, H. T., . . . Black, I. B. Functional trkb neurotrophin receptors are intrinsic components of the adult brain postsynaptic density. *Molecular Brain Research*. 1996; 43 (1-2): 286-290.
- Wu, L., Fang, J., Chen, L., Zhao, Z., Luo, Y., Lin, C., & Fan, L. Low serum adropin is associated with coronary atherosclerosis in type 2 diabetic and non-diabetic patients. *Clinical chemistry and laboratory medicine*. 2014; 52 (5): 751-758.
- Yang, C., DeMars, K. M., Hawkins, K. E., & Candelario-Jalil, E. Adropin reduces paracellular permeability of rat brain endothelial cells exposed to ischemia-like conditions. *Peptides*. 2016; 81: 29-37.
- Ying, S. W., Futter, M., Rosenblum, K., Webber, M. J., Hunt, S. P., Bliss, T. V., & Bramham, C. R. Brain-derived neurotrophic factor induces long-term

- potentiation in intact adult hippocampus: Requirement for erk activation coupled to creb and upregulation of arc synthesis. *J Neurosci*. 2002; 22 (5): 1532-1540.
- Yoshii, A., & Constantine-Paton, M. Bdnf induces transport of psd-95 to dendrites through pi3k-akt signaling after nmda receptor activation. *Nature neuroscience*. 2007; 10 (6): 702-711.
- Yoshii, A., Murata, Y., Kim, J., Zhang, C., Shokat, K. M., & Constantine-Paton, M. Trkb and protein kinase mzepto regulate synaptic localization of psd-95 in developing cortex. *Journal of Neuroscience*. 2011; 31 (33): 11894-11904.
- Yu, H. Y., Zhao, P., Wu, M. C., Liu, J., & Yin, W. Serum adropin levels are decreased in patients with acute myocardial infarction. *Regulatory peptides*. 2014; 190-191: 46-49.
- Yu, X. B., Shacka, J. J., Eells, J. B., Suarez-Quian, C., Przygodzki, R. M., Beleslin-Cokic, B., . . . Noguchi, C. T. Erythropoietin receptor signalling is required for normal brain development. *Development*. 2002; 129 (2): 505-516.
- Zafra, F., Hengerer, B., Leibrock, J., Thoenen, H., & Lindholm, D. Activity dependent regulation of bdnf and ngf mrnas in the rat hippocampus is mediated by non-nmda glutamate receptors. *EMBO Journal*. 1990; 9 (11): 3545-3550.
- Zhao, L. P., Xu, W. T., Wang, L., You, T., Chan, S. P., Zhao, X., & Yang, X. J. Serum adropin level in patients with stable coronary artery disease. *Heart, lung & circulation*. 2015; 24 (10): 975-979.
- Zhao, L. P., You, T., Chan, S. P., Chen, J. C., & Xu, W. T. Adropin is associated with hyperhomocysteine and coronary atherosclerosis. *Exp Ther Med*. 2016; 11 (3): 1065-1070.
- Zhao, Y., Li, J., Tang, Q., Zhang, P., Jing, L., Chen, C., & Li, S. Regulation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 influences hippocampal neuronal survival in a rat model of diabetic cerebral ischemia. *Neural regeneration research*. 2014; 9 (7): 749-756.
- Zhu, L. Q., Wang, S. H., Liu, D., Yin, Y. Y., Tian, Q., Wang, X. C., . . . Wang, J. Z. Activation of glycogen synthase kinase-3 inhibits long-term potentiation with synapse-associated impairments. *Journal of Neuroscience*. 2007; 27 (45): 12211-12220.

Zhu, Y. M., Wang, C. C., Chen, L., Qian, L. B., Ma, L. L., Yu, J., . . . Yan, M. Both pi3k/akt and erk1/2 pathways participate in the protection by dexmedetomidine against transient focal cerebral ischemia/reperfusion injury in rats. *Brain research*. 2013; 1494: 1-8.

Ziemann, U., & Siebner, H. R. Modifying motor learning through gating and homeostatic metaplasticity. *Brain stimulation*. 2008; 1 (1): 60-66.



