

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

FARKLI DOZLARDAKİ SÜLFİTİN ÖĞRENME VE
HAFIZA ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNDE
ASETİLKOLİNİN ROLÜ

Betül DANIŞMAN

DOKTORA TEZİ

2021-ANTALYA

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

FARKLI DOZLARDAKİ SÜLFİTİN ÖĞRENME VE
HAFIZA ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNDE
ASETİLKOLİNİN ROLÜ

Betül DANIŞMAN

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Narin DERİN

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TDK-2018-3762 proje numarası ile desteklenmiştir.

“Kaynakça gösterilerek tezimden yararlanılabilir”

2021-ANTALYA

TEŞEKKÜR

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalında eğitimim süresince gerek kişisel gerekse mesleki alanda desteğini esirgemeyen, her an yol göstericimiz olan, öğrencisi olmaktan dolayı büyük mutluluk ve gurur duyduğum sevgili danışman hocam Prof. Dr. Narin DERİN'e,

Doktora eğitimim süresince bilgilerini ve desteklerini esirgemeyen, eğitimime büyük katkılar sağlayan kıymetli bölüm hocalarıma,

Tez çalışmalarım boyunca beni yalnız bırakmayan ekip arkadaşım Arş. Gör. Güven AKÇAY başta olmak üzere tüm çalışma arkadaşlarıma,

Hayatım boyunca destek ve emeklerini benden esirgemeyen, sevgileriyle her zaman yanımda olan çok kıymetli annem Sevgi HATİPOĞLU ve babam İsmail HATİPOĞLU başta olmak üzere eşim Rahmi DANIŞMAN'a, ablalarım Arzu TUNA ve Dilek ŞAHİN'e ve çocuklarım Buğlem Su, Berat ve Boran'a,

sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunuyorum.

ÖZET

Amaç: Sülfitin öğrenme üzerinde olumsuz etkileri bilinmesine rağmen, moleküler mekanizmalara ilişkin yeterli bilgi bulunmamaktadır. Çalışmamızda, nörotoksik etkileri bilinen sülfitin farklı dozlarının öğrenme ve bellek üzerine etkileri davranış deneyleri ve uzun süreli güçlenme kayıtları (LTP) ile değerlendirilmiştir. Sülfitin öğrenme ve bellek üzerindeki etkilerinde asetilkolinin (ACh) rolü ve olası aracı mekanizmalarının neler olabileceği araştırılmıştır.

Yöntem: Wistar sıçanlar 3 gruba ayrılmıştır. 35 gün boyunca kontrol grubuna distile su, sülfid gruplarına ise 100 mg/kg ve 260 mg/kg dozunda sodyum metabisülfid gavaj yoluyla uygulanmıştır. Davranış değişiklikleri Morris su testi, açık alan testi ve yeni obje tanıma testi ile değerlendirilmiştir. LTP kayıtları alındıktan sonra çıkarılmış, ACh, Arc ve sinapsin I düzeyleri, AChE ve ChAT enzim aktiviteleri ölçülmüştür.

Bulgular: Sülfid gruplarında açık alan testinde ve Morris su tankı testinin test gününde alınan toplam yol ve ortalama hızın arttığı, yeni obje tanıma testinde ise ayırım indeksinin sülfid uygulanan gruplarda azaldığı görülmüştür. AChE aktivitesi sülfid uygulanan gruplarda düşerken, ACh miktarı ve ChAT aktivitesi artmıştır. Ayrıca sülfid uygulanan gruplarda elde edilen alan potansiyellerinin EPSP eğiminin ve PS genliğinin güçlenmesinin azaldığı tespit edilmiştir. Bu bozulmaya Arc ve sinapsin 1 ekspresyonundaki azalmanın eşlik ettiği bulunmuştur.

Sonuç: Çalışmamızda yetişkinlerde sülfid alımının uzaysal hafıza ve öğrenmeyi bozulduğu, bu bozulmaya kolinerjik sinyal yolağının aracılık edebileceği gösterilmiştir. Arc ve sinapsin ekspresyonundaki azalmanın toksisiteden kaynaklı LTP yanıtlarında meydana gelen bozulmaların altında yatan mekanizmada rol oynayabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: sülfid, öğrenme ve hafıza, asetilkolin, hipokampus, LTP

ABSTRACT

Objective: Although the negative effects of sulphite on learning and memory have been known, the information on molecular mechanisms is insufficient. In our study, the effects of different doses of sulfite, which is known to have neurotoxic effects, on learning and memory were evaluated by behavioral experiments and LTP recordings. The role of ACh in the effects of sulfite on learning and memory, and its possible mediating mechanisms were investigated.

Method: Wistar rats were divided into three groups. Distilled water was given control group, sodium metabisulphite at dose of 100 mg/kg and 260 mg/kg was given the sulphite groups for 35 days by gavage. Behavioral changes were evaluated using the Morris Water Maze, Open Field and New Object Recognition test. After LTP recordings were taken, hippocampi were removed. ACh, Arc and synapsin levels, AChE and ChAT enzyme activities were measured in hippocampus tissues.

Results: It has been observed that the total distance and average velocity performed in the Open Field test and Morris Water Maze prop trial were increased, the discrimination index in the New Object Recognition test decreased in the sulphite applied groups. While AChE activity decreased in the sulphite applied groups, ACh levels and ChAT activity increased. In addition, it has been observed that the EPSP slope and PS amplitude of the field potentials obtained in sulphite applied groups decreased. This deterioration was found to be accompanied by a decrease in Arc and synapsin 1 expression.

Conclusion: In conclusion, it has been shown that sulphite intake in adults impairs learning and spatial memory, this impairment may be mediated by the cholinergic signal pathway. It is considered that the decrease in Arc and synapsin expression may play a role in the mechanism underlying the impairment in LTP responses caused by toxicity.

Key words: sulfite, learning and memory, acetylcholine, hippocampus, LTP

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
TABLolar DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR	viii
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1. Sülfıt	3
2.1.1. Sülfıt Kullanımının Tarihçesi ve Sülfıt'ın Yapısı	3
2.1.2. Sülfıtın Endojen ve Ekzojen Kaynakları	5
2.1.3. Sülfıt Metabolizması	7
2.1.4. Sülfıt Toksisitesi	8
2.2. Öğrenme ve Hafıza	9
2.2.1. Hafızanın Sınıflandırılması	9
2.2.2. Sinaptik Plastisite	14
2.2.3. Hipokampus	17
2.2.4. Öğrenme ve Hafızada Hipokampusun Rolü	19
2.3. LTP'nin Biyobelirteçleri	21
2.3.1. Arc Proteini	21
2.3.2. Sinapsin Proteinleri ve Alt Tipleri	24
2.4. Asetilkolin	27
2.4.1. Asetilkolin Metabolizması	29
2.4.2. Kolinerjik Yolak ve Öğrenme	33

3.GEREÇ VE YÖNTEM	35
3.1. Gruplandırma ve Deney Protokolü	35
3.2. Öğrenme Deneyleri	36
3.2.1. Morris Su Tankı Testi	36
3.2.2. Açık Alan Testi	37
3.2.3. Yeni Obje Tanıma Testi	37
3.3. LTP Parametreleri	39
3.3.1. Elektrofizyolojik Kayıt Alınması	38
3.4. Biyokimyasal Parametrelerin Tayini	42
3.4.1. Plazma-S-Sülfonat Tayini	42
3.4.2. Asetilkolinesteraz Aktivitesi	42
3.4.3. Kolin Asetiltransferaz Aktivitesi	43
3.4.4. Western Blot ile Arc ve Sinapsin 1'in Ekspresyonlarının Analizi	44
3.4.5. Kütle Spektrometresi ile Asetilkolin Tayini	44
3.3.6. İstatiksel Analiz	45
4.BULGULAR	46
4.1. Genel Görünüm	46
4.2. Öğrenme Deneyi Bulguları	46
4.2.1. Morris Su Tankı Testi	46
4.2.2. Açık Alan Testi Sonuçları	48
4.2.3. Yeni Obje Tanıma Testi	49
4.3. LTP kaydı ile İlişkili Bulgular	49
4.4. Biyokimyasal Parametre Bulguları	51
4.4.1. Plazma-S-Sülfonat Bulguları	51
4.4.2. Asetilkolin, Asetilkolinesteraz ve Kolinasetiltransferaz Aktiviteleri	51
4.4.3. Arc ve Sinapsin 1 Seviyeleri	52
5.TARTIŞMA	54
6.SONUÇ VE ÖNERİLER	64
KAYNAKLAR	65
ÖZGEÇMİŞ	83

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 2.1.	Gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılan sülfid bileşikleri ve bu ürünlerden üretilen SO ₂ yüzdesi	4
Tablo 4.1.	Açık alan testinde, gruplara ait, girilen kare sayısı, toplam yol ve hız değerleri verilmiştir	48
Tablo 4.2.	Hipokampus dokularında ölçülen asetilkolin düzeyi, AChE ve ChAT enzimlerinin aktiviteleri	52

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	Sodyum metabisülfitin yapısal formülü	5
Şekil 2.2.	Endojen sülfid üretimini aşamaları	5
Şekil 2.3.	Sülfid metabolizması	7
Şekil 2.4.	Hafızanın sınıflandırılması	10
Şekil 2.5.	Hipokampusun ana hücreleri, impuls trafiğı ve bağlantıları	18
Şekil 2.6.	Arc ekspresyonunun düzenlenmesi	22
Şekil 2.7.	Arc'ın hücresel işlevleri	23
Şekil 2.8.	Sinapsinlerin temel fonksiyonları	25
Şekil 2.9.	Merkezi sinir sisteminde asetilkolin yolları	28
Şekil 2.10.	Asetilkolinin sentezi ve yıkımı	29
Şekil 3.1.	Deney protokolünün akış şeması	35
Şekil 3.2.	Morris Su Tankı testi protokolü	36
Şekil 3.3.	Açık Alan Testi Deneyi Protokolü	37
Şekil 3.4.	Yeni Obje Tanıma Protokolü	38
Şekil 3.5.	LTP kaydı sırasında kullanılan elektrotların yerleşimi	39
Şekil 3.6.	LTP kaydının deney protokolü şeması	41
Şekil 3.7.	EPSP eğimi ve PS genliğinin hesaplanması	42
Şekil 4.1.	Morris Su Tankı testinde ilk beş günlük test denemelerinde platformu bulma süresi	46
Şekil 4.2.	Morris Su Tankı testinde test aşamasına (6.gün) ait veriler	47
Şekil 4.3.	Morris Su Tankı testinin 6.gününde yani test aşamasında sıçanların hedef kadrana giriş frekansı	48

Şekil 4.4.	Yeni obje tanıma testinde grupların ayırım indeksi değerleri	49
Şekil 4.5.	Dentat girus alan potansiyeli EPSP verileri	50
Şekil 4.6.	Dentat girus alan potansiyeli PS verileri	50
Şekil 4.7.	Deney gruplarının plazma S-Sülfonat değerleri	51
Şekil 4.8.	Arc ve Sinapsin immünoreaktif protein bantlarının β -aktin ile birlikte gösterimi	52
Şekil 4.9.	Hipokampus dokularında Arc ve Sinapsin protein seviyelerinin β -aktine orantısal relatif değerleri	53



SİMGELER ve KISALTMALAR

4-HNE	: 4-hidroksinonenal
AC	: Adenilat siklaz
ACh	: Asetilkolin
AChE	: Asetilkolinesteraz
ADI	: Günlük kabul edilebilir düzey
AMPA	: 2-amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksalon propionik asit
AMPAR	: AMPA reseptörlerinin
Arc	: Aktivite ile düzenlenen hücre iskeleti ile ilişkili protein
ATP	: Adenozin trifosfat
BDNF	: Beyin kaynaklı nörotrofik faktör
CA	: Cornu ammonis
Ca⁺²	: Kalsiyum
CaMKII	: Kalsiyum/kalmodulin kinaz II
cAMP	: Siklik Adenozin Monofosfat
ChAT	: Kolin asetiltransferaz
CREB	: cAMP-duyarlı eleman bağlama proteini
DAG	: Diaçilgliserol
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EPSP	: Eksitator postsinaptik potansiyel
ERK	: Extracellular-signal-regulated kinase
FAO	: Gıda ve Tarım Örgütü
FDA	: Gıda ve ilaç dairesi

H⁺	: Hidrojen
HFS	: Yüksek frekanslı stimölasyon
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
H₂S	: Hidrojen Sülfür
HSO₃	: Bisülfıt ıyonu
H₂SO₃	: Sülfüröz asit
IP₃	: İnozitöl üç fosfat
JECFA	: FAO/WHO Gıda Katkı Maddeleri Uzman Komitesi
K⁺	: Potasyum
K₂S₂O₅	: Potasyum metabisülfıt
KHSO₃	: Potasyum bisülfıt
LTD	: Uzun süreli baskılanma
LTP	: Uzun süreli güçlenme
Mg⁺²	: Magnezyum
mGluR	: Metabotropik glutamat reseptörler
mRNA	: Mesajcı ribonükleik asit
Na⁺²	: Sodyum
Na₂S₂O₅	: Sodyum metabisülfıt
NaHSO₃	: Sodyum bisülfıt
NaSO₃	: Sodyum sülfıt
NMDA	: N-metil-D-aspartat
NMDAR	: NMDA reseptörü
NR2A	: NMDA reseptörü alt birimi

NR2B	: NMDA reseptörü alt birimi
PKA	: Protein kinaz-A
PKC	: Protein kinaz-C
PS	: Populasyon spike
RNA	: Ribonükleik asit
SO₂	: Sülfür dioksit
SO₃⁻	: Sülfür trioksit
SO₃⁻²	: Sülfid iyonu
SO₄⁻²	: Sülfat
S₂O₅⁻²	: Metabisülfid anyonunu
SOX	: Sülfid oksidaz
TUNEL	: Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labeling
TBARS	: Tiyoarbitürik asit reaktif madde
TrkB	: Tropomyosin reseptör kinaz B
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü

1. GİRİŞ

Günümüzde hazır gıda tüketiminin giderek artmasına bağlı olarak, paketli gıda ürünlerinin depolanması, raf ömürlerinin uzatılması için gıda katkı maddeleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Gıda katkı maddeleri zararlı mikroorganizmaların üremesini engellemek, tat ve renk değişimini önlemek amacıyla kullanılan kimyasal ajanlardır. Her ne kadar Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) ve Gıda Katkı Maddeleri Ortak Uzmanlar Komitesi gibi uluslararası komisyonlar tarafından güvenilir günlük alınabilir düzeyler açıklansa da yapılan araştırmalar bu düzeylerin sıklıkla aşıldığını göstermektedir (Vandevijvere ve ark. 2010).

Sülfite bileşikler, çok eski zamanlardan beri hem geniş etkisinden hem de ucuz maliyetinden dolayı yaygın olarak kullanılan gıda katkı maddelerindendir (El Kadi ve ark., 2014). Diyetle alınan sülfite tuzları gastrointestinal sistemden emilerek beyin dahil bütün vücut organlarına yayılmakta ve su ile reaksiyona girerek toksisite yaratan ürünler oluşturmaktadırlar (Simon, 1986). Sülfite bu toksik ürünleri deoksiribonükleik asit (DNA), proteinler, lipitler gibi birçok hücresel bileşiklerle etkileşime girerek geri dönüşümsüz hücre hasarına sebep olmaktadır (Rencüzoğulları ve ark., 2001). Sülfite merkezi sinir sistemi üzerine etkileri ile ilgili bir çok araştırma yapılmış, hem moleküler düzeyde hem de öğrenme ve hafıza süreçlerinde olumsuz etkileri olduğu rapor edilmiştir (Akdogan ve ark., 2011; Ozsoy ve ark., 2012; Noorafshan ve ark., 2013; Kencebay ve ark., 2013).

Davranış testleri ve elektrofizyolojik kayıtlar, öğrenme ve hafıza işlevlerinin deneysel olarak çalışılmasını mümkün kılan güvenilir metotlardır. Morris su tankı testi uzaysal öğrenme ve hafızanın incelenmesinde, yeni obje tanıma testi ise bilişsel işlevlerin, özellikle de tanıma belleğinin değerlendirilmesinde kullanılmaktadır (Mutlu, 2016). Diğer yandan açık alan testi spontan motor aktiviteyi, çevreyi keşfetme davranışını ve otonom fonksiyonları değerlendirmek için kullanılan bir davranış testidir (Karson ve ark., 2008).

Öğrenme, nöronal sistemlerin adapte olabilmelerini ve plastisitelerini gerektirmektedir. Cajal (Cajal, 1911) mental egzersiz sonrasında nöronlar arasındaki bağlantıların değişebileceğini ve çoğalabileceğini ifade etmiştir. Özellikle tekrarlanan yüksek frekanslı uyarılardan sonra fonksiyonel değişimler yanında,

yapısal değişiklikler de görölmektedir. Öğrenmenin gerçekleşebilmesi için aktiviteye bağımlı sinaptik iletimde uzun süreli artış, uzun süreli güçlenme (Long-term potentiation, LTP) olarak tanımlanır (Bliss ve Collingridge, 1993). LTP'nin nöronal plastisitenin altında yatan moleküler ve hücresel mekanizmaları anlamak için en yaygın kullanılan paradigma olduğu, öğrenme ve hafıza için model oluşturduğu düşünölmektedir (Bliss ve Collingridge, 1993).

Yapılan araştırmalar, uzun süreli hafızanın oluşumu sırasında, Arc (activity-regulated cytoskeleton associated protein=Aktivite ile düzenlenen hücre iskeleti ile ilişkili protein) proteininin düzenleyici rol üstlendiğini ortaya koymuştur (Bramham ve Messaoudi, 2005; Messaoudi ve ark., 2007). Nitekim, Arc mesajcı ribonökleik asidin (mRNA), LTP indüksiyonunu takiben dendritik süreçlerde hızlı bir şekilde artması, Arc'ı özellikle sinaps konsolidasyonu ile ilişkili kılmaktadır (Steward ve Worley, 2001a). Kolinerjik kaybın, hipokampal nöronlarda Arc protein miktarında azalmaya sebep olduğu ve kolinerjik yolak aracılı uzaysal öğrenmede Arc proteinin rol oynadığı gösterilmiştir (Gil Bea ve ark., 2011). Sinapsin I, presinaptik plastisiteye aracılık eden fosfoproteindir (Greengard ve ark., 1993). Sinapsin I, sinaptik veziküllerin ekzositoz için uygunluğunu düzenleyerek nörotransmitter salınımında önemli rol oynamakta ve sinapsin I'in artması sinaptik aktivite artışının göstergesi olarak değerlendirilmektedir (Llinas ve ark., 1985; Nayak ve ark., 1996).

Asetilkolin (ACh) sinir sisteminde bir nöromodölatör olarak fonksiyon görmektedir. ACh, kolinerjik nöronların gövdesinde kolinasetiltransferaz (ChAT) enzimi tarafından kolin ve asetil-CoA'dan sentez edilir. Sinaptik aralığa salınan ACh, asetilkolinesteraz (AChE) enzimi aracılığıyla kolin ve asetata parçalanarak yıkılır. ACh'in sentezi ve yıkımı arasındaki denge kolinerjik iletimin devamlılığı için gereklidir. Beyinde kolinerjik sistemin hasarlanmasının öğrenme ve hafıza disfonksiyonu yarattığı birçok çalışma ile gösterilmiştir (Grothe ve ark., 2010; Teipel ve ark., 2014).

Bu bilgilerin ışığında çalışmamızda, nörotoksik etkileri bilinen sülfitin diyetle alınan farklı dozlarının öğrenme ve bellek üzerine etkilerini davranış deneyleri ve LTP kayıtları ile ortaya koymak, LTP oluşumunda etkileri gösterilmiş olan Arc ve sinapsin I ekspresyonlarının katkılarını araştırmak ve ilgili süreçlere ACh sentez ve salınımının katkısı olup olmadığını araştırmak hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

1. Sülfıt

Sülfıt katkı maddesi ve koruyucu olarak birçok sektörde çeşitli amaçlar için kullanılabildiği gibi sülfür içeren aminoasitlerin katabolizması sırasında vücutta endojen olarak da üretilebilir (Gunnison ve ark., 1978).

2.1.1. Sülfıt Kullanımının Tarihçesi ve Sülfıt'ın Yapısı

Sülfıtlar uzun yıllardan beri farklı kullanım amaçları nedeniyle hayatımızda yer almaktadır. Sülfıt bileşiklerini, Eski Yunanlılar evlerini dezenfekte etmek amacıyla kullanırken, Romalılar ve Mısırlılar şarap kaplarının sanitasyonunda sülfür dioksit (SO₂) buharlarından faydalanmışlardır. Sülfıtlar, 1664 yılının sonlarına doğru koruyucu olarak kullanılmaya başlanmış, ilk olarak, elma şaraplarının depolandığı fıçı ve mataralar sülfıtla muamele edilmiştir (Taylor ve ark., 1986a; Güneş, 2014). 1921 yılında sodyum bisülfıt, 1930 yılında sodyum sülfıt ve 1939 yılında ise sodyum-potasyum bisülfıt gıda katkı maddesi olarak kullanılmaya başlanmıştır (Taylor ve ark., 1986a). Günümüzde ise antimikrobiyal, enzim inhibitörü ve indirgeyici bir ajan olduğu bilinen sülfıtın gıda kalitesinin ve görünümünün iyileştirilmesi, raf ömrünün uzatılması gibi amaçlarla kullanımı yaygın olarak devam etmektedir (El Kadi ve ark., 2014). Et ürünleri, şaraplar, meyve suları, patatesler, bisküviler, alkollü içecekler gibi gıda maddelerinin kullanımı yanında, kozmetik ürünleri ve ilaçlarda da sülfıt kullanılmakta ve sülfıt maruziyeti oluşmaktadır. Gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılan sülfıt bileşikleri ve kodları Tablo 1'de verilmiştir.

Sülfıt bileşikleri 1959 yılından itibaren Gıda ve İlaç İdaresi (Food and Drug Administration, FDA) tarafından güvenli bileşikler olarak listelenmesine rağmen, yüksek dozlarda tüketilmesi toksisiteye sebep olmaktadır (Dalton-Bunnow, 1985).

Tablo 2.1. Gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılan sülfite bileşikler ve bu ürünlerden üretilen SO₂ yüzdesi

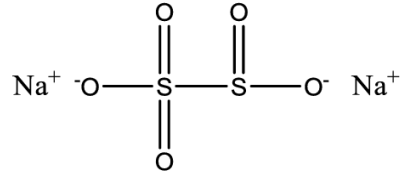
İsim	Kodu	Kimyasal Formülü	Teorik Olarak SO ₂ Üretimi (%)
Sülfür dioksit	E-220	SO ₂	100
Sodyum sülfite	E-221	Na ₂ SO ₃	50.8
Sodyum hidrojen sülfite (Sodyum bisülfite)	E-222	NaHSO ₃	61.6
Sodyum metabisülfite	E-223	Na ₂ O ₅ S ₂	67.4
Potasyum metabisülfite	E-224	K ₂ O ₅ S ₂	57.6
Kalsiyum sülfite	E-226	CaSO ₃	Yok
Kalsiyum hidrojen sülfite	E-227	Ca(HSO ₃) ²	Yok
Potasyum hidrojen sülfite	E-228	KHSO ₃	53.5

Sülfitler suda çözüldüklerinde, sülfüroz asit (H₂SO₃), bisülfite iyonu (HSO₃) ve sülfite iyonu (SO₃⁻²) oluşturmaktadır (Dalton-Bunnnow, 1985). Sulu sülfite solüsyonları veya kuru sülfite tuzları hava ile temas ettiğinde veya asitli ortamda bulunduklarında SO₂ gazı açığa çıkmaktadır (Fan ve Book, 1987). Gıdalarla alınan sülfite pH'nın düşük olduğu mide gibi asidik ortamlarda daha fazla SO₂ ortaya çıkmakta, oluşan SO₂ gastrointestinal sistem tarafından absorbe edilerek sistemik dolaşıma geçmekte ve dokulara dağılmaktadır (Simon, 1986). Tablo 2.1'de sülfite bileşiklerinin SO₂ oluşturma kapasiteleri verilmiştir (Ough ve Were, 2005; EFSA, 2016)

Çalışmamızda kullanılan sodyum metabisülfite kimyasal formülü Na₂S₂O₅, kodu ise E223 olan, sodyum katyonu (Na⁺) ve metabisülfite anyonunu (S₂O₅⁻²) içeren iyonik bir bileşiktir. Moleküler ağırlığı 190.11 g/mol' dür (EFSA, 2016).