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Ayşe	Uyruğu	TC
Soyadı	Özkan	Tel no	
Doğum tarihi		e-posta	

Eğitim Bilgileri

Mezun olduğu kurum		Mezuniyet yılı
Lise	Bergama Cumhuriyet Anadolu Lisesi	2007
Lisans	Ege Üniversitesi- Biyoloji/Moleküler Biyoloji ve Genetik	2011
Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi-Fizyoloji Anabilim Dalı	2015
Doktora	Akdeniz Üniversitesi-Fizyoloji Anabilim Dalı	2021

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (yıl-yıl)
Araştırma Görevlisi	Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü	2017-2021

Yabancı Dilleri	Sınav türü	Puanı
İngilizce	YÖKDİL	81,5

Proje Deneyimi

Proje Adı	Destekleyen kurum	Süre (Yıl-Yıl)
Adropinin Öğrenmeye Etkisi ve Mekanizması	Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri	2019-2021
Deneyisel Parkinson Modelinde Adropinin Etki ve Mekanizması	Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri	2018-2020
Yaşlılığa Bağlı Öğrenme Değişikliklerine L-Karnitinin Etkisi ve Moleküler Mekanizması	Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri	2017-2020
Rotenon ile Oluşturulmuş Parkinson Hastalığı Modelinde Vortiksetinin Nörodejenerasyon ve	Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri	2019-2021

Bilişsel Disfonksiyon Üzerine Etkilerinin <i>in vivo</i> Olarak İncelenmesi		
Parkinson Hastalığı Modelinde Melatoninin TLR4 (Toll Benzeri Reseptör 4) İlişkili İnflamatuvar Yolak Üzerine Etkisi	Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri	2018-2020
Deneysel Parkinson Modelinde Asit Dokosaheksaenoik Asit (DHA)'ın Koruyucu Etkisinde Hem Oksijenaz Enziminin Rolü	Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri	2013-2015

Burslar-Ödüller:

Akdeniz Üniversitesi Uluslararası İlişkiler Ofisi – ERASMUS+ Programı – Institut de Neurobiologie de la Mediterranee (INMED)- FRANSA/2018

Türk Fizyolojik Bilimler Derneği, Kasım 2019 – Poster Sunum İkincilik Ödülü

Türk Fizyolojik Bilimler Derneği, Eylül 2017 – Genç Araştırmacı Ödülü

Yayınlar ve Bildiriler:

Hakemli Dergilerde Yayımlanmış Yayınlar (SCI, SCI-E)

- 1) Sinen, O., **Ozkan, A.**, Agar, A., Bulbul, M (2021). Neuropeptide-S Prevents 6-OHDA-Induced Gastric Dysmotility in Rats. Brain Research, doi: 10.1016/j.brainres.2021.147442.
- 2) Guzelad, O., **Ozkan, A.**, Parlak, H., Sinen, O., Afsar, E., Ogut, E., Yildirim, B., Bulbul, M., Agar, A., Aslan, M (2021). Protective mechanism of Syringic acid in an experimental model of Parkinson's disease. Metabolic Brain Disease, doi: 10.1007/s11011-021-00704-9.
- 3) Sinen, O., Bulbul, M., Derin, N., **Ozkan, A.**, Akcay, G., Aydin, M., Agar, A (2020). The effect of chronic neuropeptide-S treatment on non-motor parameters in experimental model of Parkinson's disease. International Journal of Neuroscience, doi: 10.1080/00207454.2020.1754213.