Metabisülfite, iki sülfür atomu arasında doğrudan bağlantıya sahiptir. Birinci sülfür atomu üç oksijen atomuna bağlanır ve +5 oksidasyon durumu gösterir diğer sülfür atomu +3 oksidasyon durumu gösterir ve iki oksijen atomuna bağlanır (Şekil 2.1). Sodyum metabisülfite suda oldukça çözünür bir bileşiktir, çözünürlüğü 20°C sıcaklıkta 65.3g/100mL'dir. Suda, Na₂S₂O₅ çok keskin ve hoş olmayan kokusu olan

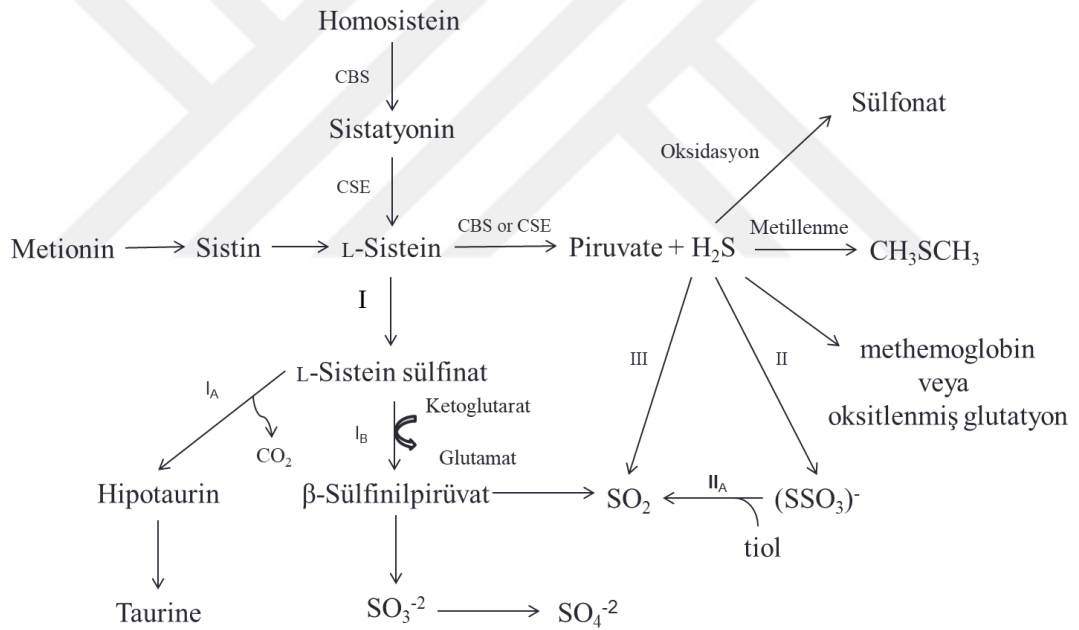
SO₂ gazını serbest bırakır, bu gaz insanlarda solunum problemlerine yol açabilmektedir (EFSA, 2016).



Şekil 2.1. Sodyum metabisülfitin yapısal formülü

2.1.2. Sülfitin Endojen ve Ekzojen Kaynakları

Sülfid insan vücudunda metionin ve sistein gibi sülfür içeren aminoasitlerin katabolizmasıyla endojen olarak oluşur (Şekil 2.2) (Wang ve ark., 2010; Schwarz, 2016).



Şekil 2.2. Endojen sülfid üretiminin aşamaları. I, sistein dioksijenaz; I_A, sistein sülfinat dekarboksilaz; I_B, aspartat aminotransferaz; II, sülfid oksidaz; II_A, tiyosülfat sülfürtransferaz veya indirgenmiş glutatyon bağımlı tiyosülfat redüktaz; III, NADPH oksidaz; CBS, sistatyonin β-sentaz; CSE, sistatyonin γ-sentaz

Sülfid sentezi sitoplazmada bulunan sisteinin, sistein dioksijenaz enzimi ile sistein sülfinata çevrilmesi ile başlar. Sistein sülfinat aspartat transporter ile mitokondriye taşınır ya da sitozolde kalır (Schwarz, 2016). Mitokondride, sistein sülfinat mitokondrial aspartat aminotransferaz enzimi ile β-sülfenilpirüvatı oluşturur. Daha

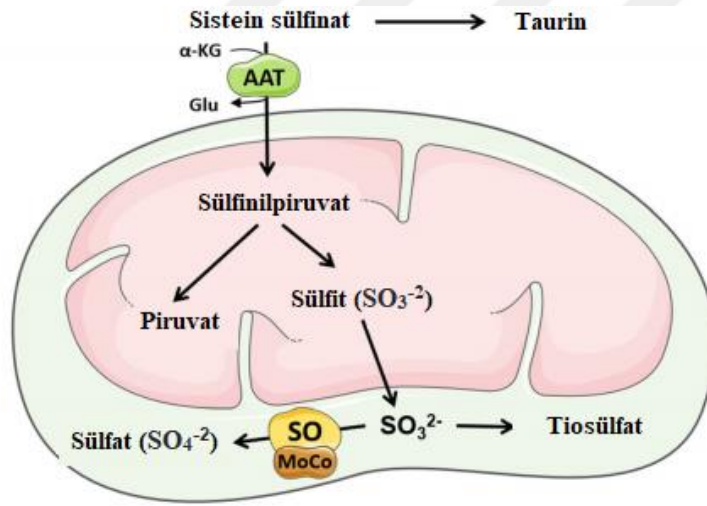
sonra spontan desülfinasyona uğrar ve sonuçta SO_3^{-2} oluşur (Schwarz, 2016). Sitozolda kalan sistein sülfinat ise sitoplazmik aspartat aminotransferaz enzimi aracılığıyla son ürün olarak sülfid oluşturur. Oluşan sülfid mitokondriyal membrandan geçerek mitokondride sülfata (SO_4^{-2}) dönüşür. Sülfid ayrıca hipotaurinin metabolizması sırasında da oluşabilir (Schwarz, 2016). Hidrojen sülfürün (H_2S) oksidasyonu sürecinde de az miktarda sülfid oluşmaktadır (Shapiro, 1977). Homosisteinden sistatyonin β -sentetazın ve sistatyonin α -sentazın etkisiyle sülfid üretilmektedir (Shapiro, 1977).

Sülfidin ekzojen kaynakları ise yiyecekler, içecekler, solunan hava ya da farmakolojik ürünlerdir. Sülfid yiyecek ve içeceklerin renklerinde, tadında ya da kokusunda istenmeyen değişiklikleri önlediğinden, kurutulmuş meyve, meyve suları, şarap, konserve gibi pek çok işlenmiş yiyecek ve içekte ayrıca restoran yemeklerinin hazırlanmasında kullanılmaktadır. (Güneş, 2014). Sülfid gıdalara eklendiğinde birçok gıda bileşeni ile reaksiyona girmektedir (Taylor ve ark., 1986a). Literatürde gıdalardaki tiaminin sülfat ajanları tarafından parçalandığı ve etkisiz hale getirildiği bildirilmiştir (Davidson, 1992). Bu sebeple sülfid çalışmalarında, tiamin eksikliği problemi oluşmaması için sülfid mideye tüple verilir. İndirgenmiş şekerler, doymamış organik bileşikler, kararmaya neden olan karbonil ara ürünleri de sülfidin reaksiyona girdiği bileşiklerden birkaçıdır. Reaksiyonun süresi pH'ya, ısıya, sülfid konsantrasyonuna ve gıdanın çeşidine bağlıdır (Wedzicha, 1992).

DNA gibi biyolojik öneme sahip birçok molekülle reaksiyona girebilen sülfidin toksik etkilere neden olduğu bilinmektedir (Gunnison, 1981). Ayrıca sülfid süperoksit gibi serbest radikaller üreterek toksik etki gösterdiğinden sülfid tüketiminin sınırlandırılması gerektiği düşünülmüştür (Til ve ark., 1972; Kushner ve ark., 2005; Kencebay ve ark., 2013). Nitekim, 1986 yılında, FAO/WHO Gıda Katkı Maddeleri Uzman Komitesi (JECFA) (JECFA, 1987), % 0.25 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ takviyeli gıda tüketiminin, günlük 72 mg/kg SO_2 alımına eşdeğer olması sebebiyle, SO_2 ve sülfid için günde 100 kat güvenlik faktörü ekleyerek, 0.7 mg/kg olarak kabul edilen günlük alım miktarını (ADI) kabul etmiştir. Gıda katkı maddesi olarak SO_2 kullanımından beklenen ortalama maruziyet, tüm popülasyon gruplarında günde 0.23 ila 2.21 mg/kg arasında değiştiği rapor edilmiştir (EFSA, 2016). Bütün bilinen toksik etkilerine rağmen, sülfid bileşiklerinin gıda endüstrisinde kullanımı devam etmektedir.

2.1.3. Sülfıt Metabolizması

Endojen olarak üretilen ya da ekzojen olarak dışarıdan alınan sülfıt, mitokondrinin membranlar arası boşluğunda lokalize olan sülfıt oksidaz (SOX) enzimi tarafından zararsız bir bileşik olan sülfata (SO_4^{2-}) dönüştürölür, böylece sülfıtın yaratacağı toksik etkiden hücreler korunur (Cohen ve ark., 1973). Bir molibdoprotein olan SOX enzimi hem grubu içeren N-terminali ve molibdenyum kofaktörü içeren C-terminali bulundurmaktadır (Morikawa ve ark., 1997). SOX sülfıtı sülfata dönüştürmek için molibdenyum merkezine bağlanan SO_3^{2-} 'e sudan bir oksijen atomunu aktarmakta ve sülfıt idrarla atılan SO_4^{2-} 'e okside olmaktadır (Bailey ve ark., 2009; Wyse ve ark., 2019) (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Sülfıtın metabolizması

SOX enzimindeki herhangi bir mutasyon hücrede sülfıt birikmesine yol açar ve biriken sülfıt plazma zarını geçerek dolaşım yoluyla vücuda yayılır. Sonuç olarak zar proteinlerinde disülfür bağlarını azaltabilir, böylece protein katlanmasını, stabilitesini ve aktivitesini etkileyebilir, reaktif oksijen türlerinde artışa, DNA ve hücre membranında hasara neden olabilir (Harraan, 1955). SOX enzimi eksikliği olan hastalarda S-sülfosistein miktarında artış saptanmıştır. S-sülfosistein yapısal olarak glutamata benzemektedir ve N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptörlerinin glutamat bölgesine bağlanarak reseptörü aktive edebilir (Schwarz, 2016). Dolayısıyla

NMDA'nın bu aktivasyonunun SOX mutasyonu olan hastalarda nöbetlerin ve ardından beyin hasarının nedeni olabileceği düşünülmektedir (Schwarz, 2016).

Hayvanlarda SOX aktivitesi 10-20 kat daha fazladır. Memeli dokularında SOX enzim aktiviteleri değerlendirildiğinde, karaciğer, böbrek ve kalpte yüksek aktivite, beyin, dalak, akciğerler ve testiste ise düşük aktivite görülürken, en yüksek enzim aktivitesinin karaciğerde olduğu tespit edilmiştir (Gunnison, 1981).

2.1.4. Sülfite Toksikitesi

Sülfite hem in vivo hem de in vitro ortamlarda toksisiteye yol açtığı ve birçok yan etkileri olduğu bilinmektedir (Öztürk ve ark., 2006; Kencebay ve ark., 2013; Basaranlar ve ark., 2019). Sülfite karşı alerji ilk defa 1976 yılında gözlenmiş ve sülfite duyarlılığı olarak tanımlanmıştır (Netherlands, 2005). Sülfite kalp (Zhang ve ark., 2015), karaciğer (Bai ve ark., 2013), böbrek (Xing ve ark., 2015), mide (Ercan ve ark., 2013) ve beyin (Zhang ve ark., 2004) gibi hayati organlar üzerindeki etkileri incelenmiş ve toksisiteye yol açtığı tespit edilmiştir. İnsanlarda 3.5 mg/kg gibi düşük sülfite dozlarında kusma refleksi ortaya çıktığı rapor edilmiştir (Lafontaine ve ark., 1955). Bunun yanı sıra, sülfite maruziyetinin bilinç kaybı ve ölümle sonuçlanan ciddi anafilaktik şoka neden olabileceği, bunun yanı sıra hızlı solunum, nefes darlığı, hırıltılı nefes alma, hipertansiyon, taşikardi, horlama, güçsüzlük, kurdeşen, ödem, kaşıntı, nezle, göz mukozası iltihabı, yutma güçlüğü, bulantı ve ishal gibi semptomlara yol açabileceği bildirilmiştir (Yang ve Purchase, 1985; S. L. Taylor ve ark., 1986b).

Sülfite toksisitesinin nöronları nasıl etkilediğine dair fikir birliği henüz sağlanamamış olsa da temel mekanizmada sülfür ve oksijen merkezli serbest radikallerin yer aldığı düşünülmektedir (Abedinzadeh, 2001; Wang ve ark., 2016). Öztürk ve ark., (Ozturk ve ark., 2011) erkek Wistar sıçanlarına 35 gün boyunca günde 10, 100 ve 260 mg/kg dozlarında gavaj yoluyla Na₂S₂O₅ uygulamış, plazma S-sülfonat seviyelerinde ve beyin ile retinada lipid peroksidasyon göstergesi olan tiyobarbitürik asit reaktif madde (TBARS) ve 4-hidroksinonenal (4-HNE) düzeylerinde doza bağlı önemli artış olduğunu, görsel uyarılmış potansiyellerinin latanslarında da uzama olduğunu bildirmişlerdir. Bu durumu sülfite alımına bağlı olarak oksidatif stresin görsel sisteme zarar verdiği şeklinde değerlendirmişlerdir.

Öztürk ve ark. (Öztürk ve ark., 2006) yapmış oldukları çalışmada SOX eksikliği oluşturdukları sıçanlara 6 hafta boyunca içme suyunda 25 mg/kg/gün dozunda sülfıt verdiklerinde hipokampusta glutamatın NMDA reseptörünün alt birimleri NR2A ve NR2B ekspresyonunda azalma tespit etmişlerdir. Kucukatay ve ark. (Küçükata ve ark., 2007), SOX yetmezliği olan sıçanlarda oral yolla alınan sülfitin hipokampusta süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz aktivitelerini önemli ölçüde arttırdığını rapor etmişlerdir. Yapılan başka bir çalışmada ise sülfitin hipokampus piramidal nöronlarında hasara neden olduğu saptanmıştır (Akdogan ve ark., 2011). Ekibimiz tarafından yapılan çalışmada, sıçanlara 100 mg/kg/gün ve 260 mg/kg/gün dozunda Na₂S₂O₅ uygulanmış ve radyal kollu labirent testinde referans ve çalışan hafıza hatalarının arttığı, hipokampal glutamat ve glutamin düzeylerinin azaldığı tespit edilmiştir. Bu sonuçlar sülfitin öğrenme ve hafıza üzerinde olumsuz etkileri olduğunu, bu etkilerin glutamat döngüsü ile ilişkili olabileceğini işaret etmektedir (Kencebay, 2017). Bizim çalışmalarımız ve literatürdeki bilgiler değerlendirildiğinde sülfıt ile öğrenme ve hafıza süreçleri arasında önemli bir ilişkinin olduğu açıkça görülmektedir.

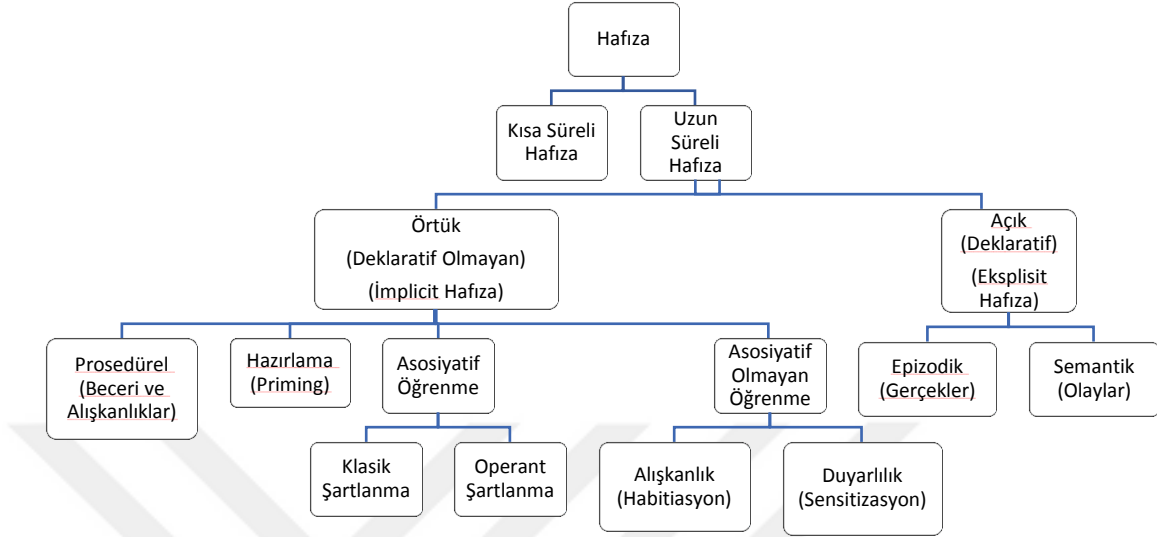
2.2. Öğrenme ve Hafıza

Öğrenme ve hafızanın nasıl oluştuğu, depolanma yeri, hafıza oluştuğunda sinir sisteminde ne tür değişikliklerin meydana geldiği en çok merak uyandıran sorulardan biri olmuştur. Öğrenme, deneyimler sonucu davranışta meydana gelen kalıcı değişiklik olarak tanımlanırken, hafıza ise bilgilerin kodlanması, depolanması ve istendiği zaman geri çağırılabilme kabiliyeti olup, öğrenmenin nöronal ağlarda kalan izidir (Kandel ve ark., 2013). Öğrenme ve hafıza bireylerin yaşamsal faaliyetlerini yerine getirebilmeleri için hayati önem taşımaktadır.

2.2.1. Hafızanın Sınıflandırılması

Hafıza günlük yaşamın önemli bir parçasıdır. Çevre ve diğer insanlarla etkileşime girmemizi sağlar, deneyimlerin korunmasına izin verir ve riskleri en aza indirir. Hafıza oluşumu dört ana süreci kapsar: İlki yeni bilgilerin alınması, işlenmesi ve birleştirilmesi süreci olan kodlamadır. İkincisi pekiştirme (konsolidasyon) süreci olup, kodlanan ve anlam yüklenen bilginin sağlamlaştırılması aşamasıdır. Üçüncü kısım depolama yani bilginin korunması kısmıdır ve kodlanan bilginin sürekli kaydının oluşturulması, hafızaya yerleştirilme sürecidir. Hafıza oluşumunun son

aşaması ise geri çağırma olarak tanımlanan ipucunun bilgiyi depodan geri çağırması veya hatırlatmasıdır (Takehara-Nishiuchi, 2014).



Şekil 2.4. Hafızanın sınıflandırılması

Hafıza genellikle zamana ve bilginin doğasına göre iki şekilde sınıflandırılır. Süresine bağlı olarak hafıza kısa süreli ve uzun süreli olarak ikiye ayrılmaktadır. Bilginin doğasına göre ise açık ve örtük olarak iki kısımda incelenmektedir. Şekil 2.4.'te hafızanın zamana ve doğasına göre sınıflandırılması gösterilmiştir.

Bilginin depolanma yeteneği, işletim belleği olarak adlandırılan kısa süreli hafızaya bağlıdır. İnsanlarda işletim belleği sözel (verbal) ve görsel-uzaysal olarak iki alt birimden oluşur ve üçüncü bir sistem olan idari kontrol süreçleri ile koordine edilir. İdari kontrol süreçleri kişinin dikkatini verdiği kaynakları sözel ve viziospasyal sistemlere paylaştırır. Sözel alt sistem fonolojik bazı bilgilerin hafızada tutulmasında kullanılır. Viziospasyal sistem, objenin niteliğine ilişkin bilgi ve uzaysal konum bilgisini içeren iki alt birimden oluşur (Kanıt L. 2020).

Eğer bilgiler yeterince önemli görülmezse silinir veya kısa süreli bellekte pekiştirilen bilgiler ileride çağrılmak üzere uzun süreli hafızaya aktarılır. Uzun süreli hafızada depolama süresi günler ile yıllar arasında değişir. Kısa süreli bellekte nöron grupları arasındaki uyarı kimyasal değişiklikleri kapsarken, uzun süreli bellekte bu değişikliklerin yanında protein sentezi gibi kalıcı, yapısal ve fonksiyonel

değişiklikler olur (Kandel ve ark., 2000). Uzun süreli hafızada sinapsların sinyal iletimindeki duyarlılıkları değişir, fiziksel olarak yeniden yapılanmaları sağlanır. Bu fiziksel yapılanma; nörotransmitter salınımını arttırmak için vezikül salınım bölgesinde artış, nörotransmitter salınan veziküllerin sayısında artış ya da dendrit dikenlerinde sinyal iletiminin güçlenmesini sağlayacak yapısal değişiklikler olup, bu süreçlerin bilginin uzun süre saklanmasıda rol oynadığı bilinmektedir (Bliss ve Cooke, 2011).

İlk olarak Henry Gustav Molaison adlı hastanın cerrahisi sonrasında kısa süreli ve uzun süreli hafızanın farklı şekillerde oluştuğu ve aralarında bir aktarım gerektiği kanıtlanmıştır. Hastanın geçirmiş olduğu epilepsi cerrahisinde bilateral temporal lobektomi uygulanmış ve iki yanlı olarak amigdala, hipokampusun büyük bölümü ve temporal korteksin asosiyasyon alanlarının bir kısmı çıkarılmıştır. Cerrahiden sonra sağlıklı bir biçimde uyuyan hastada yaşamsal işlevlerde bir bozulma gözlemlenmemiş ve Henry adlı hastanın algısı, zekâsı ve kişiliği değişmemiştir. Hastanın işletim belleği ve operasyon öncesine ait uzun süreli belleğinde önemli bir bozulma oluşmamış fakat kısa süreli hafızanın uzun süreli açık hafızaya aktarımının tamamen kaybolduğu görülmüştür. Birkaç dakika önce tanıdığı birini hatırlayamazken çocukluk anılarını detaylarıyla hatırlayabilmektedir. Ayrıca motor becerileri, basit refleksif öğrenme tipleri olan alışma, duyarlanma, klasik ve operant şartlanma öğrenimleri değişmemiştir (Kant L. 2020). Benzer hastalarda görülen farklılaşmanın, sağlıklı insanlarda da olduğu ve iki farklı hafıza tipinin varlığını göstermiştir. Buna göre ilk öğrenme tipi hafızanın bilinçsiz formu yani örtük bellek (nondeklaratif ya da prosedürel hafıza)'tır. Örtük bellek, tipik olarak kendiliğinden ortaya çıkmakta ve hazırlama, beceri öğrenmesi, alışkanlık belleği ve şartlanma gibi farklı formları bulunmaktadır. İkinci öğrenme tipi ise insanlar, yerler ve nesneler hakkında gerçek bilgilerin bilinçli hatırlanması şeklindedir ve önceki deneyimin düşünülmesi ya da bilinçli hatırlanmasını gerektirir. Bu tip hafıza açık bellek (deklaratif ya da eksplisit) olarak bilinmektedir (Squire ve ark., 1993) (Şekil 2.4).

Açık (Deklaratif ya da eksplisit) Hafıza

Deklaratif (eksplisit) hafıza gerçekler ve olaylar ile ilgilidir, bilgi bilinçli olarak kaydedilmektedir. Deklaratif hafızanın, gerçeklerin belleği (semantik) ve anısal bellek (epizodik, kişisel deneyimlerin belleği, otobiyografik bellek) olmak üzere iki

alt tipi bulunmaktadır. Semantik hafıza kişisel bağlantılardan uzak bir şekilde sadece gerçekleri içerir, örneğin Türkiye'nin başkenti Ankara'dır. Fakat epizodik bellekte zaman ve yer gibi değişkenlere bağlı bilgi vardır ve bu nedenle duygu ve görüşleri içeren bellek türüdür (Kandel ve ark., 2000).

Örtük (Deklaratif olmayan ya da implisit) Hafıza

Deklaratif olmayan (implisit) hafıza motor becerilerin ve alışkanlıkların kazanılmasını sağlayan hafıza türüdür. Daha önce edinilmiş bilgi ve beceriler bilinç gerektirmeden çağırılır, örneğin; bisiklete binmek, araba kullanmak. Pek çok bilişsel, algısal ve motor beceri başlangıçta açık bellekte saklanırken denemelerle örtük bellekte depolanmaya başlar. Hipokampus ve temporal korteks bölgeleri ciddi olarak etkilenen bir hastanın, insanlar ve olaylarla ilgili belleğinde önemli kayıplar olduğu, buna karşın müziği okuma, piyona çalma ve koro yönetme işlevlerini yapabildiği, diğer yandan ne yaptığını hatırlamadığı rapor edilmiştir (Kanıt L. 2021). Deklaratif olmayan hafıza; prosedürel hafıza, tetikleme, asosiyatif ve asosiyatif olmayan öğrenme olmak üzere dört alt gruba ayrılmaktadır (Kanıt L. 2021).

Tetikleme (priming); geçmişteki deneyimlere dayanılarak yeni karşılaşılan kelime ve cisim gibi uyarıların tanınmasının kolaylaşmasıdır. Bu şekilde sık kullanılan deneyimlerin oluşturduğu nöral yollar daha ön planda bulunmaktadır (Bartsch ve Butler, 2013). Tetikleme işleminin örtük bellek üzerindeki etkisi, bir kişiden eksik harfleri olan kelimeyi tamamlamasının istendiği kelime fragmanı testiyle değerlendirilmektedir.

Prosedürel hafıza; bilgi bilinçli olarak kaydedilmez, motor veya duyuusal yetenekleri veya “alışkanlıkları” ifade eder. Bisiklet sürmek, yüzmek, ayakkabı bağlamak veya bir kelimeyi heceleme gibi durumlarda işlevsel bellek kullanılır (Steckler ve ark., 1998). Yürüme ve konuşma yeteneği prosedürel ve yetişkinler olarak onları öğrendiğimize dair bilinçli bir belleğe sahip olmamamıza rağmen, çocukken bu beceriler kolay ve verimli bir şekilde geliştirilir (Steckler ve ark., 1998). Motor öğrenme, aslında davranışlar için hareket kalıplarının oluşturulması, sağlamlaştırılması ve birleştirilmesi ile gerçekleştirilir. Motor ve bilişsel yetenekler tekrarlarla öğrenilir.

Asosiyatif öğrenme; iki uyaran arasındaki ya da uyaran ve davranış arasındaki ilişkinin öğrenildiği hafıza türüdür. Asosiyatif öğrenme klasik şartlanma ve operant (edimsel) şartlanma olarak iki grupta incelenmektedir.

- Klasik şartlanma, ilk olarak Ivan Pavlov tarafından tanımlanmıştır (Pavlov 1902). Burada genellikle çaba veya farkındalık olmadan, normalde pek yanıt oluşturmeyen nötr uyaranları (ses veya ışık gibi), zevk ya da tükürük gibi doğal bir cevap oluşturan başka bir uyaranla (gıda gibi) ilişkilendirmeyi öğrendiğimiz bellek türüdür. Şartlı uyaran ardından şartsız uyaran birlikte verilirse bir süre sonra şartlı uyarana tek başına yanıt oluşturabilir. İlişkilendirme hafızası, şartlı uyaran (ses), öğrenmeden önce şartsız uyaranla (gıda) aynı yanıtı oluşturmaya başladığında gösterilir. Örneğin, herhangi bir uyarı oluşturmeyen zil sesi (koşullu uyaran) ile, köpekte salya salgılanmasına neden olan etin (koşulsuz uyaran) birlikte art arda verilmesi, köpeğin ete karşı göstermiş olduğu salya salgılanması tepkisini zil sesine vermesini sağlamaktadır.
- Operant şartlanmada ise, uyarı ve davranış arasındaki ilişki öğrenilmekte, ilişki davranışın sonunda ortaya çıkan sonuçlar tarafından kontrol edilmektedir. Eğer davranışın sonucu olumsuz ise davranış ortadan kalkar, olumlu ise davranış devam ettirilir. Sıçanın bulunduğu kafesteki pedala basmasıyla yem kapağının açılması, sonucu olumlu olan davranış olup, operant şartlanmaya iyi bir örnektir (Kandel ve ark., 2000).

Asosiyatif olmayan öğrenme; aynı uyarıya verilen tepkinin zamanla değişiminin öğrenildiği hafıza türüdür. Alışma (habitüasyon) ve duyarlanma (sensitizasyon) olarak ikiye ayrılmaktadır (Kandel ve ark., 2000).

- Alışma, zararsız bir uyarana verilen tepkinin, uyaranla tekrarlayan karşılaşmalarda azalması ve bir süre sonra tepkinin ortadan kalkması olarak tanımlanmaktadır. Kişiye zarar vermeyen ya da ödül duygusuna yol açmayan uyaranlar verilirse alışma yanıtı ortaya çıkar (Kandel ve ark., 2013).
- Duyarlanma, şiddetli ve zararlı bir uyaranla tekrarlayan karşılaşmalarda giderek daha duyarlı hale gelip, gösterilen tepkinin şiddetlenmesidir (Kandel ve ark., 2000). Sıçanın canını acıtacak bir uygulamadan sonra gelen hafif bir

dokunmanın aşırı tepkiye neden olması duyarlanmaya iyi bir örnektir (Kandel ve ark., 2000).

Uzaysal Hafıza

1970’li yıllarda deney hayvanları üzerinde yapılan çalışmalar, hipokampusta spasyal çevrenin bilişsel bir haritasının oluştuğunu göstermiştir. Uzaysal hafıza, bir kişinin farklı konumları ve nesneler arasındaki uzaysal ilişkileri hatırlamasını sağlayan bilişsel bir süreçtir (Johnson, 2010). Bir nesnenin başka bir nesneye göre nerede olduğunun hatırlamasını sağlar. Uzaysal anıların, bir kişinin kendisi veya çevresi hakkında duyuşsal bilgileri toplayıp işlemlerinden sonra oluştuğu söylenir (Johnson, 2010). Örneğin, bir labirentin sonunda yiyeceğin yerini öğrenmek için fare uzaysal hafızaya ihtiyaç duyar.

Uzaysal hafıza, kısa süreli hafıza ve uzun süreli hafıza özelliklerine sahiptir (Bannerman ve ark., 2014). Araştırmalar, beynin uzaysal hafıza ile ilişkili belirli alanları olduğunu gösteriyor. O’Keefe’nin (O’Keefe, 1976) bilişsel harita teorisine göre uzaysal hafızanın hipokampus ile ilişkili olduğu vurgulanmış olup, hipokampus çevrenin uzaysal haritasını sağladığı ileri sürülmüştür. Hipokampusun cornu ammonis (CA) 1 ve CA3 bölgelerinde yer hücresi olarak adlandırılan hücrelerin, tanıdık mekanlarda farklı bir ateşleme şablonu oluşturduğu kanıtlanmıştır (Moser ve ark., 2015). Hipokampusta plastisitenin engellenmesi, hedefe yönelik navigasyonda bozulmaya neden olur ve konumları hatırlama yeteneği bozulur (Hebert ve Dash, 2004) Hipokampusları çıkarılan hastaların uzaysal hafızalarının ciddi şekilde bozulduğu, hipokampus hasarı olan amnezik hastaların ise uzaysal yerleşimleri öğrenemedikleri veya hatırlayamadıkları görülmüştür (Squire ve ark., 1993).

2.2.2. Sinaptik Plastisite

Nöronlar arasındaki bağlantılar deneyime yanıt olarak değişir ve bu değişim kısa ve uzun süreli hafıza arasındaki farkları ortaya koyar (Bliss ve Cooke, 2011). Sinaptik değişikliklerin öğrenme ve hafızada önemli rol oynadığını gösteren pek çok çalışma mevcuttur (Messaoudi ve ark., 2007; Bliss ve Cooke, 2011). 1940’lı yıllarda Hebb (Hebb, 1949) belleğin öğrenme sırasında kurulan sinaptik bağlantı paternlerinde saklandığını öne sürmüş ve bu fikir, öğrenme sırasında eş zamanlı aktive edilen nöronların sinaptik bağlantıları güçlendirdiği şeklinde değerlendirilmiştir. Bu basit fikir, en etkili öğrenme ve hafıza teorisinin temeli olup, çok sayıda sistem ve

organizmada çok büyük moleküler, nörofizyolojik ve davranışsal veri paternini açıklamaktadır. Sinaptik plastisite, öğrenme ve hafızanın temelini oluşturan hücrel mekanizma olup, postsinaptik alanda meydana gelen yapısal ve biyokimyasal değişiklikleri kapsamaktadır (Matsuzaki ve ark., 2004). Sinaptik plastisite, iki nöronun birbirleriyle ne kadar etkili iletişim kurduğunu kontrol etmekte ve hem sinaps öncesi hem de sinaps sonrası mekanizmalar sinaptik plastisitenin ekspresyonuna katkıda bulunmaktadır (Bliss ve Lemo, 1973). Sinaptik plastisite kısa süreli ya da uzun süreli olabilir. Kısa süreli sinaptik plastisite, iki saniyeden daha az bir zaman diliminde meydana gelen sinaptik güçteki değişiklikleri ifade etmektedir. Uzun süreli sinaptik plastisite de ise sinaptik güçteki değişiklikler dakikalar, saatler, günler veya yıllar boyunca sürmektedir. Uzun süreli plastisite, beynin bilgiyi nasıl sakladığı, diğer bir deyişle yeni anıları nasıl yarattığımız ve hatırladığımız ile ilgili bir modeldir. Nöronların türüne, değişimin süresine ve ilgili beyin bölgesine bağlı olarak farklı tipte sinaptik plastisite tanımlanmaktadır. Elektrofizyolojik düzeyde, sinaptik plastisite LTP ve uzun süreli depresyon (Long Term Depression, LTD) olarak bilinen fenomenlere ayrılır (Timothy VP Bliss ve Cooke, 2011).

Uzun Süreli Güçlenme

Uzun süreli güçlenme, sinaptik iletimde kalıcı bir artışa neden olan, aktiviteye bağlı bir plastisite şekli olup, yüksek frekanslı uyarım ile üretilir (Malenka ve Nicoll, 1999). Hipokampusta kısa süreli yüksek frekanslı uyarılar uzun süreli güçlenmeye yol açar. Bir uyarının LTP oluşturmaları için iki önemli şartı yerine getirmeleri gerekmektedir; eksitator özellikte olması ve yüksek frekanslı olması. Uzun süreli sinaptik plastisite ilk olarak 1973'te tanımlanmıştır. Tavşan hipokampusunda çalışma yapan Bliss ve ark. (Bliss ve Lemo, 1973), sinapsların hızlı ve tekrar tekrar aktive edilmesinin onları daha güçlü hale getirdiğini keşfetmişler ve LTP olarak adlandırmışlardır. LTP'nin anıların oluşması ve depolanması ile ilgili hücrel ve moleküler mekanizmaları anlamak için önemli bir anahtar olduğu düşünülmektedir (Nguyen ve Kandel, 1996). LTP'nin farklı zamansal fazlarında farklı hücrel ve moleküler mekanizmalar etkindir. Erken faza kolaylaştırıcı veya protein sentezinden bağımsız faz da denir ve 30 dakikaya kadar sürer. Daha sonraki faza aynı zamanda kalıcı sinaptik plastisite veya uzun süreli bellek denir (Bliss ve Collingridge, 1993). Uzun süreli sinaptik plastisite, yeni protein sentezini gerektirir ve daha uzun (≥ 1 gün) sinaptik güçlenme ile karakterizedir (Bliss ve Collingridge, 1993). Gen

transkripsiyonu ve translasyonu, nöral hücreler arasında yeni sinaptik bağlantılara sebep olur (Bailey ve Chen, 1988). LTP'de tekrarlayan presinaptik stimülasyon veya senkronize girdi, hassasiyeti artırır ve postsinaptik cevabı güçlendirir (Bliss ve Lemo, 1973). Uzun süreli sinaptik değişiklikler sadece yüksek girdiye özgü değildir, aynı zamanda sinaps spesifiktir (Kandel ve ark., 2000). Hipokampustaki uyarıcı sinapsların tekrarlayan aktivasyonunun, saatler hatta günler boyunca devam eden, sinaptik güçte artışa yani LTP oluşumuna neden olduğu gösterilmiştir (Xiong ve ark., 2017)

Uzun Süreli Depresyon

Sinaptik etkinlikteki azalmalar LTD olarak adlandırılır ve düşük frekanslı stimülasyon ile üretilir (Bliss ve Cooke, 2011). Teorik çalışmalar, LTD' nin varlığını ön görür, çünkü LTP'yi dengelemek için bir mekanizma olmadan, nöronal devrelerdeki sinapslar giderek doymuş hale gelecek ve böylece yeni bilgi depolayamayacaktır. LTP'nin bir sonucu olarak, sinaptik bağlantı maksimum etkinlik seviyesine ulaştığında ve yeni bilgileri kodlamayı zorlaştırdığında, LTD sinaptik gücü korumak için bu tür sinaps kümelerini seçici olarak zayıflatmaktadır (Kandel ve ark., 2000).

Öğrenme ve Hafızanın Nörokimyasal Mekanizması

Presinaptik nörona aksiyon potansiyelinin ulaşmasıyla birlikte salınan glutamatin postsinaptik membranda bulunan α -amino-3-hidroksi-5-metil-isoksazol-4-propionik asit (AMPA) ve kainik asit reseptörlerine bağlanmasından sonra postsinaptik membranın Na^+ iyonlarına geçirgenliği artmaktadır. Bu güçlü depolarizasyon, NMDA reseptörünü (NMDAR) dinlenim potansiyelinde bloke eden magnezyum (Mg^{2+}) iyonlarının itilmesine ve blokajın kalkmasına sebep olur ve NMDA reseptörü (NMDAR) üzerinden hücre içine kalsiyum (Ca^{+2}) ve Na^+ iyon akışı gerçekleşmektedir (Nowak ve ark., 1984). Postsinaptik hücreye Ca^{+2} akışı kalsiyum/kalmodulin kinaz II (CaMKII), protein kinaz C (PKC) ve tirozin kinaz olmak üzere birkaç sinyal yolağını aktive etmektedir. Bu sinyal yolları hem postsinaptik hücrede yanıtı arttırmakta hem de presinaptik hücrelerden daha fazla glutamat serbestlenmesine yol açmaktadır. Ca^{+2} girişiyle aktive olan CaMKII enzimi AMPA reseptörlerinin geçirgenliğini arttırmaktadır (Kandel ve ark., 2000). Hücre içinde üzerinde AMPA reseptörlerinin bulunduğu veziküllerin PKC tarafından

fosforillenmesi ile AMPA reseptörlerinin plazma membranına füzyonu gerçekleşir. Hücre içi artan Ca^{+2} nitrik oksit sentaz enzimlerini de aktive ederek önemli bir retrograd haberci olan nitrik oksit sentezini indüklemektedir. Bu aşamaya kadar meydana gelen değişiklikler biyokimyasal değişiklikler olup LTP'nin erken fazını oluşturmaktadır (Nguyen ve Woo, 2003). Erken LTP bir ile üç saat arasında devam etmekte ve protein sentezini gerektirmemektedir.

LTP'nin geç fazında presinaptik alanda genişleme, postsinaptik alanda ise AMPA reseptörlerinde artış olduğu gösterilmiştir. Ayrıca yeni dendritik dikenler ve yeni eksitator sinaptik alanlar oluştuğu bildirilmiştir (Kandel ve ark., 2000).

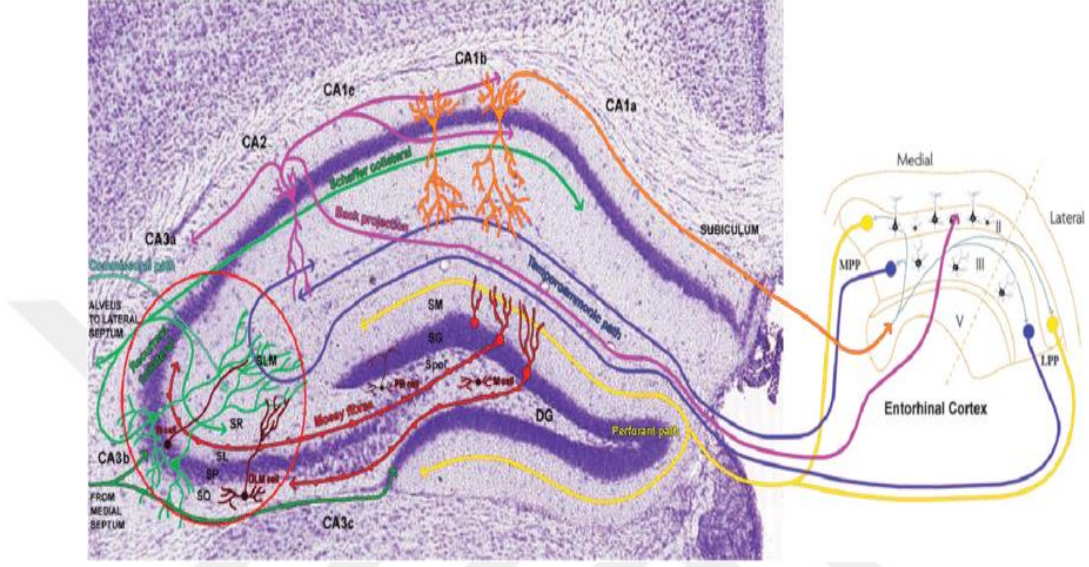
Postsinaptik nöronda artan Ca^{+2} konsantrasyonu aracılığıyla aktive olan adenilat siklaz (AC) enzimi hücre içi adenosin trifosfatı (ATP) siklik adenosin monofosfata (cAMP) dönüştürmektedir (Kandel ve ark., 2000). Artan hücre içi cAMP protein kinaz A (PKA)'yı aktive eder. Aktif PKA çekirdeğe translokale olan ve cAMP-duyarlı element bağlayıcı proteinini (CREB-1) fosforile eden mitogen aktive protein kinazın aktivasyonuna yol açar (Kandel ve ark., 2000). Güçlü bir transkripsiyonel koaktivatör olan CREB-1 hücre çekirdeğinde protein sentezini başlatmakta ve yeni sinaptik bağlantıların büyümesine yol açtığı düşünülen hedeflerin (CRE promotörünü içeren) transkripsiyonunu aktive etmektedir. Böylece yeni reseptörlerin ve sinapsların oluşmasına bağlı artan sinaptik güç, hatıraların uzun süreli hafızaya depolanmasına aracılık etmektedir (Eichenbaum, 2001). Tekrarlanan stimülasyon ayrıca, PKC'nin yapısal olarak aktif bir izoformu olan protein kinaz M-zeta (PKM- ζ)'yı kodlayan mRNA'nın dendritlere translasyonunu aktive eder ve bu durum postsinaptik membrandaki AMPA reseptörlerinin sayısında uzun süreli artışa yol açar (Kandel ve ark., 2013).

2.2.3. Hipokampus

Hipokampus, temporal lobun içinde bulunan limbik sistemin önemli bir parçası olup, epizodik anıların oluşumunda, konsolidasyonunda ve geri çağırılmasında rol oynar (Haam ve Yakel, 2017).

Denizatına benzeyen şekli nedeniyle Yunanca at anlamına gelen hippos ve deniz anlamına gelen kampos isminden üretilmiştir. Hipokampus sırasıyla dentat girus, CA3 ve CA1 kısımlarını içeren trisinaptik bir döngüden oluşur. Cajal. (Cajal, 1911), 1911 yılında hipokampal formasyondaki impuls trafiğinin ana hücrelerini,

bağlantılarını ve akışını gösteren ünlü çizimini yayınlamıştır. Trisinaptik döngüde 3 ana yolak vardır; hipokampal oluşuma girdi sağlayan entorhinal korteksten, dentat girusa uzanan perforant yolak, dentat girusun granüler hücre tabakasından CA3 primidal hücrelere projekte olan yosunsu lifler (mossy fiberleri) ve CA3 bölgesinden CA1 bölgesine uzanan Schaffer kollateralleri (Şekil 2.5) (Cajal, 1911).



Şekil 2.5. Hipokampusun ana hücreleri, impuls trafiği ve bağlantıları

Hipokampus, multimodal (birden çok duysal sisteme ait) duysal ve spasyal bilgileri yakınındaki entorhinal korteksten almaktadır. Kortikal afferentler, yani duysal bilgi, hipokampusa esas olarak entorhinal korteksin II ve III katmanlarındaki nöronların aksonlarından oluşan perforant yoldan girer. Perforant yol aksonları, dentat girus granüler hücrelerinin dendritleri üzerinde sonlanır (Andersen ve ark., 2006). Perforant yolak iki alt kısımdan oluşur, mediyal ve lateral perforant yolaklar. Her iki yolakta kortikal bilginin hipokampusa projeksiyonunu sağlar. Gelen sinyalleri trisinaptik devre aracılığıyla hipokampusun diğer bölgelerine göndermeden önce, dentat girus hücreleri bilginin işlenmesini sağlarlar (Andersen ve ark., 1969). Daha sonra bilgi, hipokampusa dentat girustan CA3, CA1 ve subikuluma akar ve hipokampal intrinsik tri-sinaptik devreyi oluşturur. Aynı zamanda entorhinal korteks II. tabakadan CA3'e ve III. tabakadan CA1 bölgesine (temporoammonik yolak) ve subikuluma projeksiyonlar vardır (Amaral ve Witter, 1989). Subikulum, entorhinal korteks ile hipokampus arasındaki geçiş bölgesidir. Hipokampal sistemden ana çıktı

kaynağı CA1'dir ve ana hedefi subikulumdur. Hipokampusun temel çıktıları CA1 bölgesindeki piramidal nöronlar yoluyla entorinal kortekse (geri döner), subikuluma ve diğer mediyal temporal lop yapılarına ulaşır. Çıktı entorhinal kortekse ulaşır ve döngü tamamlanmış olur (Cajal, 1911) .

Dentat girus, CA'nın kenarında, üzerinde kapak oluşturan keskin bir şekilde katlanmış üç katmanlı (moleküler katman, granül hücre katmanı ve dış girustan hilusa polimorfik katman) kortekstir ve görünüşü kemirgenlerde C veya V şeklindedir. Granül hücreleri, dentat girustaki küçük (yaklaşık 10 µm çapında) ve yoğun hücre tabakası içinde bulunan ana nöronlardır. Dendritleri, hücre tabakasına ve moleküler tabakaya dik olarak uzanır, burası esas olarak perforant afferentlerden sinaptik girdiler alırlar (Andersen ve ark., 1969).

2.2.4. Öğrenme ve Hafızada Hipokampusun Rolü

İnsanlarda yapılan nöropsikolojik çalışmalar, deneysel lezyon çalışmaları ve hayvanlardaki nöroanatomik çalışmalar gösteriyor ki hipokampus ile çevresindeki entorhinal, perirhinal ve parahipokampal korteksleri içeren temporal lob yapıları deklaratif/ilişkisel bellek için önemlidir (Xiong ve ark., 2017).

1976 yılında O'Keefe (O'Keefe, 1976) tarafından keşfedilen hipokampustaki konum (yer) hücreleri, çevrenin sinir sistemindeki temsilini oluşturan bilişsel bir harita oluşturduğu düşüncesini ortaya koymuştur. Konum hücreleri hipokampusta bulunan ve birey sadece tanıdık bir yerden geçerken aktive olan (aksiyon potansiyelleri oluşturan) sinir hücreleridir. Serbest dolaşan kemirgenlerin hipokampusunda nöronların fonksiyonel rolleri, mekansal aktivasyon (ateşleme) desenleri ile karakterize edilmiştir (O'Keefe, 1976). Kemirgen çevresini araştırırken, hipokampustaki nöronlar belirli konumlarda aktivasyon oranlarını artırır (O'Keefe, 1976). Hipokampusta çoklu yer hücrelerinin ateşlenmesi, tüm ortamı "haritalayabilir" ve hayvana mevcut konumunun bir temsilini sağlayabilir. Uzaysal hafıza genellikle hipokampusun CA3 ve CA1 bölgelerinde bulunmasına rağmen, piramidal sinirler haricinde dentat girusun granüllü hücrelerinde de bulunur (Moser ve ark., 2015).

1980'li yıllarda Dr. Richard Morris (Morris ve ark., 1982) hipokampuslarında lezyon oluşturulmuş kemirgenlerin hipokampal fonksiyonunu test etmek için, boyalı su

bulunan tank içerisine gizli platform yerleştirmiş ve uzaysal konuma göre platformu bulma sürelerini değerlendirmiş, hayvanların öğrenme performanslarının anlamlı olarak bozulduğunu göstermiştir. Sonuç olarak farklı hücrelerin uzaysal özellikleri, hayvanın bulunduğu yerin konumu ve oryantasyonu içindeki yönünü temsil edebilir.

Hipokampusun tüm nöron ve internöronları elektriksel aktiviteye sahiptirler (Albensi ve ark., 2007). Hipokampusun istenilen katmanına yerleştirilen kayıt elektrotundan kaydedilen aktivite, nöron topluluğunun ortak aktivitesinden doğan ekstrasellüler akımların oluşturduğu yerel alan potansiyeli değişimleridir. Normal kortikal kayıtlarda onlarca veya yüzlerce mikrovolt olan alan potansiyelleri hipokampusta milivolt cinsinden ölçülür (Law ve Leung, 2018). Bu tür potansiyeller, piramidal ve granül hücrelerinin soma ve dendritlerinin tek düze paralel hizalanmasından ve büyük bir hipokampal nöron popülasyonunun neredeyse aynı anda aktivasyonunu tetikleyen hipokampal afferentlerden kaynaklanmaktadır (Law ve Leung, 2018).

Hipokampusta, θ (5-10 Hz) ve γ (40-120 Hz) frekanslarında ritmik aktiviteler ve etkileşimler bilgi kodlamak ve saklamak için kritik öneme sahiptir (Lisman ve Jensen, 2013). θ dikkat sırasında artar ve hafıza oluşumu için gereklidir (Winson, 1978); hipokampal γ aktivitesi ise bellek kodlamasını kolaylaştırır (Colgin ve Moser, 2010). Bu iki tip salınım aktivitesi sıklıkla birlikte ve θ - γ çiftlemesi hafıza formasyonunun bir korelasyonu olarak görölmektedir (Tort ve ark., 2009). Bu nedenle, bu tür salınım faaliyetlerinin öğrenme ve hafızanın altında yatan uzun süreli sinaptik modifikasyonları tetiklemesi muhtemeldir. γ frekansında (100 Hz) kısa bir uyarım veya tekrarlanan yüksek frekanslı stimölasyon (HFS) LTP ile sonuçlanır (Bliss ve Collingridge, 1993) ve bu protokol çok sayıda nöronal ağda LTP'yi ortaya çıkarmak için yaygın olarak kullanılır.

Hipokampal LTP ile davranışsal olarak tanımlanmış hafıza arasındaki paralellikler incelenmiş ve her ikisinde de benzerlikler bulunmuştur (Albensi ve ark., 2007). Bunlar arasında hızlı indüksiyon, tekrarlama ile güçlenme, NMDA reseptör aktivasyonu (hepsinde olmamakla birlikte çoğunda) ve LTP azalmasının normal unutmayla ilişkili zaman süreci ile korelasyonları bulunmaktadır (Otto ve ark., 1991). Whitlock ve ark. (Whitlock ve ark., 2006), sıçanlarda tek uyarılı sakınma öğrenmesinin, HFS kaynaklı LTP ile aynı hipokampal glutamat reseptörlerinde aynı değişikliklere neden olduğunu göstermişlerdir. Pastalkova ve ark. (Pastalkova ve

ark., 2006) ise PKM- ζ inhibitörü tarafından LTP oluşumunun engellendiğini ve uzaysal hafızada kalıcı bir kayıp oluşturduğunu tespit etmişlerdir. Sonuç olarak, bu çalışmalarla hipokampal LTP'nin öğrenmeyle indüklendiği gösterilmiştir.

LTP tipik olarak 100 Hz'de yüksek frekanslı uyarım ile indüklenebilir (Bliss ve Collingridge, 1993). Frey ve ark. (Frey ve ark., 1993) 3 kez tekrarlanan 100 Hz'lik stimülasyonun 3 saat veya daha uzun süren ve protein sentezini içeren geç LTP ürettiğini göstermişlerdir. Vertes ise (Vertes, 2005) 100 Hz'lik tek bir uyarının zayıf stimülasyon olarak kabul edildiğini, erken LTP'ye (1-3 saat) yol açtığını ve protein sentezinin olmadığını rapor etmiştir.