- 4) Bulbul, M., Sinen, O., **Ozkan, A.**, Aydin, M., Agar, A (2019). Central Neuropeptide-S treatment improves neurofunctions of 6-OHDA-induced Parkinsonian rats. *Experimental Neurology*, doi: 10.1016/j.expneurol.2019.02.015.
- 5) Acar, N., Parlak, H., **Ozkan, A.**, Soylu, H., Avci, S., Ustunel, I., Uysal, N., Agar, A (2019). The effect of docosahexaenoic acid on apelin distribution of nervous system in the experimental mouse model of Parkinson's disease. *Tissue and Cell*, doi: 10.1016/j.tice.2018.12.002.
- 6) Parlak, H., **Ozkan, A.**, Dilmac, S., Tanriover, G., Ozsoy, O., Agar, A (2018). Neuronal nitric oxide synthase phosphorylation induced by docosahexaenoic acid protects dopaminergic neurons in an experimental model of Parkinson's disease. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, doi: 10.5603/FHC.a2018.0005.
- 7) Ozsoy, O., Aras, S., **Ozkan, A.**, Parlak, H., Gemici, B., Uysal, N., Aydin, M., Yargicoglu, P., Agar, A (2017). The effect of ingested sulfite on active avoidance in normal and sulfite oxidase-deficient aged rats. *Toxicology Mechanism and Methods*, doi: 10.1080/15376516.2016.1253812.
- 8) **Ozkan, A.**, Parlak, H., Tanriover, G., Dilmac, S., Ulker, S., Birsen, I., Agar, A (2016). The protective mechanism of docosahexaenoic acid in mouse model of Parkinson: The role of heme oxygenase. *Neurochemistry International*, doi: 10.1016/j.neuint.2016.10.012.
- 9) Ozsoy, O., Aras, S., **Ozkan, A.**, Parlak, H., Aydin, M., Yargicoglu, P., Agar, A (2016). The effect of ingested sulfite on visual evoked potentials, lipid peroxidation, and antioxidant status of brain in normal and sulfite oxidase-deficient aged rats. *Toxicology and Industrial Health*, doi: 10.1177/0748233714552688.
- 10) Yildirim, F., Ozsoy, O., Tanriover, G., Kaya, Y., Ogut, E., Gemici, B., Dilmac, S., **Ozkan, A.**, Agar, A., Aydin, M (2014). Mechanism of the beneficial effect of melatonin in experimental Parkinson's disease. *Neurochemistry International*, doi: 10.1016/j.neuint.2014.09.005.

Ulusal ve Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitaplarında Basılan Bildiriler:

- 1) **Ozkan, A.**, Parlak, H., Ozsoy, O., Tanrıover, G., Dılmac, S., Turgut, E., Yargıoğlu, P., Agar, A (2020). The Effect of Sodium Metabisulphite on Apoptosis in the Experimental Model of Parkinson's Disease. Current Nutrition Food Science, 64, (3) 296-305., Doi: 10.2174/1573401314666180503153444.
- 2) Nemutlu, Dilara., Akcay, G., **Ozkan, A.**, Derin, N., Agar, A., Ozbey, G (2020). The Effects of Vortioxetine on Motor and Cognitive Dysfunction in Rotenone-Induced Rat Model of Parkinson's Disease. Federation of European Neuroscience Societies (FENS) 2020 Virtual Forum (Poster)
- 3) **Ozkan, A.**, Bulbul, M., Sinen, O., Derin, N., Akcay, G., Aydın, M, Agar, A (2019). The Effect of Central Neuropeptide-S on MPTP-induced Behavioral Changes in Mice. Acta Physiologica, 227 (Supplement: 722), 87-87. (Uluslararası) (Hakemli) (Makale Özet)
- 4) Sinen, O., Bulbul, M., **Ozkan, A.**, Derin, N., Akcay, G., Parlak, H., Aydın, Mutay., Agar, A (2019). Neuroprotective Effect of Neuropeptide-S on Cognitive Functions in the Experimental Model of Parkinson's Disease. Acta Physiologica, 227 (Supplement: 722), 88-88. (Uluslararası) (Hakemli) (Makale Özet)
- 5) Bulbul, M., Derin, N., Sinen, O., Akcay, G., **Ozkan, A.**, Agar, A (2018). Effect of Central Exogenous Neuropeptide-S on 6-OHDA-induced Cognitive and Behavioral Changes in Rats. Acta Physiologica, 225 (Supplement: 716), 40-40. (Uluslararası) (Hakemli) (MAKALE Özet)
- 6) Sarac, C., Akcay, G., Danışman, B., **Ozkan, A.**, Derin, N (2018). Investigation of the Effects of L-Carnitine on Age Related Learning Changes and the Regulation of Glutamate Levels by Behavioral and Molecular Methods. Acta Physiologica (Uluslararası) (Hakemli) (Makale Özet)
- 7) Parlak, H., Acar, N., **Ozkan, A.**, Soylu, H., Avcı, S., Ustunel, I., Uysal, N., Agar, A (2018). The Effect of Docosahexaenoic Acid (DHA) on Apelin and Apelin Receptor Protein Distribution of Pons and Cerebellum in the Experimental Model of Parkinson's Disease. Acta Physiologica, 225 (Supplement: 716), 39-39. (Uluslararası) (Hakemli) (Makale Özet)