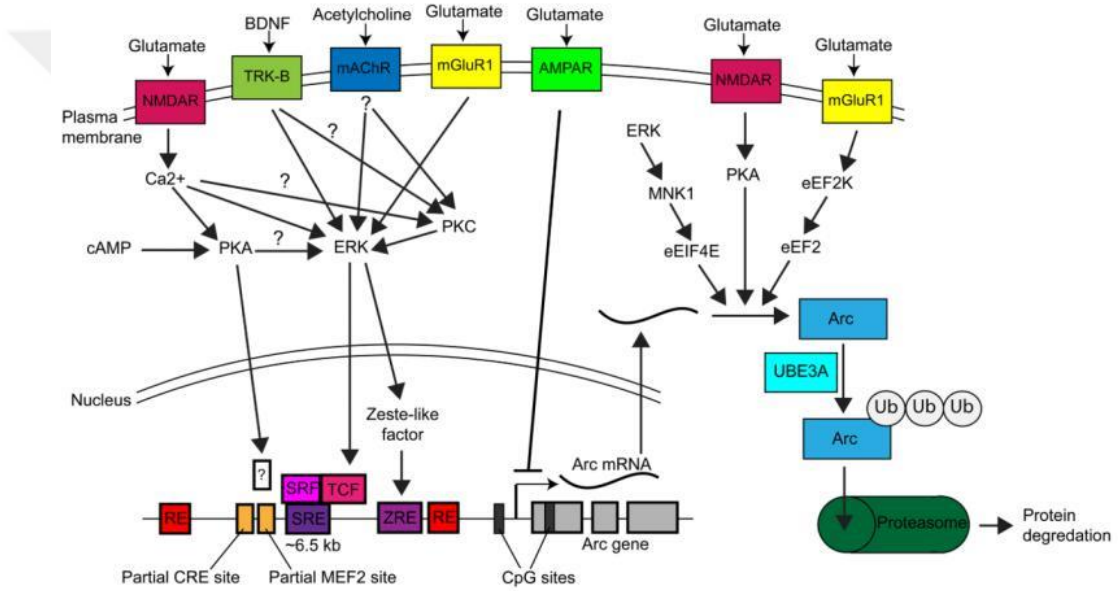
2.3. LTP'nin Biyobelirteçleri

2.3.1. Arc Proteini

Arc proteini (Activity-regulated cytoskeleton-associated protein) insanlarda Arc geni tarafından kodlanan plastisite proteinidir. Özellikle uzun süreli bellek oluşumu için gereklidir ve sinaptik plastisite formlarının tümünü etkiler, yalnızca omurgalılarda bulunur (Link ve ark., 1995; Lyford ve ark., 1995). Arc proteinin hem aktif hem de inaktif sinapslarda rol aldığı gösterilmiştir. Arc proteini, aktif sinapslarda aktin polimerizasyonuna yol açarak yapısal değişikliklerin sürdürülmesini sağlarken, inaktif sinapslarda ise AMPA reseptör sayısının azalmasını sağlayarak aktif ve inaktif sinapslardaki dengeyi sağlar. Bu etkisi ters sinaptik etiketleme ve yakalama hipotezi (inverse synaptic tagging and capture)'nin doğmasına yol açmıştır (Baltaci ve ark., 2019). Öğrenme sırasında beyindeki glutamaterjik nöronlarda sinaptik aktivite artışına bağlı olarak Arc proteininin eksprese edildiği çalışmalarda gösterilmiştir. (Daberkow ve ark., 2007). Arc proteininin, AMPA glutamat reseptörlerinin (AMPA) endositozunu (Chowdhury ve ark., 2006), Notch sinyalini (Alberi ve ark., 2011), spin boyutu ve tipini (Peebles ve ark., 2010) düzenlediği, dolayısıyla sinaptik gücü değiştirdiği bilinmektedir. Arc geni susturulmuş hayvanlarda kısa süreli hafızanın etkilenmediği, ancak kalıcı bellek oluşumunun engellendiği tespit edilmiştir (Plath ve ark., 2006). Sonuç olarak Arc, bellek konsolidasyonunun hücresel süreçlerini anlamak için bir yol sağlamaktadır.

Arc transkriptleri stimülasyondan 5 dakika sonra ortaya çıkar, bu da Arc'ı uyarana ilk yanıt veren genlerden (immediate early gene) biri haline getirir (Ramírez-Amaya ve

ark., 2005). Bu tür genler, nöronal aktiviteye yanıt olarak mümkün olan en hızlı transkripsiyonel cevaba sebep olur (Saha ve ark., 2011). Arc proteini mRNA'sı, LTP indüksiyonunu takiben sinapslara taşınarak lokal olarak translasyona uğrar. Arc, bazal koşullar altında düşük seviyede kopyalanır (Rao ve ark., 2006). Arc transkripsiyonu, TrkB reseptörünün (Ying ve ark., 2002; Pintchovski ve ark., 2009), Grup 1 metabotropik glutamat reseptörlerinin (mGluR1'ler) (Waung ve ark., 2008), muskarinik asetilkolin reseptörlerinin (Teber ve ark., 2004) ve NMDAR'lerinin (Steward ve Worley, 2001b) aktivasyonu ile önemli ölçüde düzenlenir (Korb ve Finkbeiner, 2011) (Şekil 2.6).

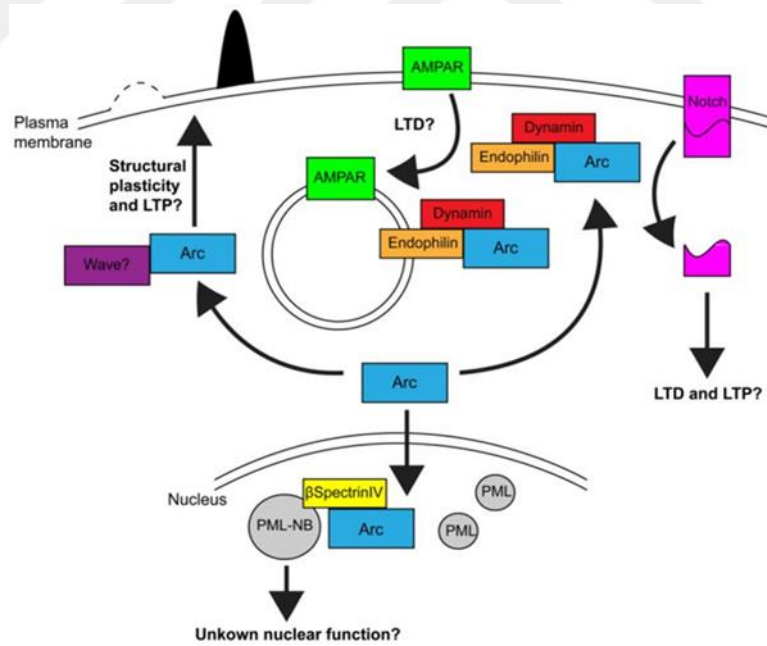


Şekil 2.6. Arc ekspresyonunun düzenlenmesi

Sinaptik aktivite ve Arc transkripsiyonu arasındaki güçlü bağlantı, çeşitli öğrenme paradigmlarına yanıt olarak nöronların aktifleştğini belirlemek için yaygın olarak kullanılmaktadır (Ramírez-Amaya ve ark., 2005). Arc indüksiyonunun seviyeleri ve kalıcılığı, beyin bölgesine ve hücre tipine bağlı olarak farklılık gösterir. Örneğin, hipokampusun farklı bölgelerinde (örn., CA3 ve CA1 (Guzowski ve ark., 1999)) farklı Arc indüksiyonu bulunmaktadır ve bu farklılıklar, hücrelerdeki/bölgelerdeki aktivite seviyeleri ile öğrenme ve hafızada nasıl ve ne zaman işlev gördükleri hakkında bilgi sağlayabilir (Korb ve Finkbeiner, 2011).

Hipokampal nöronlarda Arc'ın aşırı ekspresyonu spin yoğunluğunu arttırırken Arc'ın bozulması spin yoğunluğunu azaltır (Peebles ve ark., 2010). Bu değişim, stimulusa bağlı hücresel cevabı değiştirmek için Arc'ın gerekli olduğunu ve bu nedenle Arc proteininin yeni anılar oluşturmak veya eskilerini unutmak için önemli olduğunu göstermektedir (Peebles ve ark., 2010). Dentat girustaki in vivo çalışmalar, Arc'ın inhibisyonunun LTP'nin indüksiyonunu bozduğunu göstermiştir (Guzowski ve ark., 2000; Messaoudi ve ark., 2007).

Arc, LTP'deki önemli işlevine ek olarak LTD için de gereklidir (Plath ve ark., 2006). Arc geni baskılanmış farelerin hipokampal kesitlerinde CA1 piramidal nöronların düşük frekanslı uyarılması kontrol gruplarında LTD'yi indüklemiştir (Plath ve ark., 2006). CA1 nöronlarında Arc, mGluR1'lerin aracılık ettiği LTD için gereklidir ve Arc, AMPAR endositozunu düzenleyerek LTD'ye aracılık etmektedir (Waung ve ark., 2008). Arc ekspresyonu, AMPAR endositozunu gerçekleştirmek için endofilin 1 ve dinamin 2 üzerinden etki ederek AMPAR aracılı sinaptik akımların genliğini azaltır (Chowdhury ve ark., 2006; Verde ve ark., 2006) (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. Arc'ın hücresel işlevleri

Arc Fonksiyonunun Davranıştaki Rolü

Arc'ın LTP ve LTD'nin geç evrelerindeki önemi nedeniyle, öğrenme ve hafızanın geç evrelerinde de fonksiyonel rolünün olabileceğini göstermektedir (Korb ve

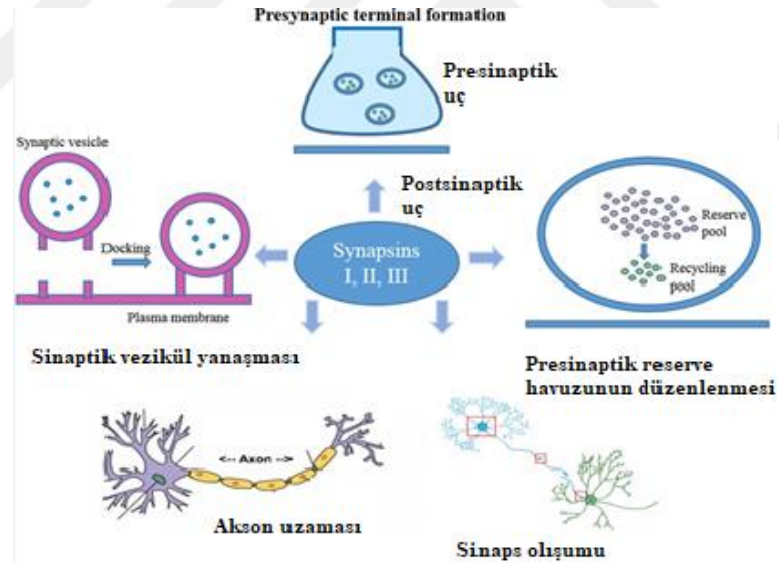
Finkbeiner, 2011). Arc geni baskılanmış fareler yeni davranışsal görevleri kontrol grubuna benzer şekilde öğrenir, ancak yeni anıları pekiştiremezler (Plath ve ark., 2006). Plath ve ark. (Plath ve ark., 2006) yaptıkları yeni obje tanıma testinde, Arc geni baskılanmış farelerin bir nesneye maruz kaldıktan 10 dakika sonra, yeni nesnede geçirdikleri sürenin kontrol grubunda ki fareler ile aynı olduğunu ancak 24 saat sonra kontrol fareleri hala yeni nesneyi tercih ederken, Arc geni baskılanmış farelerin yeni nesneyi tercih etmediğini tespit etmişler ve bu durumu Arc geni baskılanmış farelerin kısa zaman dilimi içinde öğrenip hatırlayabildiği, fakat anıları pekiştiremeyeceği şeklinde değerlendirmişlerdir. Bunun yanı sıra striatum veya hipokampusta yüksek seviyelerde Arc proteini bulunan hayvanlarda uzaysal öğrenmenin daha hızlı olduğu saptanmıştır (Guzowski ve ark., 2001).

2.3.2. Sinapsin Proteinleri ve Alt Tipleri

Beyinde yapılan *in vivo* çalışmalarda ve doku kültürü deneylerinde sinapsin proteinlerinin ekspresyonunun, sinaptogenezin gelişimi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Lohmann ve ark., 1978; Adriana Ferreira ve ark., 2000). Beyindeki nörotransmisyonun %90'ından fazlası, küçük sinaptik veziküllerin Ca^{+2} aracılığıyla düzenlenen ekzositozu yoluyla sinapslarda ortaya çıkmaktadır (Deák ve ark., 2009). Sinaptik veziküller göreceli olarak stabildir, bu veziküller plazma membranı, diğer organeller veya birbirleriyle rastgele kaynaşmazlar, bunun yerine, plazma membranında bulunan aktif bölge ile kaynaşırlar ve bu süreç sıkı bir şekilde kontrol edilir (Deák ve ark., 2009). Ekzositozisten sonra membran yapısının yeniden kullanılabilmesi için endositik mekanizmalar ile geri alınır. Endositozla hücre içerisine alınan plazma membranı ve diğer proteinler yeniden sinaptik vezikül oluşturulmasında kaynak oluşturur. Boyut ve şekil bakımından homojen olmasına rağmen, sinaptik veziküller işlevsel olarak benzer değildir (Cesca ve ark., 2010). Birçok sinapsta, çok farklı nörotransmitterleri serbest bırakan veziküllerin hızlı bir şekilde alınması sinapsların çeşitli aktivitelere uyum sağlamasına olanak tanır (Cesca ve ark., 2010). Çalışmalar, sinapsinler adı verilen bol miktarda sinaptik fosfoprotein ailesinin, sinaptik veziküllerin stabilitesinin ve organizasyonunun sürdürülmesine katıldığını göstermektedir (Deák ve ark., 2009; Cesca ve ark., 2010).

Sinapsinler, nörona özgü fosfoproteinler sınıfına aittir ve toplam beyin proteinlerinin % 1'ini içerir, bu da onları en çok bulunan sinaptik protein ailesinden biri yapar

(Goelz ve ark., 1981). Sinaps gelişiminin düzenlenmesi, nörotransmitter salınımının modülasyonu ve sinir terminallerinin oluşumu da dahil olmak üzere sinaptogenez ve nöronal plastisitede önemli rol oynadıkları bilinmektedir (Liu ve ark., 2019) (Şekil 2.8.). Esas olarak sitoplazmik yüzeydeki sinaptik vezikül membranı ile birleşerek etki gösterirler (Huttner ve ark., 1983). Sinapsin vezikül membranı birleşmesi birkaç protein kinaz ve fosfataz tarafından sıkı bir şekilde düzenlenmekte, sinapsinler defosforile olduklarında sinaptik vezikülleri bağlarken, fosforile edildiklerinde veziküllerden ayrılarak ekzositoza neden olmaktadır (Hosaka ve ark., 1999). Sinapsinler, nörotransmitter salınımını CaMKII fosforilasyonu ile düzenler, inaktif hallerinde veziküllerin sitoskelet bileşenlerine bağlanarak stabilizasyonunu sağlarlar. Presinaptik membrana aksiyon potansiyelinin ulaşmasının ardından, sinaptik veziküllerin serbest kalmasını ve membrana hareket edip nörotransmitterlerin salınımına aracılık ederler. Omurgalılarda, Sinapsinlerin I, II ve III olarak isimlendirilen üç ayrı tipi belirlenmiştir (Kao ve ark., 2008).



Şekil 2.8. Sinapsinlerin temel fonksiyonları

Sinapsin I, II, III

Sinapsinler çoğu sinir hücresinde bol miktarda bulunur; farklı nöron tiplerinde, farklı izoformları bulunmaktadır (Sudhof ve ark., 1989), sinapsin I ve II, nöronlardaki ana izoformlardır (A Ferreira ve Rapoport, 2002). Sinapsin I, aksonun uzaması ve sinaptik vezikül füzyonunun kinetiğinin düzenlenmesi ile ilişkilidir (Coleman ve Bykhovskaia, 2009) (Şekil 2.8). Sinapsin I'in (Ia ve Ib) her iki izoformu da sinaps oluşumunda önemli rol oynar (Adriana Ferreira ve ark., 1998) ve sinaptogenezi düzenleyerek nörotransmitter salınımını modüle eder (Li ve ark., 1995). Sinir terminallerinde yedek (rezerv) havuz ve salınım-hazır havuz olarak farklı 2 vezikül havuzu bulunmaktadır. Yedek havuz nörotransmitter salınımına hazır olmayan kısmı temsil ederken, salınım-hazır havuz presinaptik terminalden sinaptik aralığa salınacak nörotransmitterlerin bulunduğu alandır. Sinapsin I'in, sinaptik veziküllerin yedek havuzdan uzaklaştırarak salınımına hazır olan alana geçişini regüle ettiği düşünülmektedir. Fosforillenmemiş sinapsin I vezikülleri yedek havuzda sabitleyerek nörotransmisyonu engeller ve düzenleyici rol oynar (Schoch ve ark., 1996).

Sinapsin II, vezikül kenetlenmesine katılması yoluyla sinaptik vezikül döngüsünün önemli bir bileşeni olarak kabul edilmektedir (Coleman ve Bykhovskaia, 2009). Sinapsin IIa izoformu glutamaterjik sinapslarda veziküler rezerv havuzunu düzenlerken, sinapsin IIb presinaptik terminallerin oluşumunda rol oynar (Han ve ark., 1991; Gitler ve ark., 2008).

Sinapsin III, nöronal gelişimin erken evresinde baskın olarak eksprese edilir; bununla birlikte sinaptogenez, nörogenez ve nöronal plastisitenin düzenlenmesindeki rolü aksonal farklılaşmadaki değişikliklere bağlanabilir (Ferreira ve ark., 2000; Kao ve ark., 2008). Sinapsin III ile nörotransmitter salınımının düzenlenmesi, diğer izoformlardan tamamen farklı bir şekilde ilerler çünkü hayvanlarda sinapsin III'ün baskılanması, sinaptik I ve II baskılanmasına zıt olarak sinaptik vezikül havuzunun boyutunda artışa neden olur (Adriana Ferreira ve ark., 2000). Sinapsin I ve II özellikle sinaptik bölgelerde yoğunluk gösterirken, sinapsin III'ün ekstrasinaptik bölgelerde artığı gözlenmiştir (Adriana Ferreira ve ark., 2000).

Sinapsin ile LTP İlişkisi

LTP'nin oluşmasına, sinaptotagmin, sinaptofizin ve sinapsinler gibi çeşitli sinaptik proteinlerin ekspresyonlarındaki artış eşlik eder (Lynch ve ark., 1994; Sato ve ark., 2000). Sinapsin seviyelerinin, çeşitli koşullar altında hem nörotrofik hem de patolojik uyarılara yanıt olarak arttığı gösterilmiştir (Martí ve ark., 1999). Sato ve ark. (Sato ve ark., 2000) sıçan hipokampusunda LTP oluşumu sırasında artan sinapsin 1 seviyesindeki artışın, sinaptik bağlantı sayısındaki artışı yansıttığını rapor etmişlerdir. Nöbetler (Suemaru ve ark., 2000) veya ön beyin iskemisi (Martí ve ark., 1999) gibi bazı patolojik durumların başlangıcında da sinapsin I ekspresyonunda artış görülmüştür.

LTP sırasında hücre içerisinde artan Ca^{+2} miktarı ile aktive olan CaMKII sinapsin I fosforilasyonunu sağlar ve bu fosforilasyon vezikülün plazma zarına bağlanması için serbestlenmesine sebep olur. Bu süreç NMDA reseptörlerinin inhibisyonu ile bloke edilir. Ayrıca, PKC aktivatörleri ile indüklenen LTP artışı sırasında sinapsin I'in CaMKII tarafından fosforilasyonunda doza bağlı artış gözlemlenmiştir (Malenka ve ark., 1986; Stanton ve Sarvey, 1987).

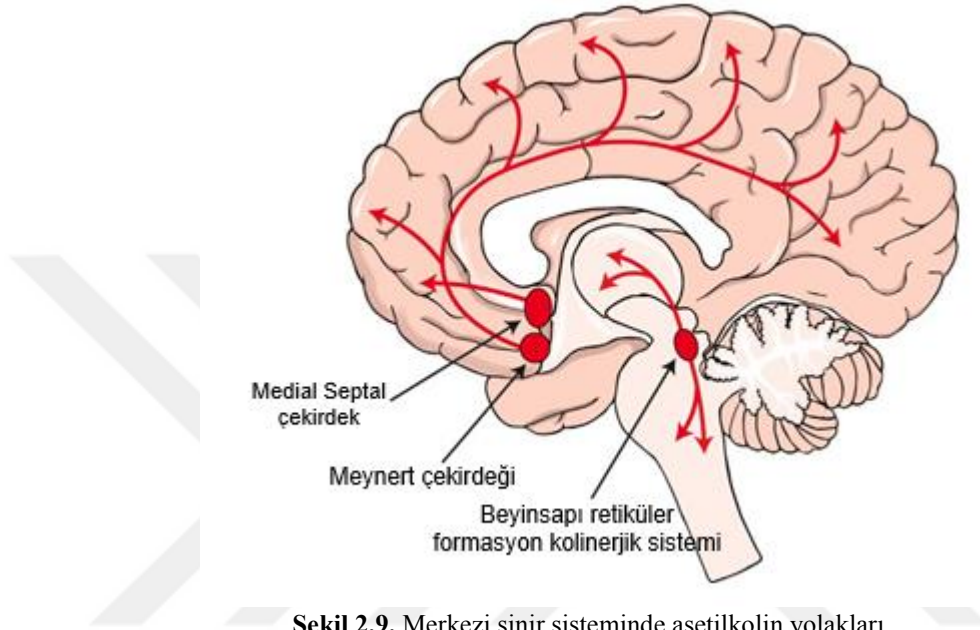
Başka bir çalışmada, beyin türevli nörotrofik faktör 2 (BDNF2)'nin, sinapsin I fosforilasyonu yoluyla sinaptozomlardan glutamat salınımını arttırdığı gösterilmiştir (Jovanovic ve ark., 2000). Bu sonuçlar, sinapsin I'in, mekansal öğrenme ve korku koşullandırma gibi karmaşık davranışların altında yatan sinaptik değişikliklerin modülasyonunda yer alan LTP formları için ana presinaptik efektör olabileceğini düşündürmektedir.

2.4. Asetilkolin

Asetilkolin, tanımlanan ilk nörotransmitterdir ve yıllarca süren araştırmalar ACh'nin hem merkezi sinir sistemi hem de periferik sinir sistemlerinde hayati rolleri olduğunu göstermiştir (Meriney ve Fanselow, 2019).

ACh, reseptör tipine (iyonotropik veya metabotropik) ve bu reseptörün bulunduğu yere bağlı olarak nörotransmitter veya nöromodülatör olarak fonksiyon görür. Sinir hücreleri tarafından nöronlar, kas hücreleri ve salgı bezleri gibi diğer hücrelere sinyal göndermek için salınır (Tiwari ve ark., 2013). Nörotransmitter olarak ACh sentezleyen sinir hücreleri kolinerjik nöron olarak adlandırılır. ACh'nin bilişsel işlevlerde, özellikle de hafıza oluşum mekanizmalarında önemli rolü vardır. Beyinde

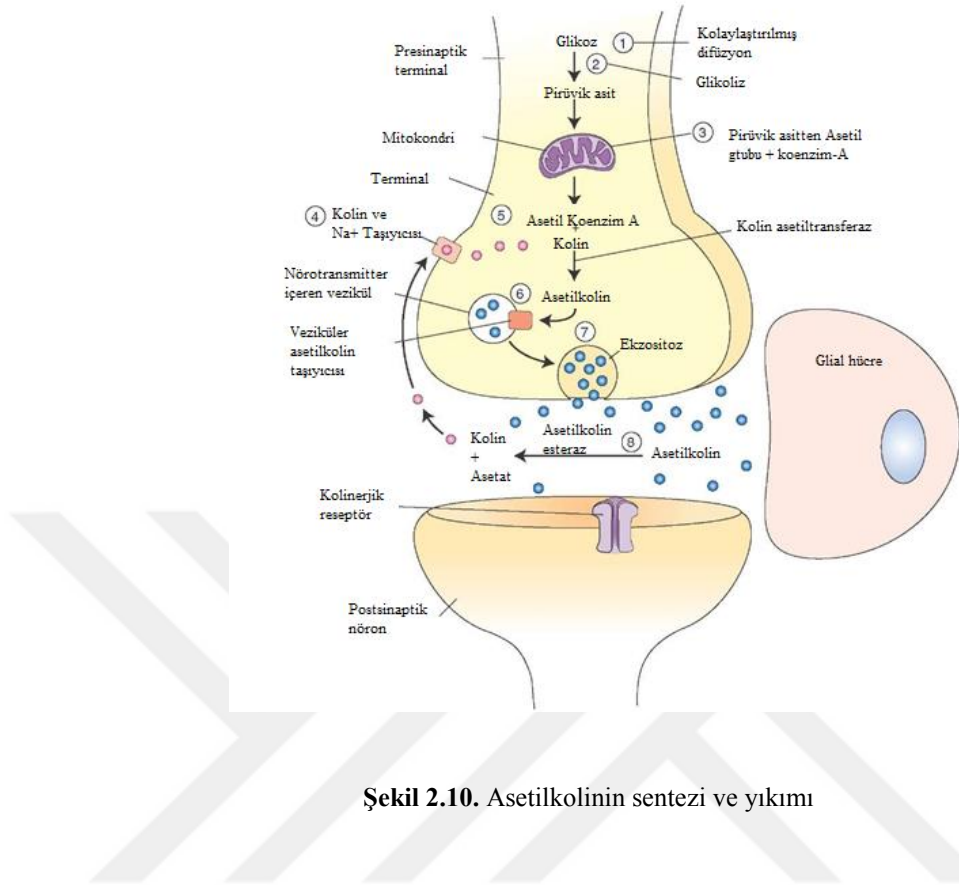
uyku, uyarılma, dikkat, hafıza ve motivasyon gibi her biri farklı işlevlere sahip bir dizi kolinerjik yollar ve alanlar mevcuttur (Hasselmo, 2006). Nörodejeneratif hastalıklarda görülen bazı bilişsel ve davranışsal bozuklukların altında kolinerjik sistem dejenerasyonunun yattığı düşünülmektedir (Lehéricy ve ark., 1993).



Şekil 2.9. Merkezi sinir sisteminde asetilkolin yolları

Merkezi sinir sistemi nöronlarının yaklaşık % 1'i kolinerjik olmasına rağmen büyük bir etkiye sahiptirler, birçok kolinerjik nöronun aksonları ön beyin boyunca geniş bir alana yayılır (Şekil.2.9) (Woolf, 1991). Kolinerjik nöronların hücre gövdeleri, beyin sapı ve bazal ön beyin içindeki çeşitli bölgelerde bulunur. Beyin sapında ACh, pedunculopontine çekirdeğinden ve mezopontin tegmentum alanı ya da pontomesencefalotegmental kompleks olarak bilinen laterodorsal tegmental çekirdekten kaynaklanır. Bazal ön beyinde ise Meynert'in bazal çekirdeğinden ve medial septal çekirdekten kaynaklıdır. Hipokampus kolinerjik nörotransmisyonun ana kaynağı, septohipokampal yol olarak da anılan medial septumdur (Shute ve Lewis, 1967). Hipokampus, kolinerjik sinyallerin yaklaşık % 90'ını medial septumdan fimbria-forniks lifleri yoluyla alır (Dutar ve ark., 1995).

2.4.1. Asetilkolin Metabolizması



Asetilkolin'in Sentezi

Asetilkolin mitokondriden gelen asetil-koenzim A'nın asetil grubu ile presinaptik terminale sinaptik aralıktan Na^+ -kolin transportu ile geri alınan kolinden, akson terminalinin sitoplazmasında ChAT enzimi aracılığıyla sentezlenir (Şekil 2.10). Akson terminalinin sitoplazmasında sentezlenen ACh daha sonra aktif olarak veziküller içine alınır (Ilcol ve ark., 2002).. Bu taşınmada görev alan ACh-H^+ antiportu vezikül içindeki hidrojen (H^+) iyonunu vezikül dışına atarken, vezikül dışındaki ACh'yi vezikül içine alır. Vezikül içindeki H^+ iyonu gradiyenti bir proton pompası aracılığıyla sağlanmaktadır. Donör görevi gören asetil-CoA, glikoz metabolizması sırasında üretilen piruvatın oksidatif dekarboksilasyonu veya bazı amino asitlerin oksidatif bozunması ile meydana gelmektedir (Wu ve Hersh, 1994). Asetil-CoA mitokondrilerde lokalizeyken, ChAT enzimi sitoplazmada olduğundan, asetil-CoA mitokondri zarını geçerek sitozole çıkmalıdır. Fakat mitokondri zarı asetil-CoA için geçirgen değildir (Wu ve Hersh, 1994). Bu durumun aşılması için asetil CoA, trikarboksilat taşıma sistemi aracılığıyla sitrat formunda sitoplazmaya

girer. Mitokondride asetil CoA sitrat sentaz enzimi ile oluşan sitrat, sitrat trikarboksilat transport sistemi aracılığıyla sitoplazmaya transfer edilmektedir (Wu ve Hersh, 1994). Sitoplazmaya transfer edilen sitrat, ATP bağımlı sitrat liyaz enzimi ile okzalasetat ve Asetil CoA'ya ayrılmaktadır (Wu ve Hersh, 1994). ChAT kolinerjik hücre gövdesinde üretilir ve aksondan sinir uçlarına taşınır. Hem ChAT hem de ACh nöron boyunca bulunabilir, ancak en yüksek konsantrasyonları akson terminallerindedir. ChAT'ın varlığı bir nöronun kolinerjik olduğu gösterir çünkü sadece kolinerjik nöronlar ChAT içerir (Meriney ve Fanselow, 2019).

Kolin temel bir besindir ve çoğu diyetten gelir. Kanda serbest olarak bulunabilir veya vücutta lipide bağlı formda, fosfotidilkolin olarak depolanabilir (Pardridge, 1981). Dolaşımdaki kolin iki farklı yol ile beyne geçebilir (Pardridge, 1981). İlk olarak kan beyin bariyerinden iki yönlü olarak kolaylaştırılmış difüzyon ile geçmekte, bu taşınım enerji gerektirmez ve beyin kapillerinin endotellerinde bulunan proteinler aracılığıyla gerçekleştirilir (Pardridge, 1995). İkinci yol ise kan beyin bariyeri taşınmasına göre çok daha az miktardaki kolinin, kandan beyin omurilik sıvısına, daha sonra oradan koroid pleksus hücrelerindeki “organik katyon taşıyıcıları 2” aracılığıyla beyne yine kolaylaştırılmış diffüzyonla taşınmasıdır (Ilcol ve ark., 2002). Kolinerjik nöronlara kolin başlıca iki farklı kolin taşıyıcısı ile alınmaktadır. Birinci taşınma, plazma zarındaki yüksek afiniteli kolin taşıyıcılarıdır ve Na^+ bağımlı olan bu taşıyıcılar aracılığıyla sinaptik aralıkta oluşan serbest kolin hızlı bir şekilde nörona alınıp ACh sentezine katılır. ACh salgılayan nöronlar yüksek afiniteli kolin taşıyıcılarına sahip olduklarından düşük konsantrasyonlarda dahi kolin taşınmasına izin verir (Haga ve Noda, 1973). İkinci taşınma sistemi Na^+ bağımsız, enerji gerektirmeyen, yüksek kapasiteli ve düşük afinitelidir (Haga, 1973). ChAT'nin kolinerjik nöronlarda sinir terminali boyunca eşit olarak dağılmadığı, kolin taşıyıcılarına yakın olduğu düşünülmektedir. Bu yakınlık, taşıyıcı tarafından sinaptik terminale getirilen kolin moleküllerinin, asetilkolini sentezlemek için ChAT tarafından hızla kullanılabileceği anlamına gelir. Taşıyıcılar tarafından presinaptik terminale taşınan kolinin %50-%85'i ACh'ye dönüştürülmektedir (Ilcol ve ark., 2002).

ChAT, ACh sentezinde tek enzim olsa da hız sınırlayıcı adım değildir. Asetil-CoA'nın mitokondriden sitoplazmaya taşınması gerektiğinden, bu taşınmanın ACh

sentezinde hız sınırlayıcı olabileceği ileri sürülmüştür (Fernandez ve diğerleri, 1996). Diğer taraftan, hücre içi kolin konsantrasyonları da ACh sentezinin hızını belirleyebilir (Fernandez ve diğerleri, 1996).

Asetilkolin'in Depolanması

Asetilkolin presinaptik terminalin sitoplazmasında sentezlendikten sonra, veziküllerin içerisine alınır. ACh veziküler membranı da dahil olmak üzere lipid membranları kendi başına geçemez. Bu nedenle, ACh'nin vezikül içerisine taşınması veziküler asetilkolin taşıyıcısı aracılığıyla, proton pompası olarak bilinen H^+ -ATPaz'ın da dahil olduğu aktif bir süreçle gerçekleştirilir. Proton pompası, protonları ATP'ye bağımlı bir şekilde vezikül içine alırken proton gradiyenti oluşturur ve vezikül içi pH'nın yaklaşık 5.5'e düşmesine neden olur. Veziküler asetilkolin taşıyıcısının aracılık ettiği ACh- H^+ antiportu vezikül içindeki H^+ iyonunu vezikül dışına atarken, ACh'yi vezikül içerisine alır (Amenta ve Tayebati, 2008).

Asetilkolin'in Sinaptik Aralığa Ekzozitozu

Nöronun uyarılmasıyla oluşan aksiyon potansiyeli akson boyunca yayılır ve akson terminaline ulaşarak depolarizasyona neden olur. Depolarizasyon membrandaki voltaj kapılı Ca^{+2} kanallarının açılmasını ve Ca^{+2} 'nin presinaptik aralıktan presinaptik uca girmesini sağlar. Ca^{+2} iyonları presinaptik uca girince CaMK ve cAMP-bağımlı protein kinaz enzimlerini aktive eder, bu aktivasyon vezikülleri hücre iskeletine bağlayan sinapsin proteinlerinin fosforilasyonunu sağlar (Demiralp T.,2021). Vezikül membranındaki sinaptotagmin proteini, hücre içine Ca^{+2} girişini algılayan ve Ca^{+2} bağlayan bir Ca^{+2} sensörü olarak davranır. Böylece veziküller hücre iskeletinden ayrılır, presinaptik membranın aktif zonlarına doğru yaklaşır, vezikül membranı ile presinaptik membran füzyona uğrar ve sonunda açılan bir por aracılığı ile ACh molekülleri sinaptik yarığa boşalır. ACh vezikülleri presinaptik membranla füzyona uğrayıp içeriklerini sinaptik aralığa boşalttıktan sonra tekrar klatrin aracılı endositozla presinaptik uca geri alınırlar (Demiralp T.,2021).

Asetilkolin'in Yıkımı

Asetilkolin molekülleri sinaptik yarığa salındıktan sonra vücuttaki en hızlı ve en etkili enzimlerden biri olan AChE enzimi tarafından parçalanır. AChE, postsinaptik membranın sinaptik aralığa bakan yüzünde bazal laminaya kollajen fibrillerle hidrofilik olarak bağlanmış durumdadır. AChE, ACh'i 1-2 ms içinde bağlı olduğu

reseptörlerden ayırarak kolin ve asetata parçalar ve etkinliğini hızla sonlandırır (Şekil 2.9). Sinaptik yarıktaki kolin molekülleri, taşıyıcıları tarafından doğrudan presinaptik terminale geri alınır ve daha fazla ACh sentezlemek için yeniden kullanılır (Amenta ve Tayebati, 2008).

Asetilkolin Reseptörleri

Asetilkolin reseptörleri iki gruba ayrılır: Ligand kapılı iyon kanalları olan nikotinik reseptörler ve G protein aracılı muskarinik reseptörler. Her iki reseptör tipi de hem santral hem de periferik sinir sisteminde bulunur. Beyinde, ACh'nin nöromodülatör işlevlerine aracılık eden ACh reseptörleri pre ve post-sinaptik membranda eksprese edilir (Disney ve ark., 2006).

Nikotinik ACh reseptörleri eksitator katyon kanallarıdır ve aktivasyonu membranın depolarize olmasına neden olurlar (Nordberg ve ark., 1992). Nikotinik ACh reseptörleri tipik ligand kapılı iyon kanalları (iyonotropik reseptörleri) olup 2 alfa, 1 beta, 1 delta ve 1 gama (fetal dönemde bulunan gama alt ünitesi yetişkinlerde epsilon alt ünitesi ile yer değiştirir) olmak üzere 5 alt üniteli transmembran proteinleridir. Alt üniteler membranda merkezi por oluşturacak şekilde simetrik olarak düzenlenmişlerdir. 2 alfa alt ünitesine 2 molekül ACh bağlanmasıyla reseptör aktive olur, yani alt ünitelerin bir rotasyon (dönme) hareketi ile merkezi por açılır ve kanal Na^+ ve K^+ iyonları ile az miktarda Ca^{+2} iyonlarına geçirgen bir iyon kanalına dönüşür (seçici olmayan katyon kanalı). Kanalin sinaptik aralığa yakın ağız kısmı negatif yüklü olduğu için Cl^- gibi negatif yüklü anyonların geçişine izin vermez. Nikotinik ACh reseptörlerinin 12 farklı subtipi tanımlanmış olup, hipokampusta 9 tanesi bulunmaktadır (Sudweeks ve Yakel, 2000). Hipokampusta en çok bulunan nikotonik reseptör subtipi $\alpha 7$ homomerik ve piramidal nöronlarda $\alpha 4\beta 2$ heteromerik reseptörleridir. $\alpha 7$ nikotinik reseptörü sinaptik modülasyonda önemli bir rol oynayan Ca^{2+} 'a yüksek oranda geçirgenlik göstermektedir (Albuquerque ve ark., 1997).

Muskarinik ACh reseptörleri, hipokampusta iyon kondüktansını modüle ederek nöron uyarılabilirliğini ve nörotransmitter salınımını düzenlerler (Nordberg, 1992). Hücre içi PKA ve PKC seviyeleri ve dentritik aksiyon potansiyeli genliği muskarinik ACh reseptörleri aracılığıyla artar ve bu sinaptik plastisite indüksiyonu için önemlidir (Hoffman ve Johnston, 1999). Muskarinik reseptörler metabotropik reseptörlerdir ve tümü G protein aracılı etki gösteren M1-M5 olmak üzere 5 subtipi

vardır. M₁, M₃ ve M₅ muskarinik reseptörleri G_q proteinine bağlıdır ve eksitatördür. Reseptöre ACh bağlanmasıyla G_q proteinin α alt birimi ayrılarak bir membran enzimi olan fosfolipaz C'yi aktive eder. Bir membran fosfolipiti olan fosfatidil inozitol bifosfat, fosfolipaz C tarafından inozitol üç fosfat (IP₃) ve diasilgliserole (DAG) dönüştürülür. IP₃ endoplazmik retikulum veya sarkoplazmik retikulum gibi hücre içi depolardan Ca⁺² iyonlarının salınmasına neden olur. Hücre içinde artan DAG ve Ca⁺² bazı hücre içi proteinleri fosforile eden PKC'yi aktive eder. Bu enzim de efektör hücre türüne göre değişebilen bazı fizyolojik etkilere yol açar. M₂ ve M₄ muskarinik reseptörler Gi/o proteinine bağlıdır ve inhibitördür (Albuquerque ve ark., 1997). Reseptörlere ACh bağlanmasıyla AC enzimi inhibe olur, cAMP düzeyi azalır ve efektör hücre yanıtları ortaya çıkar (Albuquerque ve ark., 1997). Hipokampusta M₁, M₂ ve M₄ muskarinik reseptörleri pre-sinaptik veya post-sinaptik alanda eksprese edilmiştir (A Nordberg, 1992). Hipokampal nöronların eksitabilitesinin düzenlenmesinde kritik rol oynayan M₁ reseptörleri hipokampusta en çok bulunan subtiptir ve genelde dentritlerde ve somada eksprese edilmektedir (A Nordberg, 1992). M₂ ve M₄ reseptörleri esas olarak sinaptik terminallerde eksprese edilir ve nörotransmitter salınımını inhibe eder (Dasari ve Gullledge, 2011).

2.4.2. Kolinerjik Yolak ve Öğrenme

ACh sinir sisteminde bir nöromodülatör olarak fonksiyon gördüğü bilinmektedir. Nitekim beyinde kolinerjik sistemin hasarlanmasının öğrenme ve hafıza disfonksiyonu yarattığı birçok çalışma ile gösterilmiştir (Grothe ve ark., 2010; Teipel ve ark., 2014). Martyn ve ark. (2012) tarafından yapılan çalışmada beyin kolinerjik sisteminin hasarlanmasının öğrenme ve hafıza bozukluğu yarattığı, bu durumun kolinerjik agonistlerle geri döndürülebildiği gösterilmiştir (Martyn ve ark., 2012).

ACh ilk olarak nöromusküler kavşakta keşfedilmiş olmakla birlikte, bilişsel fonksiyonlarda rol oynayabileceği Alzheimer hastalığına bağlı demansta kolinerjik sistem hasarının gösterilmesiyle ortaya konmuştur (Gold ve Budson, 2008). Birçok çalışma ile AH'nin ilk evrelerinde ve AH gelişimi için yüksek riske sahip kişilerde bazal ön beyindeki kolinerjik sistemlerin atrofiye uğradığı gösterilmiştir (Grothe ve ark., 2010; Teipel ve ark., 2014). Alzheimer hastalığında sadece kolinerjik nöronların sayısında düşüş değil, aynı zamanda bazal ön beyinde ChAT seviyesinde de azalma rapor edilmiştir (Davies ve Maloney, 1976). Sıçan hipokampus kesitinde yapılan bir

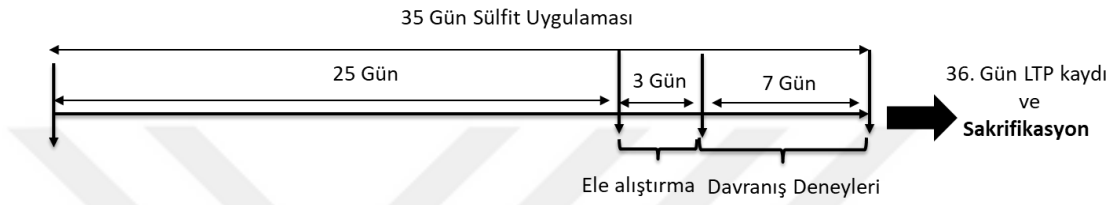
çalışmada ise kolinerjik bir agonist olan karbakolün CA1 bölgesinde LTP'yi güçlendirdiği tespit edilmiştir (Blitzer ve ark., 1990). Sıçan hipokampusu CA1 bölgesinde kolinerjik agonistin LTP'yi arttırması, CA3 bölgesinde ise baskılaması, bu iki bölgede, LTP'nin altında yatan farklı mekanizmaların olabileceğini ortaya koymuştur (Blitzer ve ark., 1990). CA3'teki LTP'nin NMDA aracılı akımları içermediği ve CA3'te LTP üzerindeki depresif kolinerjik etkiye voltaj kapılı Ca^{2+} akımlarının inhibisyonunun aracılık ettiği düşünülmekte ancak CA1'deki LTP için NMDA reseptörlerinin aktivasyonu gerektiğinden, Ca^{2+} kanal blokörleri tarafından ortadan kaldırılamaz (Blitzer ve ark., 1990).

Dentat girusta ACh'nin, nikotinik ve muskarinik reseptörleri aktive ederek LTP'yi arttırdığı gösterilmiştir (Matsuyama ve ark., 2000). CA1 bölgesinde ise LTP'nin muskarinik agonistler ya da AChE inhibitörleri ile güçlendirildiği in vitro deneylerle ortaya konmuştur (Huerta ve Lisman, 1993). Bunun yanı sıra, septal kolinerjik projeksiyonların, dentat girus granül hücrelerini modüle etmek için astrositleri aktive ettiği tespit edilmiştir (Pabst, 2016). ACh, protein sentezinin gerekli olduğu nörogenezisi, spine ve sinaps oluşumunu etkileyerek nöronal devreyi etkiler (Lozada ve ark., 2012) ve nöronun spike aktivitesini, nörotransmitter salınımını düzenleyerek sinaptik plastisite üzerinde akut etki gösterir (Aracri ve ark., 2010). In vitro olarak AChE inhibitörünün öğrenme bozukluklarını iyileştirdiği ve spike genliğini en az 2 saat arttırdığı gösterilmiştir (Kojima ve Onodera, 1998).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmamız Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarları ve Deney Hayvanları Ünitesinde gerçekleştirilmiştir.

3.1. Gruplandırma ve deney protokolü



Şekil 3.1. Deney protokolünün akış şeması

Çalışmamızda ortalama 250-300 gr ağırlığında, 60 adet, 3 aylık erkek Wistar sıçanlar üç gruba ayrılarak kullanılmıştır.

Grup 1: Kontrol grubu (K)

Grup 2: 100 mg/kg dozunda sülfid uygulanan grup (S100)

Grup 3: 260 mg/kg dozunda sülfid uygulanan grup (S260)

Deney protokolü Şekil 3.1.'de sunulmuştur. 35 gün boyunca kontrol grubuna distile su, sülfid gruplarına ise her gün taze olarak hazırlanan sodyummetabisülfid gavaj yoluyla verilmiştir. S100 grubuna 100 mg/kg/gün, S260 grubuna ise 260 mg/kg/gün sülfid uygulanmıştır. Bu süreçte hayvanlar her kafeste 5 hayvan olacak şekilde 12 saatlik karanlık/aydınlık döngüsünde tutulmuştur. Deney süresince sıçanlar ticari sıçan yemi ve musluk suyuyla beslenmiştir. 28. gün sıçanlara Morris su tankı testi protokolü uygulanmaya başlanmış, 34. gün open field testi, 35. gün ise obje tanıma testi yapılmıştır. 36. gün ürean anestezisi altındaki sıçanlardan LTP kayıtları alındıktan sonra abdominal aortlarından heparinize kan örnekleri alınmış, sonrasında sıçanların sol ventrikülünden girilerek aortaya kanül yerleştirilmiş, kanülün

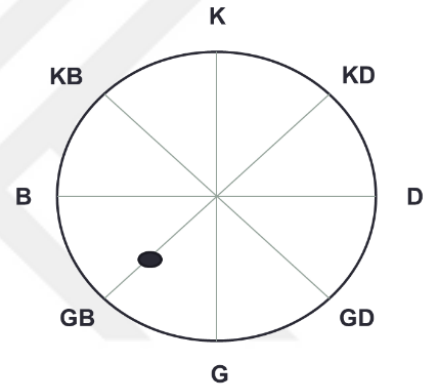
distalinden oklüzyon yapılarak heparinli serum fizyolojik ile beyin perfüzyonu sağlanmıştır. Perfüzyonu takiben beyin dokuları çıkarılmış, hipokampusları ayrılarak biyokimyasal analizlerde kullanılmak üzere sıvı nitrojende dondurulmuştur. Alınan heparinize kanlar 1400 g'de 6 dakika santrifüj edilerek plazmaları ayrılmış ve plazmalar S-sülfonat düzeylerinin tayinine kadar -80°C'de saklanmıştır.

3.2. Öğrenme Deneyleri

Öğrenme deneyleri için Ethovision XT (Noldus, 2009, Hollanda) video izleme sistemi kullanılmıştır. Bu sistem sayesinde sıçanların davranış deneyleri sırasındaki hareketleri video kamera ile kaydedilmiş ve gerekli veriler alınarak analiz edilmiştir.

3.2.1. Morris Su Tankı Testi

Gün	1. Trial	2. Trial	3. Trial	4. Trial
1	K	D	GD	KB
2	GD	K	KB	D
3	KB	GD	D	K
4	G	KB	K	GD
5	K	GD	D	KB
6 (Prop)	KD			



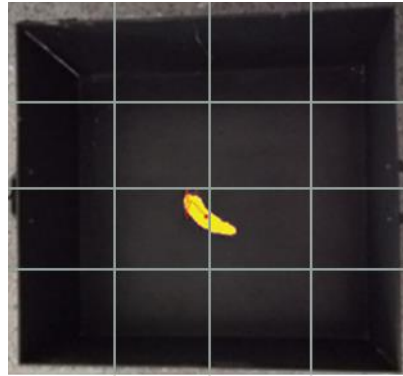
Şekil 3.2. Morris Su Tankı Testi Protokolü

Morris Su Tankı testi için çapı 150 cm, yüksekliği 60 cm olan dairesel siyah mat tabanlı su tankı kullanılmıştır. Uzaysal hafıza değerlendirileceğinden su tankının çevresine görülebilir ve yerleri sabit görsel ipuçları yerleştirilmiştir. Dairesel su tankı 31 cm derinlikte olacak şekilde, 22±1°C sıcaklığında suyla doldurularak bilgisayar ekranında 4 eşit kadrana bölünmüştür. Hedef kadranın ortasına 9 cm çapında bir platform, su yüzeyinden 2 cm aşağıda olacak şekilde yerleştirmiştir. Öğrenme deneylerine başlamadan önce hayvanların araştırmacıya alışmaları için 3 gün boyunca 5'er dakika ele alıştırma (handling) uygulanmıştır. Deneyin öğrenme aşamasında sıçanlar protokole uygun olarak tanka konulmuş (Şekil 3.2.) ve 120 sn

tankta yüzmelerine izin verilmiştir. Bu süre içinde platformu bulan hayvanların 10 sn süreyle platform üzerinde kalmalarına müsaade edilmiş ve 120 sn içinde platformu bulamayan sıçanlar yavaşça platforma yönlendirilerek 10 sn platformda kalmaları sağlanmıştır. 5 gün süreyle 5 dk aralıklarla günde 4 deneme (trial) uygulanmıştır (Şekil 3.2). 5 günlük öğrenme aşamasının sonunda platform kaldırılmış, 6. gün deney süresince öğrenmenin gerçekleşip gerçekleşmediği platformsuz su tankında yapılan 30 sn'lik yüzdürme test aşaması (probe trial) ile değerlendirilmiştir. Bu sırada sıçanların platformu bulma süreleri (escape latans), hedef kadrana giriş frekansları, aldıkları yol ve yüzme hızları analiz edilmiştir (Scheff ve Roberts, 2016).

3.2.2. Açık Alan Testi

Açık alan deneyleri duvar yüksekliği 40 cm olan, tabanı 80x80 cm ebatlarında kare şeklindeki siyah mat tabanlı düzenekte yapılmıştır. Deney düzeneği 16 küçük kareye bölünmüştür (Şekil 3.3). Deneyin başlangıcında sıçanlar tek tek bu alanın merkezine bırakılarak, 5 dk boyunca hareketleri video kayıt sistemi ile dijital olarak kaydedilmiştir. Her sıçan için girilen kare sayısı, kat edilen toplam mesafe ve ortalama hız ölçülmüştür (Navarro ve ark., 2014).