- 8) Bulbul, M., Sinen, O., Aydın, M., **Ozkan, A.**, Agar, A (2018). Treatment of Experimental Rat Parkinson Model with Central Neuropeptide-S: Neuroprotective and Alleviative Features. *Acta Physiologica*, 225 (Supplement: 716), 18-18. (Uluslararası) (Hakemli) (Makale Özet)
- 9) Bulbul, M., Abueid, L., Sinen, O., **Ozkan, A.**, Agar, A (2018). The Effect of Central Exogenous Neuropeptide-S in 6-OHDA-Induced Gastrointestinal Dysfunction in Rats. *Acta Physiologica*, 225 (Supplement: 716), 47-47 (Uluslararası) (Hakemli) (Makale Özet)
- 10) Avcı, S., Birsen, I., **Ozkan, A.**, Parlak, H., Soylu, H., Kilinc, L., Agar, A., Uysal, N., Ustunel, I (2017). The Effect of Docosahexaenoic Acid on TNF- α Level and Mast Cell Number in the Stomach of Mice in 1-Methyl-4-Phenyl-1.2.3.6.-Tetrahydropyridine-induced Parkinson's Disease. 15th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry (Özet Bildiri/Poster)
- 11) Uysal, N., Birsen, I., Avcı, S., **Ozkan, A.**, Parlak, H., Agar, A., Ustunel, I (2017). Effect of Docosahexaenoic Acid on Apoptosis in the Stomach in 1-Methyl-4-Phenyl-1.2.3.6.- Tetrahydropyridine-induced Parkinson's Disease. *Acta Physiologica* (Uluslararası) (Hakemli) (Makale Özet) (Yayın No: 3959532)
- 12) Bulbul, M., Sinen, O., Uysal, N., Ozsoy, O., Akkoyunlu, G., Parlak, H., **Ozkan, A.**, Birsen, I., Agar, A (2016). The Protective Effect of Central Exogenous Neuropeptide-S on Parkinson's Disease. *Acta Physiologica*, 218 (Supplement: 709), 71-71 (Uluslararası) (Hakemli) (Makale Özet)
- 13) **Ozkan, A.**, Parlak, H., Ulker, S., Dilmac, S., Agar, A (2015). The Role of Heme Oxygenase on the Protective Effect of Docosahexaenoic Acid in an Experimental Model of Parkinson's Disease. *Acta Physiologica*, 215 (Supplement 704), 40-40 (Uluslararası) (Hakemli) (Makale Özet)
- 14) Parlak, H., **Ozkan, A.**, Dilmac, S., Agar, A (2015). The Effect of Docosahexaenoic acid (DHA) on nNOS Pathway in the Experimental Model of Parkinson's Disease. *Acta Physiologica*, 215 (Supplement 704), 19-19 (Uluslararası) (Hakemli) (Makale Özet)

EKLER

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
2019
KARAR

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Akdeniz Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu		
	AÇIK ADRESİ:	Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Morfoloji Binası A Blok 1. Kat No: A1-05 Kampüs /ANTALYA		
	TELEFON	0 (242) 249 69 54		
	FAKS	0 (242) 249 69 03		
	E-POSTA	akhadye@akdeniz.edu.tr		
SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof. Dr.Aysel AĞAR			
ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Adropinin Öğrenmeye Etkisi ve Mekanizması			
BAŞVURU FORMU ID/ PROTOKOL NO	888/2019.04.002			
	Çalışma süresi	Denek türü	Denek Sayısı	Denek Cinsiyeti
	24 Ay	Sıçan/Sprague Dawley	30	Erkek
	Araştırma Sonunda Deneklere Uygulanacak İşlemler	Deney protokolünün uygulanmasından sonra ötenazi yapılacaktır.		
KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 58	Tarih: 15.04.2019		
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru görüşülerek, ilgili projenin etik açıdan bir sakınca içermediği tespit edildiğinden, çalışmanın yapılmasının uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.			