Şekil 3.3. Açık Alan Testi Deneyi Protokolü

3.2.3. Yeni Obje Tanıma Testi

Sıçanların görsel tanıma belleğini test eden bu yöntem duvar yüksekliği 40 cm olan, tabanı 40x40 cm ebatlarında kare şeklinde siyah mat tabanlı açık alan düzeneğinde yapılmıştır. Deneyde kullanılan nesneler cam yapıda olup, tabana deney hayvanının hareket ettiremeyeceği şekilde sabitlenmiştir (Şekil 3.4). İlk aşamada sıçanlar 3 dk boyunca açık alan düzeneğine tek tek konularak ortama alışmaları sağlanmıştır.

Ortama alışan hayvanlar, iki adet birbiri ile özdeş olan objelerin (A+A) yerleştirildiği düzeneğin içine, 5 dk boyunca nesneleri araştırmaları için bırakılmıştır. İlk deneyden 24 saat sonra yapılan test aşamasında, nesnelerden biri şekil ve boyutları farklı başka bir nesneyle değiştirilmiş ve sıçanların 3 dk boyunca yeni ve tanıdık nesneyi keşfetmeleri için geçirdikleri zaman kaydedilmiş, mekânsal olmayan belleğin değerlendirilmesi için kullanılmıştır. Hayvanların nesnelere 1 cm'den daha fazla yaklaşması, nesnenin keşfedilmesi için harcanan zaman olarak kaydedilip, yazılım programında ölçülebilmesi için hayvanın burnu referans olarak alınmıştır (Roozendaal ve ark., 2010). Sıçanların yeni nesneyi tanıdık nesneden ne kadar iyi ayırabildiğinin bir ölçüsü olarak kabul edilen ayırım indeksi (discrimination index) hesaplanmıştır. Ayırım indeksi hesaplanması aşağıdaki gibidir:

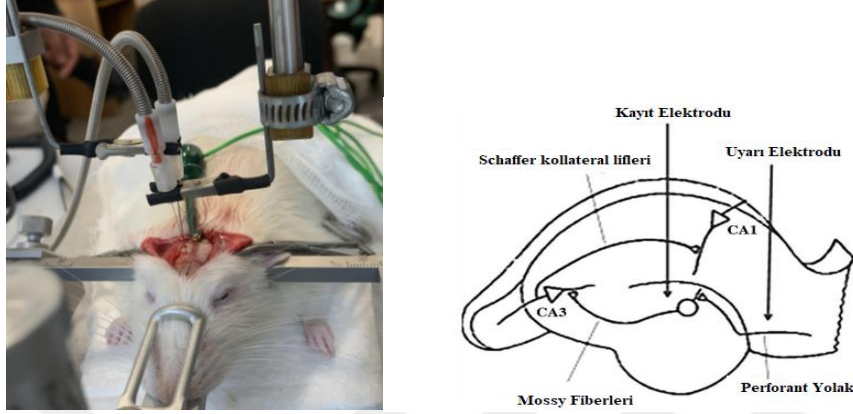
$$\text{Ayırım indeksi} = \frac{(\text{Yeni nesnede geçirilen süre} - \text{Tanıdık nesnede geçirilen süre})}{(\text{Yeni nesnede geçirilen süre} + \text{Tanıdık nesnede geçirilen süre})}$$



Şekil 3.4. Yeni Obje Tanıma Protokolü

3.3. LTP Parametreleri

3.3.1. Elektrofizyolojik Kayıt Alınması



Şekil 3.5. LTP kaydı sırasında kullanılan elektrotların yerleşimi

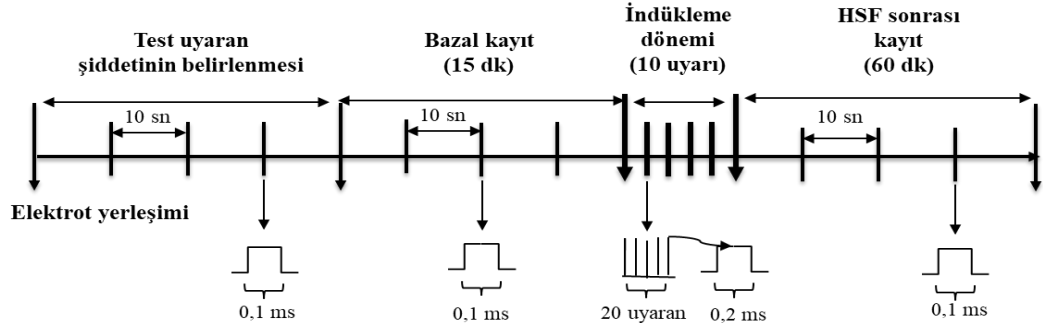
Elektrofizyolojik kayıtların tamamı Faraday kafesi içine alınmıştır.

LTP indüksiyonu için cerrahi prosedürler

Sıçanlar 1.5 g/kg dozda intraperitoneal olarak ürethan anestezisi ile uyutulmuş ve tüm işlemler sırasında sıçanların vücut sıcaklığı 37.0 ± 0.2 ° C'de sabit tutulmuştur. Sıçanların kafaları kulak ve ağız çubukları ile sisteme sabitlenip stereotaksik sisteme (Kopf Instruments, Tjunga, CA, ABD) yerleştirilmiştir (Şekil 3.5). Daha sonra, deri ve deri altı dokuları orta hat insizyonu ile açılarak kafatasına ulaşılmıştır. Fasyayı ayırarak kafatasını ortaya çıkarmak için pamuklu çubuklar kullanılmıştır. Bregma ve lambda açıkça görülebilir halde getirilerek aynı dorsoventral pozisyonda olacak şekilde ayarlanmış, hayvanın kafatası düz pozisyona getirilmiştir. Anterior-posterior, lateral ve dorsoventral ölçümleri kaydedebilmek için kafatasına değen iğne bregma üzerine yerleştirilmiş ve medial perforant yol (orta hattın 4.3 mm lateralinde, bregmanın 8.1 mm arkasında) ile dentat girus (orta hattın 2.3 mm laterali, bregmanın 3.8 mm arkası) koordinatları stereotaksik beyin atlasından belirlenerek ince uçlu kurşun kalem ile işaretlenmiştir (Paxinos ve Watson, 2006). İğne, stereotaksik koldan çıkarılarak ve elektrikli matkap (High Speed Stereotaxic Drill, Kopf Instruments) ile değiştirilmiştir. Matkabı işaretli her bir noktanın üzerine yerleştirerek, yaklaşık 0.5 mm çapında küçük delikler açılmıştır. Delme sırasında, tekrar eden yukarı aşağı hareketler ile matkabın kafatasına girip girmediği kontrol edilmiştir. Lambdanın yaklaşık 3 mm kadar arkasında açılan deliğe referans vida

elektrodu (#0-80 1/8 paslanmaz elik), kortikal yüzeye dokunacak şekilde hafifçe vidalanmıştır. Sol ve sağ stereotaksik kollardaki elektrot tutuculara uyarıcı ve kayıt elektrotları monte edilmiştir. Gümüş klorür disk elektrot ise toprak elektrot olarak kuyruğa yerleştirilmiştir.

Uyarıcı elektrot (platin kaplı, 0.010 inch bipolar twisted, Plastic One marka, paslanmaz elik, ucu dışında izole edilmiş), belirlenen koordinatlara göre hipokampusta perforant yolağa yerleştirilmiştir (yaklaşık kafatası yüzeyinin 3.2 mm altında) (şekil 3.5.) (Paxinos ve Watson, 2006). Uyarıcı elektrotun iki kutbu düşük dirençli kablolar ile uyarım izolatrne (MASTER 9, A.M.P.I, ISO Flex) bağlanmıştır. Monopolar kayıt elektrodu (0.005 inch, paslanmaz elik, Plastic One) terminali elektrofizyolojik diferansiyel amplifikatöre (bant geçiren filtre = 1 Hz – 3 kHz) (Bio Amps, ADInstruments) bağlanmış ve veri kontrolü Scope” yazılımı (AD Instruments) ile yapılmıştır. Ayrıca, toprak ve referans elektrot terminalleri de diferansiyel amplifikatöre bağlanmıştır. Hem uyarıcı hem de kayıt elektrodu, maksimal eksitrr postsinaptik potansiyel (EPSP) olarak tanımlanan pozitif yönlü sapmanın ardından populasyon spike (PS) olarak tanımlanan maksimum negatif yönlü sapma elde edilene kadar indirildi. Granül hücre tabakasının tipik yanıtı elde edildiğinde elektrotlar 0.1 mm’lik adımlarla indirilip en büyük cevap elde edilinceye kadar uyarılmaya devam edilmiştir. Maksimal alan EPSP’nin kaydedilmesi için kayıt elektrotunun yaklaşık derinliği 2.7-3.2 mm arasındadır. Optimal ventral konum, perforant yolağın stimülasyonunu takiben dentat girusta tetiklenen elektrofizyolojik kaydın izlenmesi ile elde edilmiştir (Omidı ve ark., 2020). Baseline kayıtları 0.1 Hz frekansta, 0.1 ms çift fazlı kare dalga pulsları ile elde edilmiştir (Nazari ve ark., 2016) (şekil 3.6.).

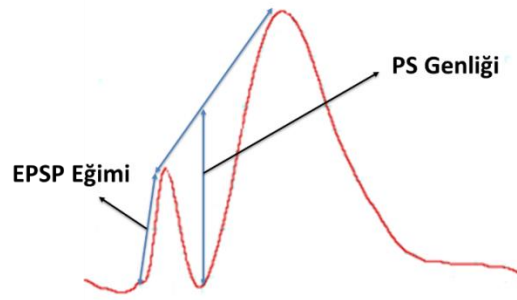


Şekil 3.6. LTP kaydının deney protokolü şeması

LTP indüksiyonu için Giriş-Çıkış (I/O) Eğrisi ve Yüksek Frekanslı Stimülasyon

Giriş/çıkış (I/O) yanıt eğrisi, tek puls stimülasyonunun (0,1 Hz frekansta 0,1 ms çift fazlı kare dalga pulsları) farklı yoğunlukları ile oluşturulmuştur. Uyarı akımı 0.1-1.5 mA aralığında uygulanmıştır ve kaydın devamında kullanılmak için en yüksek PS genliğinin yarısı kadar genlik oluşturan akım şiddeti test uyarısı şiddeti olarak belirlenmiştir (Süer ve ark., 2011). LTP, 400 Hz (20 uyarılık 10 burst, 0,2 ms uyarı süresi (iki fazlı kare dalga darbeleri), 10 saniye burst aralığı) HFS protokolü kullanılarak tetiklenmiştir. HFS'den sonra EPSP ve PS, dentat girus nöronlarındaki değişiklikleri gözlemlemek için 60 dakika boyunca kaydedilmiştir (Süer ve ark., 2011; Omid ve ark., 2020). Her bir sıçan için tek bir LTP kaydı alınmıştır.

PS genliği, ilk pozitif dalganın tepe noktası ile ilk negatif sapmanın tepe noktası arasındaki potansiyel fark ölçülerek, EPSP eğimi ise EPSP'nin başlangıç noktası ile ilk pozitif dalga tepesi arasındaki maksimum eğim olarak ölçüldü (Şekil 3.7). Dentat girus nöronlarının sinaptik yanıtındaki değişikliği belirlemek için, hem EPSP hem de PS yüksek frekanslı uyarıdan 60 dakika boyunca kaydedildi. 10 ardışık uyarılmış yanıtın ortalaması alındı.



Şekil 3.7. EPSP eğimi ve PS genliğinin hesaplanması

3.4. Biyokimyasal Parametrelerin Tayini

3.4.1. Plazma-S-Sülfonat tayini

Plazma-S-Sülfonat düzeyleri Gunnison ve Palmes'in yöntemiyle ölçülmüştür (Gunnison ve Palmes 1973). Daha önce hazırlanıp saklanan plazmalardan 1 ml alınarak, 200 µl KCN ile karıştırılmış ve 36°C'de 1 saat inkübe edilmiştir. Bu sürenin sonunda karışımın 1 ml'si diyalizat torbasına aktarılmış ve 5 ml glisin-NaOH tamponu içerisinde 4 saat oda sıcaklığında tutulmuştur. Daha sonra diyalizat torbasının dışındaki solüsyondan 1,4 ml bir tüpe aktarılarak üzerine sırası ile HCl, sodyumtetrakloromercurat solüsyonu, distile su, formaldehit reaktifi ve parorasanil reaktifi ilave edilmiştir. 20 dakika inkübasyon süresinin ardından karışımın absorbansı spektrofotometrede 560 nm'de okunmuştur. Plazma-S-Sülfonat miktarları µmol/ml olarak verilmiştir.

3.4.2. Asetilkolinesteraz Aktivitesi

AChE aktivitesi ticari kolorimetrik kit aracılığıyla ölçülmüştür (Sigma Aldrich, Acetylcholinesterase Activity Assay Kit, MAK119). Bu analiz, AChE tarafından üretilen tiyokolinin, 5,5'-dithiobis (2- nitrobenzoik asit) ile tepkimeye girmesi ve mevcut AChE aktivitesiyle orantılı bir kolorimetrik (412 nm) ürün oluşturması esasına dayanır. Bir birim AChE, oda sıcaklığında pH 7.5'te dakikada 1 µM tiyokolinin üretimini katalize eden enzim miktarıdır.

Kit Prosedürü:

AChE aktivitesinin tayini için hipokampus dokuları (n=7/grup) 20 mg/ml olacak şekilde pH 7.5'te 0.1 M'lık fosfat tamponu ile homojenize edilmiştir. 14.000 rpm'de 5 dk santrifüj işleminden sonra süpernatantlar alınarak kitte kullanılmak üzere -80°C'de saklanmıştır. 96'lık kuyucuklu plateler kullanılarak; örnek kuyucuklar için 10 µl örnek, kör kuyucuk için 200 µl saf su, bir kuyucuğa ise 200 µl kalibratör koyulmuş ve örnek kuyucuklara 190 µl çalışma solüsyonu eklenerek oda ısısında 2 dakika inkübe edilmiştir. 2 dakikanın sonunda 412 nm'de ilk ışımaya, 10. dakikada ise aynı dalga boyunda 2. ışımaya değerleri okunarak aktivite (units/L) hesabı yapılmıştır.

3.4.3. Kolin Asetiltransferaz Aktivitesi

ChAT aktivitesi ticari kolorimetrik kit aracılığıyla ölçülmüştür (Elabscience, Choline Acetyltransferase Assay Kit, E-BC-K125). Asetil-CoA ve kolin, ChAT katalizörlüğü altında reaksiyona girer ve reaksiyon ürünleri renk verici reaktif ile birleşir.

Kit Prosedürü:

ChAT aktivitesinin tayini için hipokampus dokuları; ağırlık (g):hacim (ml) oranı 1:9 olacak şekilde salin ile homojenize edilmiştir. 10 dakika boyunca 2.500 rpm'de santrifüj işleminin ardından süpernatantlar toplanmış ve 1:1 oranında salin ile dilüe edilmiştir. Her bir örneğin kendi kontrolünü elde edebilmek için 2 ml'lik ependorflar içerisine örneklerden 50 µl konulmuş, enzim aktivitesinin inhibe olması için 100°C suda 2 dakika kaynatılmıştır. Tüplere sırasıyla kit reaktifleri konulup 37°C'de 5 dakika inkübe edilmiş daha sonra örnekler ve kontrolleri eklenerek, 37°C'de 20 dakika daha inkübasyona bırakılmıştır. Sürenin sonunda reaksiyonun sonlanması için 100°C suda 2 dakika kaynatılmıştır. Her bir tüpe 425 µl bidistile su ilave edilip 4.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Toplanan süpernatantlara renk verici reaktifler eklenerek 15 dk daha oda ısısında bekletilmiş, 1 cm çapında ve 2 mm iç çapındaki kuvvetlerde 324 nm'de bidistile suya göre kalibrasyon yapılarak absorbans değerleri okunmuş ve ChAT'nin aktivitesi ile oluşan son ürünün absorbansı 324 nm'de ölçülerek hesaplanır.

3.4.4. Western Blot ile Arc ve sinapsin 1'in ekspresyonlarının analizi

Arc ve sinapsin I düzeylerine sinaptozom örneklerinde bakılmıştır. Sinaptozom hazırlığı McGovern ve ark.'larının (1973) metoduna göre yapılmıştır. Davranış

testinin bitmesinin hemen ardından çıkarılan hipokampus dokusu proteaz inhibitörü eklenerek %10'luk (wt/vol) 0.32 M sükröz solüsyonu içerisinde homojenize edilmiş, homojenatlar 600 g'de 4°C'de 10dk santrifüj edilmiştir. Final konsantrasyonu 0,8 M sükröz olacak şekilde süspansiyon elde etmek için supernatantlar 1,3 M sükröz ile 1:1 oranında dilüe edilmiştir. Süspansiyon 20.000 g'de +4°C'de 30 dk santrifüj edilmiştir. Daha sonra supernatantlar atılmış, sinaptozomları içeren pelet HEPES tamponu (145 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl₂ 2.1 mM MgCl₂ 2,5 mM glikoz ve 5 mM HEPES, pH 7.4) içerisinde çözölmüştür. Elde edilen sinaptozom biyokimyasal prosedürlerde kullanılıncaya kadar -80°C'de saklanmıştır.

Deney gruplarına ait sinaptozom doku örneklerinde protein miktarı Coomassie Plus protein ölçüm kiti ile tespit edilmiştir. Primer antikor olarak Arc (ABCAM ab23382) ve sinapsin I (ABCAM ab64581)'e özgü primer antikorlar kullanılmıştır. Primer antikora bağlanan proteinlerin tespiti için alkalın fosfataz bağılı ikincil antikor ve alkalın fosfataz deteksiyon kiti kullanılmıştır. İnternal standart ve kontrol olarak β-aktin kullanılmıştır. Image J yazılım programı kullanılarak elde edilen protein bantlarının dansitometrik tarama metodu ile ölçümü yapılmıştır.

3.4.5. Kütle Spektrometresi ile Asetilkolin Tayini

ACh düzeyinin tayini ultra-hızlı sıvı kromatografi (LC-20 AD UFLC XR, Shimadzu Corporation, Japonya) sistemine bağımlı LC/MSMS (LCMS-8040 Shimadzu Corporation, Japonya) cihazı kullanılarak yapılmıştır. Asetilkolin standardı 1:10 formik asit/distile su solüsyonunda hazırlanmıştır. Ölçölecek asetilkolin için optimize multiple reaction monitoring (MRM) metodu geliştirilmiştir. MRM geçişleri ACh için otomatik olarak pozitif elektrosprey iyonizasyon (ESI) modunda optimize edilmiştir. Pozitif ESI-MS modundan elde edilen MRM m/z değerleri asetilkolin için 146/87 olarak belirlenmiştir. Kromatografik ayrımlar 25°C'de Inertsil HPLC kolonunda (ODS-4, 3 x100 mm, 2µm; GL Sciences Inc. Tokyo, Japan) gerçekleştirilmiştir. ACh gradient elüsyonu (akış hızı 0,4 ml/dk) ile ayrılmıştır. Mobil faz A, 900 ml su: 100 ml asetonitril: 1 ml formik asit; Mobil faz B, 999 asetonitril: 1 ml formik asit olacak şekilde hazırlanmıştır. Gradient programı mobil faz B; 0-1 dk %5-%50; 1-2 dk %50-%95; 2-3dk %95 ve 3-4 dk, %5 şeklinde gerçekleştirilmiştir. İnjesiyon volumü 5 µl olarak kullanılmıştır. Asetilkolin

standardının lineer kalibrasyon aralığı 50-1000 ng/ml olarak seçilmiştir (Santos-Fandila ve ark., 2013).

3.3.5. İstatiksel Analiz

Elde edilen sonuçlar ortalama±standart hata olarak verilmiş ve $p<0.05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Verilerin normallik koşulunu sağladığı durumda grupların karşılaştırılmasında tek yönlü varyans analizi (ANOVA), posthoc karşılaştırmada Tukey testi kullanılmıştır. Normallik koşulunun sağlanamaması durumunda ise Kruskal Wallis testi yapılarak ikili karşılaştırmada Mann Whitney-U testi uygulanmıştır.



4.BULGULAR

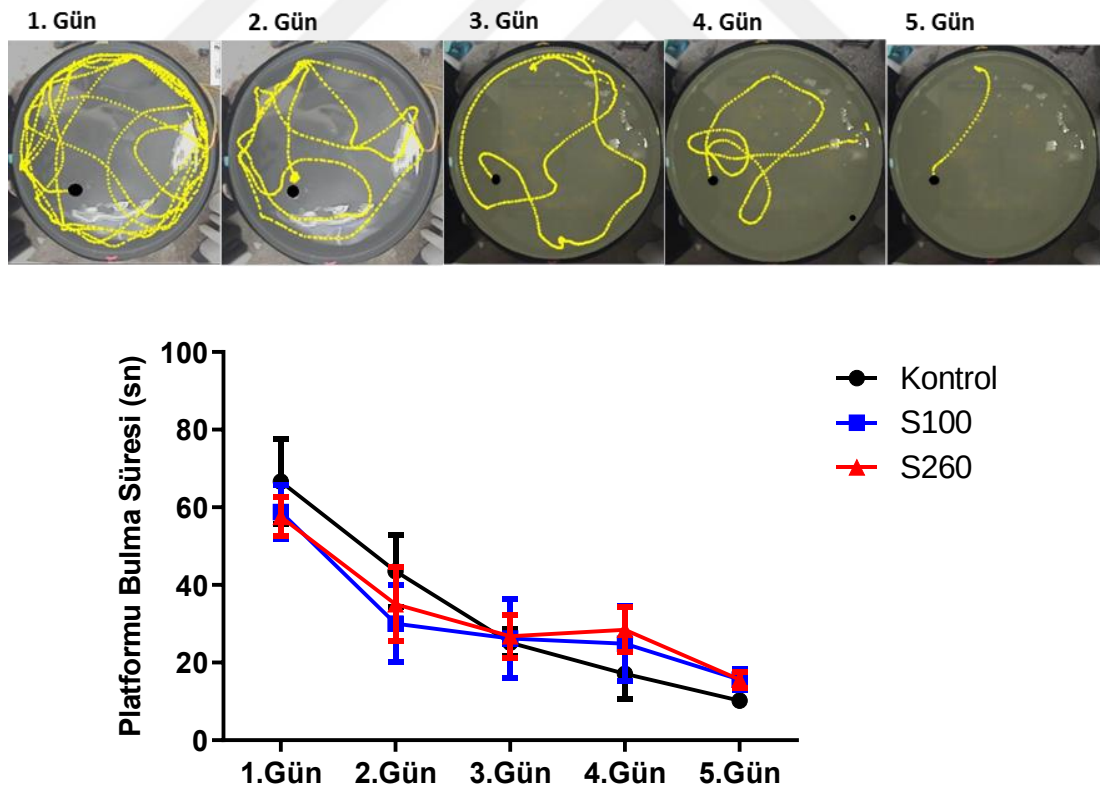
4.1. Genel Görünüm

Sıçanlar genel görünüşleri ve davranışları açısından değerlendirildiğinde, deney grupları arasında herhangi bir farklılık gözlemlenmemiştir.

4.2. Öğrenme Deneyi Bulguları

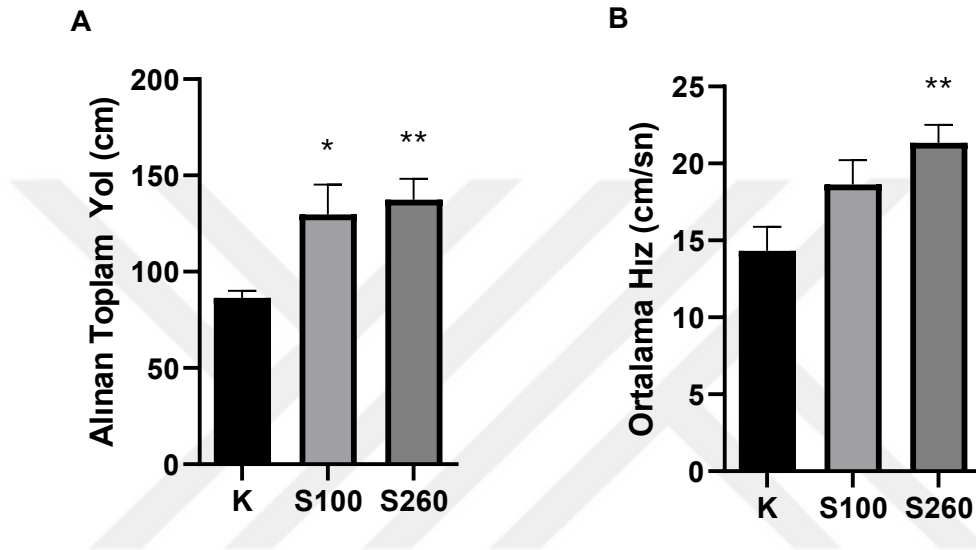
4.2.1. Morris Su Tankı Testi

Uzaysal Hafızanın değerlendirildiği Morris Su Tankı testinde 5 günlük eğitim süresi boyunca platformu bulma süresi (escape latans), test aşamasında (probe trial yani 6. gün) ise toplam alınan yol ve ortalama hız verileri değerlendirilmiştir. Grupların 5 günlük eğitim süresi boyunca, platformu bulma süreleri değerlendirildiğinde K grubu ile sülfıt alan gruplar arasında günlere bağılı olarak istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. Elde edilen platformu bulma süreleri Şekil 4.1’de verilmiştir.



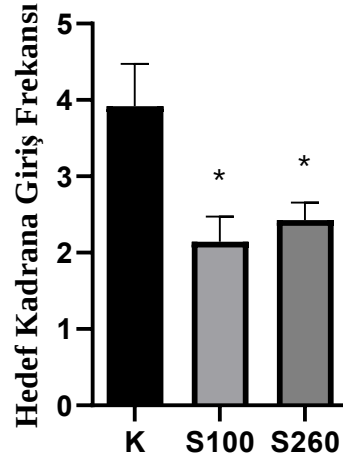
Şekil 4.1. Morris Su Tankı testinde ilk beş günlük test denemelerinde platformu bulma süresi

Test aşamasında (6. gün), alınan toplam yolun sülfite maruz kalan S100 ve S260 gruplarında (sırasıyla $129,80 \pm 15,45$ cm; $137,40 \pm 10,84$ cm), K grubuna ($86,40 \pm 3,62$ cm) kıyasla anlamlı bir şekilde arttığı tespit edilmiştir. (Şekil 4.2A). Benzer şekilde ortalama hız verileri incelendiğinde S100 ve S260 gruplarında (sırasıyla $18,64 \pm 1,59$ cm/sn; $21,34 \pm 1,16$ cm/sn) K grubuna ($14,32 \pm 1,58$ cm/sn) göre artış tespit edilirken, bu artışın sadece S260 grubunda istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür (Şekil 4.2B).



Şekil 4.2. Morris Su Tankı testinde test aşamasına (6.gün) ait veriler. (A) Sıçanların test sırasında aldıkları toplam yol. (B) Deney gruplarındaki sıçanların test sırasındaki ortalama hız değerleri
* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ K grubuna göre fark, N=10

Morris Su Tankı testinde kaçış platformunun kaldırıldığı test aşamasında, önceden platformun bulunduğu kadrana (hedef kadrana) giriş frekans değerlendirildiğinde, sülfite alan S100 ($2,143 \pm 0,32$) ve S260 ($2,42 \pm 0,22$) gruplarında, K grubuna ($3,97 \pm 0,55$) göre anlamlı derecede düşük olduğu saptanmıştır (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Morris Su Tankı testinin 6.gününde yani test aşamasında sıçanların hedef kadrana giriş frekansı * $p<0,05$ K grubuna göre farkı ifade etmektedir. N=10

4.2.2 Açık Alan Testi Sonuçları

Açık alan testinde toplam yol, ortalama hız ve girilen kare sayısı parametrelerinin sonuçları Tablo 4.2.'de sunulmuştur. Açık alan testinde sülfite almış gruptaki sıçanların lokomotor aktivite parametrelerinin, kontrol grubuna göre doz bağımlı olarak arttığı tespit edilmiştir. K grubu ile karşılaştırıldığında S100 ve S260 gruplarında kat edilen toplam yolun, girilen kare sayısının ve ortalama hız değerlerinin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı bulunmuştur.

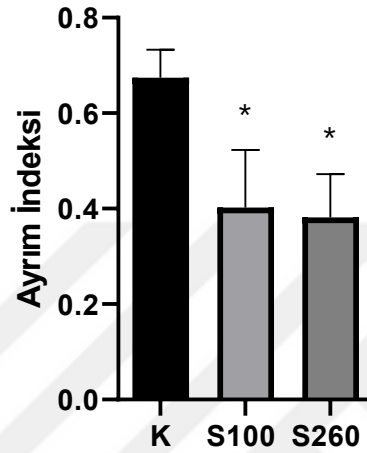
Tablo 4.1. Açık alan testinde, gruplara ait, girilen kare sayısı, toplam yol ve hız değerleri verilmiştir.

Grup	Girilen Kare Sayısı	Toplam Yol (cm)	Ortalama Hız (cm/dk)
K	40 ± 6,68	861,98 ± 54,50	169,10 ± 16,37
S100	60 ± 7,23 *	1110,52 ± 81,79 *	242,80 ± 20,80 *
S260	70 ± 9,34 *	1251,77 ± 109,44 *	304,09 ± 19,20 **

* $p<0,05$, ** $p<0,01$ K grubuna göre fark, N=10

4.2.3 Yeni Obje Tanıma Testi

Yeni obje tanıma testi sonuçları şekil 4.4.'te verilmiştir. Obje tanıma testi sonuçları değerlendirildiğinde, ayırım indeksinin S100 ($0,40 \pm 0,12$) ve S260 ($0,38 \pm 0,09$) gruplarında K ($0,67 \pm 0,05$) grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düştüğü saptanmıştır.

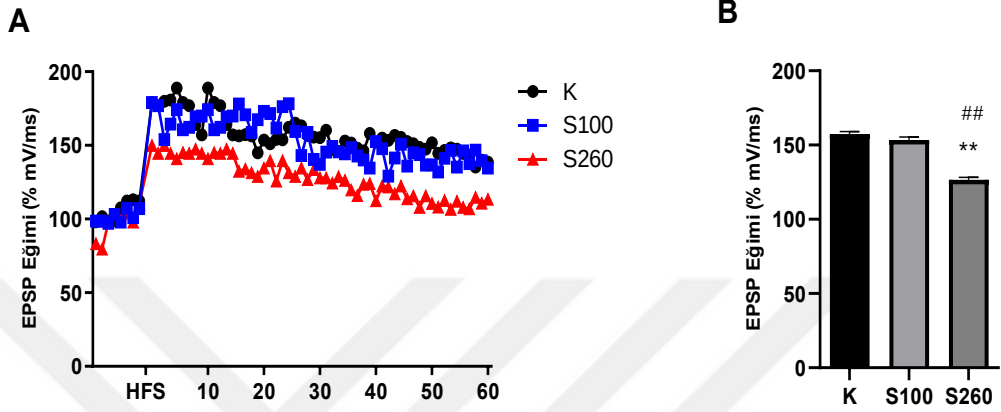


Şekil 4.4. Yeni obje tanıma testinde grupların ayırım indeksi değerleri. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ K grubuna göre fark, N=10

4.3. LTP kaydı ile ilişkili bulgular

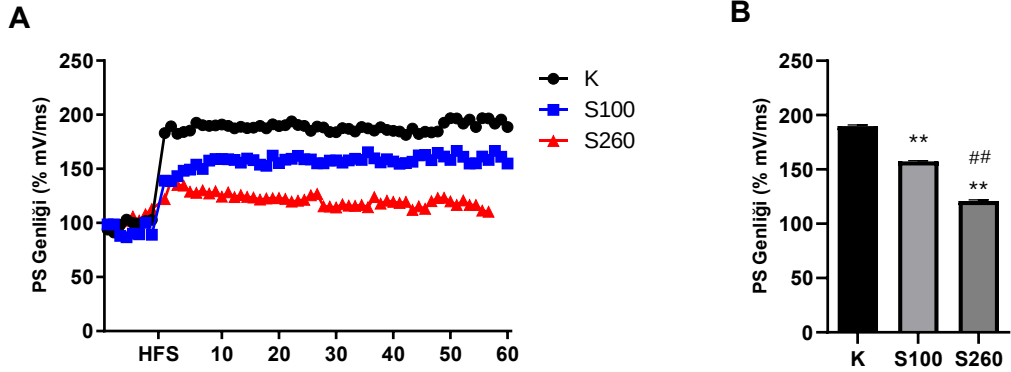
Perforant yol ve dentat girus sinapslarında indüklenen LTP, HFS'den sonraki 0-60'ncı dakikalar arasındaki potansiyellerin bazal dönem kayıt ortalamalarına göre yüzdelik değişim olarak ifade edilmiş, PS genliği ve EPSP eğimleri hesaplanmıştır (Şekil 3.7.). Sonuçlar Şekil 4.5 ve Şekil 4.6' de verilmiştir. EPSP bileşeninin eğiminin, HFS'den sonra 60 dakika boyunca gösterdiği ortalama artış oranının, S260 grubunda K ve S100 grubuna göre anlamlı derecede azaldığı görülmüş olup, S100 ve K grupları arasında anlamlı fark tespit edilmemiştir. Alan potansiyellerinin PS genliği, HFS'den sonra 60 dakika süreyle sülfid verilen gruplarda kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük olduğu saptanmış, aynı zamanda S260 grubunun PS genliğinin S100 grubuna göre de anlamlı derecede düşük olduğu bulunmuştur. Şekil 4.5'te gösterildiği üzere, gruplar arası karşılaştırmalarda, HFS uyarısından sonra 60 dakikalık dönemde EPSP eğimlerinin değişimi incelendiğinde S260 grubunda ($126,63 \pm 1,68$), S100 ($153,52 \pm 2,01$) ve K ($157,41 \pm 1,72$) grubuna göre anlamlı derecede azaldığı görülmüştür ($p > 0,01$). PS genliklerindeki değişim analiz

edildiğinde hem S260 grubu ($120,91 \pm 6,75$) hem de S100 ($157,42 \pm 5,010$) grubu değerlendirildiğinde K ($190,15 \pm 7,02$) grubuna göre azaldığı, ayrıca S260 grubundaki azalmanın S100 grubundan da önemli düzeyde düşük olduğu tespit edilmiştir ($p > 0,01$).



Şekil 4.5. Dentat girus alan potansiyeli EPSP verileri **A)** Dentat girus sinapslarından elde edilen kontrol ve sülfid gruplarına ait EPSP eğimleri **B)** HFS sonrası dönemlerdeki ortalama EPSP eğim değerleri EPSP eğimi, bazal kayıt ortalamasına göre yüzdelik değişim olarak ifade edilmektedir

** $p < 0,01$ K grubuna göre fark, ## $p < 0,01$ S100 grubuna göre fark, N=10



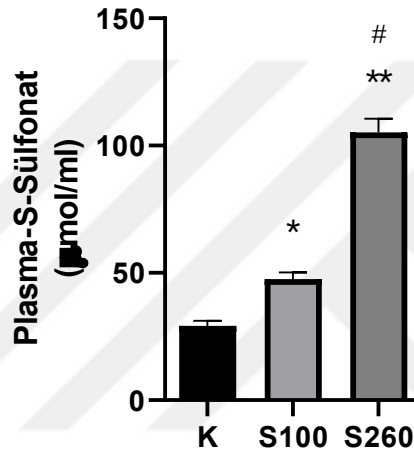
Şekil 4.6. Dentat girus alan potansiyeli PS verileri **A)** Dentat girus sinapslarından elde edilen kontrol ve sülfid gruplarına ait alan potansiyeli PS genlik değerleri **B)** HFS sonrası dönemlerdeki ortalama PS genlik değerleri. PS, bazal kayıt ortalamasına göre yüzdelik değişim olarak ifade edilmektedir

** $p < 0,01$ K grubuna göre fark, # $p < 0,05$ S100 grubuna göre fark, N=10

4.4. Biyokimyasal Parametre Bulguları

4.4.1. Plazma-S-Sülfonat Bulguları

Kontrol ve sülfite uygulanan grupların Plazma-S-Sülfonat düzeyleri Şekil 4.7’de sunulmuştur. S100 ($47,54 \pm 2,66 \mu\text{mol/ml}$) ve S260 ($105,20 \pm 5,45 \mu\text{mol/ml}$) gruplarının plazma-S-Sülfonat değerlerinde K grubuna ($29,24 \pm 1,91 \mu\text{mol/ml}$) göre artış tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra, S260 grubunun Plazma-S-Sülfonat seviyesinin S100 grubuna göre de istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı saptanmıştır.



Şekil 4.7. Deney gruplarının plazma S-Sülfonat değerleri.

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ K grubuna göre fark, # $p < 0,05$ S100 grubuna göre fark, N=10

4.4.2. Asetilkolin Düzeyi, Asetilkolinesteraz ve Kolinasetiltransferaz Aktiviteleri

Grupların hipokampus dokusunda asetilkolin seviyeleri değerlendirildiğinde, sülfite verilen S100 ve S260 gruplarının asetilkolin düzeylerinin K grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu saptanmıştır (Tablo 4.2.). Tablo 4.2.’de gösterilen hipokampus dokusundaki asetilkolinesteraz enzim aktiviteleri değerlendirildiğinde K grubu ile S100 grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamazken, S260 grubunun AChE enzim aktivitesinin K grubuna göre anlamlı derecede düşük olduğu belirlenmiştir. Hipokampus dokularında kolinasetiltransferaz aktivitelerine bakıldığında ise S260 grubunda K grubuna göre anlamlı derecede yükseliş olduğu,

S100 grubunda ise K grubuna göre bir miktar artış olduğu ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı düzeyde olmadığı tespit edilmiştir.

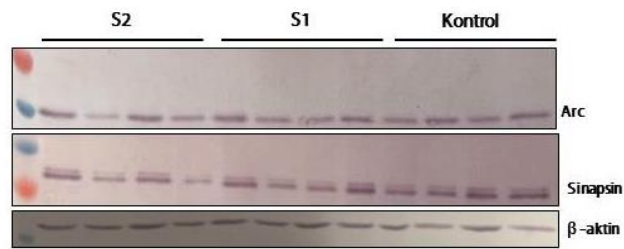
Tablo 4.2. Hipokampus dokularında ölçülen asetilkolin düzeyi, AChE ve ChAT enzimlerinin aktiviteleri

Grup	ACh (ng/ml)	AChE (units/L)	ChAT (U/ g doku)
K	51,09 ± 2,75	27,43 ± 1,25	42,69 ± 6,82
S100	74,48 ± 4,14 **	23,84 ± 1,24	53,34 ± 10,68
S260	75,01 ± 4,35 **	18,59 ± 2,49 *	70,69 ± 8,75 *

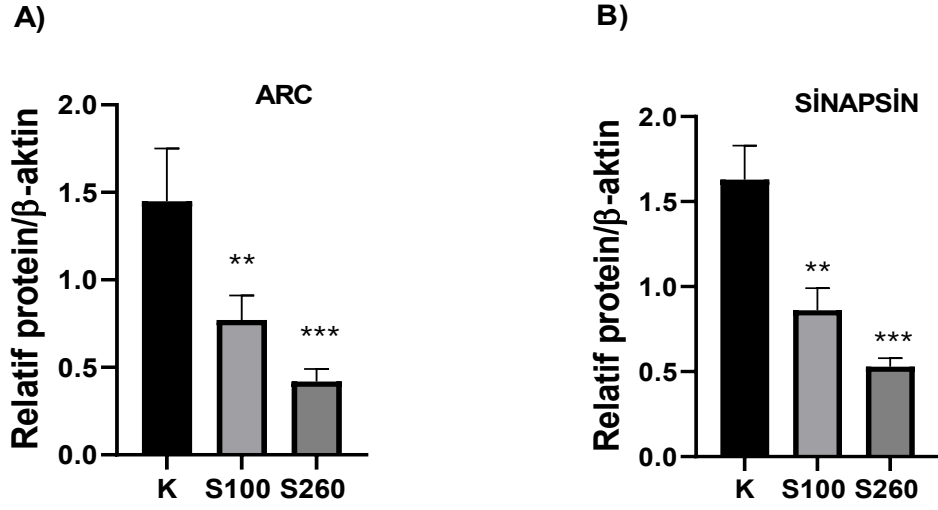
* p<0,05, **: p<0,01 K grubuna göre fark, N=10

4.4.3. Arc ve Sinapsin 1 Seviyeleri

Şekil 4.8’de K, S100 ve S260 gruplarına ait sinaptozom doku örneklerinden elde edilen Arc ve sinapsin I’e ait immünoreaktif protein bantları gösterilmiştir. Şekil 4.9’da ise Arc ve sinapsin I proteinlerinin ekspresyon düzeylerindeki farklılıklar deney grupları arasında karşılaştırmalı olarak verilmiştir. Hem Arc (Şekil 4.9 A) hem de sinapsin I (Şekil 4.9 B) seviyelerinde sülfite alan gruplarda kontrol grubuna göre anlamlı düşüş olduğu saptanmıştır.



Şekil 4.8. Arc ve Sinapsin immünoreaktif protein bantlarının β-aktin ile birlikte gösterimi



Şekil 4.9. Hipokampus dokularında Arc ve Sinapsin protein seviyelerinin β -aktine orantısal relatif değerleri. ** $p < 0,01$ ile *** $p < 0,001$ K grubuna göre fark, N=5

5.TARTIŞMA

Sülfite bileşikler, gıda katkı maddesi olarak güvenilir kabul edilmesinin ardından, gıda ve ilaç preparatlarında koruyucu, antimikrobiyal ve antioksidan olarak kullanılmaya başlanmıştır. Yapılan doz bağımlı çalışmalarda 72 mg/kg/gün dozunda sülfite yan etkilerinin olmadığı rapor edilmiş ve bu bilgilerin ışığında WHO, 100 katlık güvenlik faktörü ekleyerek günlük 0,7 mg/kg sülfite alımının güvenli olduğunu bildirmiştir (Til ve ark., 1972). Fakat günümüzde hazır gıda kullanımının artmasıyla birlikte günlük tüketim, güvenilir dozun çok üzerine çıkmıştır (Gunnison ve ark., 1987; Lester, 1995). Diyetle alınan sülfite gastrointestinal sistemden emilerek beyin dâhil bütün organlara yayılmakta ve su ile reaksiyona girerek toksisite yaratan bileşikler oluşturmaktadır (Fridovich ve Handler, 1961). Sülfite doz bağımlı (günlük 100 mg/kg, 260 mg/kg, 520 mg/kg $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) etkileri farklı sistemler üzerinde araştırılmış ve sülfite toksik ürünlerinin DNA, proteinler, lipitler gibi birçok hücresel bileşikle etkileşime girerek geri dönüşümsüz hücre hasarına sebep olduğu gösterilmiştir (Rencüzoğulları ve ark., 2001, Özsoy ve ark., 2012; Noorafshan ve ark., 2013; Kencebay ve ark., 2013). Ekibimiz tarafından daha önce yapılmış çalışmalarda 100 ve 260 mg/kg/gün dozlarında $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ maruziyetinin beyin dokusunda TBARS ve 4-HNE seviyelerini arttırdığı (Oztürk ve ark., 2011), apoptotik nörodejenerasyona bağlı somatosensoriyel uyarılma potansiyellerinin latenslerini uzattığı, somatosensoriyel alanda kaspaz-3 enzim düzeyini ve TUNEL (Terminal Deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labeling) pozitif hücre sayısını artırarak nörodejenerasyona neden olduğu gösterilmiştir (Kencebay ve ark., 2013). Ayrıca gıdalar yoluyla günlük alınabilecek farklı dozlardaki (günlük 25 mg/kg, 100 mg/kg, 260 mg/kg sodyum metabisülfite) sülfite öğrenme ve hafızayı bozduğu, bu bozulmanın önemli bir nörotransmitter olan glutamatın hipokampusta geri alınımı ve salınımı ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Noorafshan ve ark., 2013, Kencebay ve ark. 2013). Sülfite farklı dozlarının etkilerini araştıran çalışmalar göz önünde bulundurularak, çalışmamızda 100 ve 260 mg/kg/gün dozlarında $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ uygulanmasına karar verilmiştir.

Sülfitler özellikle proteinlerin sistein amino asidinin disülfite bağları ile reaksiyona girerek S-sülfonat bileşiklerini oluşturmaktadır (Taylor ve ark., 1986a). Plazma proteini ile kompleks oluşturan S-sülfonat, sülfite alımının göstergesi olarak kabul

edilmektedir (Gunnison ve Palmes, 1978). Tavşanlara ekzojen olarak sülfite verilmesinin ardından plazmalarında S-sülfonatlar saptanmış, sülfite alımının kesilmesinin ardından ise plazma S-sülfonat değerlerinin düştüğü tespit edilmiştir (Gunnison ve Palmes, 1978). Ekibimiz tarafından daha önce yapılan çalışmalarda da sıçanların 100 mg/kg/gün ve 260 mg/kg/gün sülfite maruziyetinden sonra plazma-S-sülfonat değerlerinde artış olduğu görülmüştür (Ozturk ve ark., 2011; Kencebay, 2017). Çalışmamızda da sülfite verilen her iki grupta da plazma S-sülfonat düzeyleri kontrol grubundan daha yüksek bulunmuş olup, önceki yayınlarımızı destekler niteliktedir. Ayrıca S260 grubunun plazma S-sülfonat düzeyinin S100 grubundan daha yüksek olması, maruz kalınan sülfite dozuna bağlı olarak plazma S-sülfonat seviyesinin de arttığını göstermiştir.

Sülfitin öğrenme üzerindeki etkilerini araştıran çalışmalarda, kısa ve uzun süreli hafızanın değerlendirildiği radyal kollu labirent testinde sıçanlarda 100 mg/kg/gün ve 260 mg/kg/gün sülfite uygulamasının referans ve çalışan hafıza performansını azalttığı (Kencebay, 2017), ayrıca Noorafshan ve ark.'larının yapmış oldukları başka bir çalışmada benzer şekilde 25 mg/kg/gün dozunda sülfite uygulanmasının kognitif fonksiyon bozukluğuna sebep olduğu gösterilmiştir (Noorafshan ve ark., 2013). Çalışmamızda Morris su tankı testinde eğitim süresince sülfite gruplarının kaçış platformunun yerini bulma süresindeki değişim günlere bağlı olarak daha yavaş olmuştur, bu durum bilişsel işlevlerin azaldığını göstermektedir. Test aşamasında ise sülfite gruplarında alınan ortalama yol ve hızın artışı sıçanların lokomotor aktivitelerinin artışı ile ilişkilendirilmiştir. Morris su tankı testinin son gününde uzaysal hafızanın değerlendirilmesinde önemli bir parametre olan platformun bulunduğu kadrana giriş frekanslarındaki düşüş, sülfite maruz kalan grupların uzaysal ipuçlarını kullanarak kaçış platformunun yerini hatırlayamadıklarını göstermektedir. Bulgularımız sülfite maruziyetine bağlı olarak uzaysal hafızanın bozulduğunu gösteren literatürdeki bilgileri destekler niteliktedir. Sıçan hipokampusunda hücresel dejenerasyona ve hücresel ölüme sebep olan morfolojik değişikliklerin öğrenme ve uzaysal hafızayı bozduğu rapor edilmiştir (Su ve ark., 2016). Nitekim, Akdoğan ve ark.'ları (Akdogan ve ark., 2011) tarafından 25 mg/kg/gün sülfite dozunun hipokampusta piramidal hücrelerin hasarına sebep olduğu bildirilmiştir. Ayrıca, Öztürk ve ark. (Öztürk ve ark., 2006) SOX eksikliği oluşturulmuş sıçanlarda, NMDAR'ların NR2A ve NR2B alt birimlerinin seviyesinde

azalma olduğunu bulmuşlardır. Burgdorf ve ark.'ları (Burgdorf ve ark., 2013) öğrenme ve hafıza performansında NMDA reseptör alt tipi NR2B'nin artışının kritik rol oynadığını rapor etmişlerdir. Morris su tankı test verilerindeki bilişsel bozulmanın sebebi hem literatürdeki verilerde hem de önceki çalışmalarımızda elde ettiğimiz NMDAR seviyesindeki azalış ya da hücresel dejenerasyona bağlı hücre ölümü ile ilişkili olarak değerlendirilmiştir.

Açık alan testinde, nörolojik bozukluklarla ilişkilendirilen lokomotor aktivite değişimi değerlendirildiğinden, bu test nörotoksisite çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır (Artigas, 2013; Quines ve ark., 2014). Preadelösan dönemde 35 gün boyunca 100 mg/kg/gün sülfıt uygulanan sıçanların, açık alan testinde kat ettikleri mesafenin, girdikleri kare sayısının ve hızlarının kontrol grubuna göre arttığı rapor edilmiştir (Topak, 2017). Mevcut çalışmamızda da sülfıt uygulanan deney gruplarının açık alan testi verileri değerlendirildiğinde lokomotor aktivitelerinde artış olduğu gösterilmiştir. Hipokampus, striatum ve frontal kortekste ekstraselüler ACh konsantrasyonunun artışı genellikle lokomotor aktivite artışı ile ilişkilendirilmektedir (Paredes ve ark., 1999; Miyakawa ve ark., 2001; Day ve ark., 1991). Kemirgenlerde muskarinik reseptörlerin farmakolojik blokajının belirgin hiperaktiviteye sebep olduğu gösterilmiştir. Watanabe ve Shimizu (Watanabe ve Shimizu, 1989), atropin ve scopolamine gibi antikolinergik ajanların striatal ACh salınımını ve motor aktiviteyi artırdığını göstermişlerdir. Daha sonra Day ve arkadaşları (Day ve ark., 1991) skopolaminin striatum, hipokampus ve korteks diyalizatlarında ACh konsantrasyonunu artırdığını ve ACh seviyelerinin lokomotor aktivite ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir. Skopolamin enjeksiyonundan sonra muskarinik reseptör blokajının sonucu olarak ACh miktarında artış meydana gelmiştir ve azalan muskarinik kolinerjik transmisyon hiperaktiviteye sebep olmuştur. Bunun olası bir sebebi striatopallidal nöronlar üzerindeki uyarıcı M1 reseptörlerinin etkisinin azalmasından kaynaklı hiperaktivite oluşmasıdır (Miyakawa ve ark., 2001). Bu sebeple çalışmamızda gözlenen aktivite artışı, tespit ettiğimiz hipokampus dokusunda artan ACh seviyesi ve ileriki çalışmalarda daha ayrıntılı araştırılması gereken sülfıtın muskarinik reseptörler üzerindeki antagonist etkisi ile ilişkili olabilir.

Hipokampus, perirhinal korteks, medial prefrontal korteks ve ventral striatum gibi beyin bölgelerinin aralarında bulunan sinir projeksiyonları nesne tanıma belleği için

gereklidir (Barker ve Warburton, 2011; Win-Shwe ve ark., 2012). Ayrıca, dopamin, glutamat, ACh ve serotonin gibi nörotransmitterler nesne tanıma belleğinde rol alır (Warburton ve ark., 2003; Schilström ve ark., 2011). Çalışmamızda, hipokampusa bağlı uzaysal öğrenmeyle birlikte, hipokampusa bağlı mekansal olmayan öğrenme üzerinde sülfitin etkilerini ortaya koyabilmek için yeni obje tanıma testi kullanılmıştır. Test sonucunda sülfid gruplarının öğrenme indekslerinde anlamlı azalma görülmüş olup, bu durum tanıma belleğinde bozulma olduğunu ortaya koymuştur. Win-Shwe ve ark. (Win-Shwe ve ark. 2012) tarafından yapılan çalışmada yeni obje tanıma testindeki bozulma NMDAR alt tiplerini NR1 ve NR2, eksitator amino asit taşıyıcısı 4 ve CaMK-IV seviyesinin azalması ile ilişkilendirilmiştir. Ekibimiz tarafından daha önce yapılan çalışmada sülfitin eksitator amino asit taşıyıcılarını, NMDAR alt tiplerini ve CaMKII fosforilasyonunu azalttığı gösterilmiştir (Proje tamamlandı, henüz yayın aşamasında). Mevcut çalışmamızda ise ayırım indeksinin azalışının daha önceki çalışmamızda elde ettiğimiz PKA ve CaMKII seviyesindeki azalış ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür. ACh yolağının davranışsal parametreler üzerindeki etkilerinin araştırıldığı başka bir çalışmada, nikotin enjekte edilen fareler, yeni nesneyi keşfetmek için tanıdık olandan daha fazla zaman harcarken, antikolinerjik ajan olan skopolaminin eğitim aşamasından önce enjekte edilmesi farelerin yeni nesneyi keşfetmek için harcadıkları zamanın azalmasına, bellek performansının bozulmasına sebep olduğu rapor edilmiştir (Kruk-Słomka ve ark., 2014). Nitekim sülfitin de antikolinerjik olarak davranabileceği yapılan önceki çalışmalarda vurgulanmıştır (Sun ve ark., 1995). Bizim verilerimiz de sülfitin bu etkisinden dolayı kolinerjik sistemin nesne tanıma belleğinde rol oynadığını gösteren literatür bilgilerini destekler niteliktedir.

Nöronal aktivite sonucu sinaptik bağlantıdaki değişiklikler öğrenme ve hafızanın temelini oluşturur (Bliss ve Lomo, 1973). Sinaptik etkinlikteki değişikliği ifade eden sinaptik plastisite, presinaptik liflerin tekrar tekrar uyarılmasıyla oluşur (Bliss ve Lomo, 1973). Plastisitedeki uzun süreli artışı modelleme yöntemlerinden biri uzun süreli güçlenme kayıtlarıdır (Bliss ve Lomo, 1973). Bliss ve Lomo'nun (Bliss ve Lomo, 1973) yapmış oldukları çalışmada, iki bağımsız mekanizmanın uzun süreli güçlenmeden sorumlu olabileceğini göstermişlerdir. Bu mekanizmalar perforant yol sinapslarındaki sinaptik iletimin etkinliğindeki artış ya da granül hücre popülasyonunun uyarılabilirliğindeki artış olabilir. Bu sebeple sülfid ve öğrenme

ilişkisinin hipokampusun perforant yol-dentat girus sinapslarındaki elektrofizyolojik parametrelere etkisi LTP kayıtları ile EPSP eğimi ve PS genliği ölçülerek değerlendirilmiştir. EPSP, afferent liflerden gelen aksiyon potansiyeli oluşturmamaya yetecek sinyallerin postsinaptik nöronlarda oluşturduğu geçici depolarizasyonun yanıtıdır (Bliss ve Lomo, 1973). Eğer gelen sinyaller nöron tarafından entegre edilerek eşik değeri aşarsa aksiyon potansiyeli oluşturur ve aksiyon potansiyellerinin toplanmış hali PS olarak kaydedilir. Bu iki bileşen, hücrenin uyarılabilirliği ve aksiyon potansiyeli oluşturan nöron popülasyonu hakkında bilgi verir (Bliss ve Lomo, 1973). Aksiyon potansiyeli oluşturan nöron sayısı arttıkça PS genliği artar (Bliss ve Lomo, 1973). Çalışmamızda kaydedilen alan potansiyellerinden, PS bileşeni genliğinin değişimi yüksek frekanslı uyarıdan sonraki 60 dakikalık süre boyunca her iki sülfid grubunda da daha düşük olup, benzer şekilde EPSP bileşeninin eğiminin değişimi de sülfid verilen gruplarda azalmıştır. Bu bulgular, yüksek miktarda sülfid maruziyetinde dentat girusta aferent uyarımla innerve edilen nöronların elektrofizyolojik özelliklerinin ve bu popülasyondaki eşik değere ulaşarak aksiyon potansiyeli oluşturan nöron sayısının azaldığını göstermektedir. Nitekim Akdoğan ve ark. (Akdoğan ve ark. 2011) sülfid maruziyetinin hipokampusun CA1, CA2 ve CA3 bölgelerinde piramidal nöron kaybına yol açtığını rapor etmişlerdir. Bunun yanı sıra, nöronlardaki birçok hücresel sürecin pH'daki değişikliklerle kontrol edildiği bilinmektedir (Busa ve Nuccitelli, 1984). Nitekim, sülfid ajanlarının hücre pH'sını düşürdüğü rapor edilmiştir (Aronstam ve ark., 1978). Uyarılabilir hücrelerde pH'daki değişiklikler membran iyon kanallarını etkileyerek elektriksel aktiviteyi yani hücrenin uyarılabilirliğini değiştirebilir (Zuazaga ve ark., 1984). Ayrıca, proteinlerdeki sülfidril gruplarının blokajının ve disülfid bağlarının hasarının membran permabilitesini etkilediği, uyarılabilirliği azalttığı ve membran dinlenme potansiyelini düşürdüğü bildirilmiştir (Zuazaga ve ark., 1984). Birçok araştırmacı tarafından $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ gibi gıda indirgeyici ajanların proteinlerdeki disülfid bağlarını kırdığı gösterilmiştir (Rojas ve ark. 1990). Sülfid iyonlarının disülfid bağları ile reaksiyona girdiği ve membran proteinlerinin fonksiyonel özelliklerini bozduğu tespit edilmiştir (Zuazaga ve ark., 1984). Dolayısıyla, sülfid toksisitesinin nöronların uyarılabilirliklerini değiştirme potansiyeli yüksektir. Yapılan literatür taramasında oksidatif stresin sinaptik plastisiteyi etkileyebileceği ve LTP indüksiyonunun azalmasına neden olabileceği görülmüştür

(Komaki ve ark., 2019). Oksidatif stresin bilişsel hasarda önemli rolü olduğu (Omidi ve ark., 2020) ve Alzheimer hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıklara sebep olabileceği bildirilmiştir (Rosini ve ark., 2014). Bazı araştırmalarda, oksidatif stresin hafıza hasarının etiyolojisi ile ilişkili beyin bölgelerinde nöral hasara neden olduğu rapor edilmiştir (Urán ve ark., 2010; Basaranlar ve ark., 2019). Ekibimiz tarafından yapılan çalışmada, sülfitin hipokampusta lipid peroksidasyon birikiminden kaynaklanan oksidatif stresi arttırdığı ve apoptotik hücre ölümlerine yol açtığı gösterilmiştir (Başaranlar ve ark. 2019). Ayrıca daha önceki çalışmalarımızda öğrenmenin temelini oluşturan LTP’de rol alan CaMKII ve pCaMKII düzeylerinin sülfitin toksik etkilerine bağlı olarak azaldığı tespit edilmiştir. CaMKII ve pCaMKII’da görülen paternle benzer olarak öğrenme sürecinde rol alan CREB düzeyinin de azaldığı tespit edilmiştir (Proje tamamlandı, henüz yayın aşamasında). Yeni AMPA reseptörlerin ve dentritik spinlerin oluşmasında rol alan bu döngüdeki protein düzeylerinin azalmasının sülfitin yaratmış olduğu toksik etkiden kaynaklandığı düşünülmektedir. Mevcut çalışmamızda LTP kaydı ile elde ettiğimiz alan potansiyelinde meydana gelen değişiklikler, sülfitin neden olduğu nöron popülasyonu sayısındaki azalma, pH değişiklikleri ve oksidatif stres aracılığıyla ortaya çıkan nöron kaybıyla ilişkili olduğu şeklinde değerlendirilmiştir.

LTP’de gözlenen bu bozukluklara ek olarak hipokampal dokuda öğrenme için biyobelirteç olarak değerlendirilen Arc ve sinapsin 1 proteinlerinin ekspresyonlarına bakılmıştır. Arc proteininin, hipokampal LTP ve uzun süreli bellek oluşumu için gerekli olduğu gösterilmiştir (Guzowski ve ark., 2000). Yapılan literatür taramasında, Arc antisens oligodeoksinükleotidlerin dorsal hipokampusa infüzyonunun sıçanlarda öğrenme performansını bozduğu gösterilmiş olup, Arc geni susturulmuş farelerin, uzaysal hafıza, korku ya da tat hafızalarının gelişmediği rapor edilmiştir (Guzowski ve ark., 2000, Zhu ve ark. 2018; Jones ve diğerleri, 2001). LTP gibi sinaptik plastisite kontrolüne katkı sağlayan ERK (extracellular-signal-regulated kinase) yolağının inhibe edilmesi, Arc mRNA’nın medial perforant yol ve granül hücreler üzerindeki sinapslarda ekspresyonunu bloke etmiştir (Waung ve ark., 2008). Arc, sinaptik plastisite oluşumunun bir göstergesi olarak kabul edilirken, vezikül dönüşümü ve nörotransmitter salınımı ile ilgili olan sinapsin 1, sinaptik bir belirteç olarak kabul edilir (Guzowski ve ark., 2000; Biederer ve Scheiffele, 2007). Sıçan hipokampusunda perforant yolağın yüksek frekanslı uyarılmasının ardından dentat

girustan elde edilen EPSP eğimlerinin ve PS genliklerinin artışıyla birlikte, immünohistokimyasal olarak incelenen dentat girus moleküler tabakada önemli ölçüde sinapsin I ve Arc mRNA ile Arc protein ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (Sato ve ark., 2000). Buradaki sinapsin 1 seviyesindeki artış sinaptik bağlantı sayısındaki artış olarak ifade edilmiştir (Sato ve ark., 2000). Çalışmamızda sülfite uygulanan gruplarda Arc ve sinapsin I seviyelerinin azaldığı rapor edilmiştir. EPSP eğimlerinin ve PS genliklerindeki azalışın Arc ve sinapsin 1 proteinlerinin azalışı ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür.

Öğrenme ve hafıza oluşumunda kilit rol oynayan hipokampusun yoğun kolinerjik innervasyon aldığı ve bu kolinerjik innervasyonun doğrudan hafıza konsolidasyon süreçleriyle ilişkili olduğu bilinmektedir (Orta-Salazar ve ark., 2014). Çalışmamızda sülfite bağlı olarak değişen cevapların kolinerjik sistem ile ilişkisini aydınlatabilmek için hipokampal ACh seviyesi, ChAT ve AChE enzimlerinin aktiviteleri değerlendirilmiştir. Çalışmamızda, sülfite uygulanan gruplarda ACh seviyesi ve ChAT enzim aktivitesi artmış, buna karşılık AChE enzim aktivitesi azalmıştır. Dolayısıyla sülfite verilen sıçanlarda ACh düzeyindeki artış, sentezinin artması fakat yıkımın azalması nedeniyle beklenen bir sonuçtur. Öte yandan, nöromusküler kavşaktaki disülfite bağlarının sülfitler tarafından sülfonasyonunun, presinaptik zar proteini aracılığıyla kurbağa pectoral kasında kendiliğinden ACh salınımını arttırdığı rapor edilmiştir (Steinacker, 1982). Bunun yanı sıra, yüksek $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ konsantrasyonlarında, ACh neden olduğu hava yolu düz kas kontraksiyonunun inhibe olduğu, bu durumun $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ACh reseptörleriyle doğrudan veya dolaylı olarak kompetitif antagonistik etkisiyle ilişkili olabileceği rapor edilmiştir (Sun ve ark., 1995). Artan ACh miktarı ile orantılı olarak postsinaptik hücrede cevap oluşturup oluşturmadığı ayrıntılı olarak incelenmelidir, çünkü akciğerde görülen sülfitin ACh reseptörleri üzerindeki kompetitif antagonistik etkinin hipokampusta olup olmadığı, sinaptik aralıkta artan ACh miktarının reseptörleri üzerinden farklı sinyal mekanizmalarını tetikleyip tetiklemediğinin araştırılması gerekmektedir. ACh reseptörünün alfa alt birimindeki ligand bağlama bölgesinin yakınındaki sisteinil kalıntıları arasında disülfite bağları mevcuttur (Kao ve Karlin, 1986). ACh reseptörlerinin, diğer birçok reseptör ve kanal proteini gibi, agonist bağlandığında fonksiyonel ve konformasyonel değişim için intramoleküler hareketliliği sağlayan disülfür bağlarını içerdiği bilinmektedir (Malbon ve ark., 1987). Nöromusküler

kavşaktaki ACh reseptörlerinin işlevsel fonksiyonunda disülfür bağlarının önemini gösteren bir çalışmada, bu bağların kanal geçişi ve iletkenliği üzerindeki rolü araştırılmış, disülfür bağına hasarlayan ajanların, asetilkolin reseptörünün iletkenliğini azalttığı belirtilmiştir (Rojas ve ark., 1991). Literatür bilgileri ışığında verilerimiz değerlendirildiğinde, sülfid verilen sıçanlarda disülfid bağlarının bozulması, ACh reseptörlerinin fonksiyonunun bozulmasına aracılık edebileceğinden dolayı ACh etki mekanizmasını engelleyebilir ve öğrenmenin bozulmasına aracılık edebilir.

Çalışmamızda sülfid uygulanan sıçanların hipokampuslarında ACh üretilmesinde kilit rol oynayan ve kolinerjik inervasyon için spesifik bir belirteç olan ChAT enziminin aktivitesinin arttığını gözlemledik. ChAT aktivasyonu nörotrofik faktörler ve nöron yaşamının devamlılığı gibi çeşitli koşullar altında gözlemlense de (Cavicchioli ve ark., 1991; Wu ve Hersh, 1994), fosforilasyon ve proteoliz gibi diğer modifikasyonların da enzim aktivitesini düzenlediği gösterilmiştir (Bruce ve Hersh, 1989; Wu ve Hersh, 1994). Nörotoksik etkileri bilinen sarinin ChAT aktivitesini korteks, beyinsapı ve ortabeyinde arttırdığı bildirilmiştir (Khan ve ark., 2000). Bir başka nörotoksisite çalışmasında ise toksik ajanın fare omurilik hücre kültüründe ChAT etkinliğinin artışına neden olduğu ve merkezi sinir sistemindeki nöronların ölümünden sorumlu nöropati ile ilişkili olabileceği varsayılmıştır (Giller ve ark., 1977). Ayrıca kolinerjik stimülasyonun, aktiviteye bağlı sinaps kaybına yol açan proteaz aktivasyonuna neden olduğu gösterilmiştir (Liu ve ark., 2019). Bu sebeple ChAT aktivitesinin artması, enzimin proteolitik bölünmesinden kaynaklı olabilir. Protein fosfatazlar ve kinazlar, transkripsiyonel seviyede ChAT geninin ekspresyonunu düzenleyebilir. Inoue ve ark.'ları (Inoue ve ark., 1995) PKA aktivitesinin azaldığı bir PC12 hücre hattı mutantında, transkripsiyonel seviyede ChAT geninin ekspresyonunun büyük ölçüde azaldığını göstermişlerdir. Önceki çalışmalarımızda sülfid maruziyetine bağlı olarak PKA aktivitesinde artış olduğu görülmüştür (Proje tamamlandı, henüz yayın aşamasında). ChAT aktivitesindeki artışın bir diğer sebebinin PKA aktivitesindeki artış olabileceği düşünülmüştür.

AChE, ACh'yi kolinerjik sinapslarda ve nöromusküler kavşakta hızla hidrolize eden enzimdir. AChE, beyin fonksiyonu, gelişimi, nörit büyümesi, nöronal sağkalım ve Ca^{+2} seviyesinin düzenlenmesinde son derece önemlidir (Singh ve ark., 2017).

Dünya genelinde insan sağlığı için ekolojik bir çevre problemi olan böcek ilaçlarının neden olduğu toksisitenin olası mekanizmalarından birinin, AChE'nin inhibe olması sonucu sinaptik aralıkta artan ACh seviyesinin yol açtığı kolinerjik stres olabileceği bildirilmiştir (Singh ve ark., 2017). AChE inhibisyonuna yol açan ajanların aynı zamanda oksidatif dengede bozulmaya sebep olduğu, ayrıca süperoksit dismutaz ve katalaz gibi antioksidan enzimlerde de azalmaya yol açtığı bildirilmiştir (Singh ve ark., 2017). Antioksidan sistem, oksijen toksisitesine karşı ilk savunmayı sağlar. Süperoksit dismutaz aktivitesi ile H_2O_2 oluşum hızı ve H_2O_2 'nin katalaz tarafından uzaklaştırılma hızı arasında hassas bir denge vardır. H_2O_2 'yi ortadan kaldıracı başlıca antioksidan enzimler arasında katalaz, glutatyon peroksidaz ve peroksiredoksinler bulunur (Phaniendra ve ark., 2015). Bu yolaktaki herhangi bir bozulma, diğer enzimlerin aktivitelerini etkileyebilir. Nitekim H_2O_2 'nin beyin nörotoksitesine etkisinin AChE'nin aktivitesini inhibe etmesiyle ilişkili olduğu gösterilmiştir (Tsakiris ve ark., 2000). Nörotoksik ajan verilen sıçanların beyin dokularında lipit peroksidasyon seviyelerinde artış, AChE miktarında azalış, protein sülfhidril ve antioksidan savunma sistemi aktivitesinde (katalaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon S-transferaz, süperoksit dismutaz, glutatyon) düşüş bulunmuştur (Guesmi ve ark., 2018). Ekibimiz tarafından gerçekleştirilen çalışmada, sülfite maruz kalan sıçanların beyin glutatyon peroksidaz aktivitesinin belirgin azaldığı ve TBARS seviyesindeki artışa bağlı olarak oksidatif hasar olduğu rapor edilmiştir (Derin ve ark., 2006). Serbest radikallerin biyolojik makromoleküllerde hasara neden olduğu ve dolayısıyla hücrel işlevlerin kaybına yol açtığı bilinmektedir. Sülfite maruziyetinin antioksidan kapasiteyi değiştirdiği göz önüne alındığında, sülfitin neden olduğu oksidatif stresin AChE inhibitörü olarak rol oynayabileceği düşünülebilir. Başka bir çalışmada ise AChE inhibitörüne maruz bırakılan sıçanların hipokampus dokuları morfolojik olarak incelendiğinde dentat girus ve CA bölgelerinde gliosis, nekrotik nöronlar meydana geldiği, ayrıca AChE miktarının, septal çekirdeklerde, dentat girus moleküler tabakada, CA4'te ciddi şekilde azaldığı tespit edilmiştir (Veronesi ve ark., 1990). Kolinesteraz inhibisyonunun ACh hiperstimülasyonuna sebep olabileceği ve uzun süreli AChE inhibisyonunun kolinerjik septal afferentlerde kalıcı bir depolarizasyon oluşturarak metabolik tükenme, ardından dentat girus, CA4 ve CA3 içindeki hedef nöronların dejenerasyonuna neden olabileceği sonucuna ulaşılmıştır (Zhang ve ark., 2002).

Potasyum metabisülfat, metil paraben, sakarin, benzoik asit, bakır karbonat ve sorbik asit gibi gıda koruyucularının serum AChE aktivitesinde önemli değişikliğe sebep olduğu ve gıda maddelerindeki bu koruyucuların insan sağlığı açısından zararlı olabileceği bildirilmiştir (Shad ve ark., 2012). Sakarin, benzoik asit, salisilik asit, bakır karbonat ve özellikle sorbik asitin ChE aktivitesini önemli ölçüde azalttığı rapor edilmiştir (Shad ve ark., 2012). Biz de çalışmamızda literatürdeki toksisite çalışmalarına benzer şekilde AChE aktivitesinin sülfite verilen gruplarda düşüş gösterdiğini tespit ettik.



6.SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak çalışmamızda 100 ve 260 mg/kg sülfite maruziyetinin öğrenme ve hafıza bozukluklarına neden olduğu, hipokampal ACh miktarının ve AChT enzim aktivitesinin artmasının yanı sıra AChE aktivitesinin azalmasının bu sürece katkıda bulunduğu ortaya konulmuştur. Bununla birlikte, hipokampus dentat gyrusundan kaydedilen LTP'lerin sülfite maruziyetine bağlı olarak bozulduğu, LTP'deki bozulmanın sülfite alımıyla ortaya çıkan Arc ve sinapsin 1 mRNA ekspresyonlarındaki azalmayla ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Sülfite alımıyla birlikte artan ACh'nin postsinaptik hücrede bulunan reseptörleri üzerinden etki gösterip göstermediği ve sülfite ile ACh arasında kompetitif antagonistik etkinin olup olmadığının ortaya konması için, ACh reseptörlerini ve hücre içi sinyal transduksiyon yollarının incelendiği çalışmalar yapılması planlanmaktadır.

KAYNAKLAR

- Abedinzadeh Z. Sulfur-centered reactive intermediates derived from the oxidation of sulfur compounds of biological interest. *Can J Pyysiol Pharmacol*. 2001; 79 (2): 166-170.
- Akdogan I, Kocamaz E, Kucukatay V, Yonguc NG, Ozdemir MB, Murk W. Hippocampal neuron number loss in rats exposed to ingested sulfite. *Toxicol Ind Health*. 2011 Oct;27(9):771-8. doi: 10.1177/0748233710397418. Epub 2011 Apr 21.
- Albensi BC, Oliver DR, Toupin J, Odero G. Electrical stimulation protocols for hippocampal synaptic plasticity and neuronal hyper-excitability: are they effective or relevant? *Exp Neurol*. 2007;204(1):1-13. doi: 10.1016/j.expneurol.2006.12.009. Epub 2006 Dec 20.
- Alberi L, Liu S, Wang Y, Badie R, Smith-Hicks C, Wu J, Pierfelice TJ, Abazyan B, Mattson MP, Kuhl D, Pletnikov M, Worley PF, Gaiano N. Activity-induced Notch signaling in neurons requires Arc/Arg3.1 and is essential for synaptic plasticity in hippocampal networks. *Neuron*. 2011;69(3):437-44.
- Albuquerque EX, Pereira EF, Alkondon M, Schratzenholz A, Maelicke A. Nicotinic acetylcholine receptors on hippocampal neurons: distribution on the neuronal surface and modulation of receptor activity. *J Recept Signal Transduct Res*. 1997 (1-3):243-66.
- Amaral DG, Witter MP. The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience*. 1989;31(3):571-91.
- Andersen P, Bliss TV, Lomo T, Olsen LI, Skrede KK. Lamellar organization of hippocampal excitatory pathways. *Acta Physiol Scand*. 1969;76(1):4A-5A.
- Anggono V, Huganir RL. Regulation of AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Curr Opin Neurobiol*. 2012; 22(3):461-9.
- Aracri P, Consonni S, Morini R, Perrella M, Rodighiero S, Amadeo A, Becchetti A. Tonic modulation of GABA release by nicotinic acetylcholine receptors in layer V of the murine prefrontal cortex. *Cereb Cortex*. 2010;20(7):1539-55.
- Aronstam RS, Abood LG, Hoss W. Influence of sulfhydryl reagents and heavy metals on the functional state of the muscarinic acetylcholine receptor in rat brain. *Mol Pharmacol*. 1978 Jul;14(4):575-86.
- Artigas F. Serotonin receptors involved in antidepressant effects. *Pharmacol Ther*. 2013;137(1):119-31.
- Aykaç A, Süer K, Taşkıran C. Anksiyete araştırmalarında kullanılan sıçan davranış modelleri. *Marmara Medical Journal*. 2015; 28 (1): 1-7.

- Bai J, Lei P, Zhang J, Zhao C, Liang R. Sulfite exposure-induced hepatocyte death is not associated with alterations in p53 protein expression. *Toxicology*. 2013 Oct 4;312:142-8.
- Bailey S, Rapson T, Johnson-Winters K, Astashkin AV, Enemark JH, Kappler U. Molecular basis for enzymatic sulfite oxidation: how three conserved active site residues shape enzyme activity. *J Biol Chem*. 2009;284(4):2053-63.
- Baltaci SB, Mogulkoc R, Baltaci AK. Molecular Mechanisms of Early and Late LTP. *Neurochem Res*. 2019;44(2):281-296.
- Bannerman DM, Sprengel R, Sanderson DJ, McHugh SB, Rawlins JN, Monyer H, Seeburg PH. Hippocampal synaptic plasticity, spatial memory and anxiety. *Nat Rev Neurosci*. 2014;15(3):181-92.
- Barker GR, Warburton EC. When is the hippocampus involved in recognition memory?. *J Neurosci*. 2011;31(29):10721-10731.
- Bartsch T, Butler C. Transient amnesic syndromes. *Nat Rev Neurol*. 2013;9(2):86-97.
- Basaranlar G, Derin N, Kencebay Manas C, Tanrioer G, Aslan M. The effects of sulfite on cPLA2, caspase-3, oxidative stress and locomotor activity in rats. *Food Chem Toxicol*. 2019;123:453-458.
- Biederer T, Scheiffele P. Mixed-culture assays for analyzing neuronal synapse formation. *Nat Protoc*. 2007;2(3):670-6.
- Bliss TV, Collingridge GL. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*. 1993;361(6407):31-9.
- Bliss TV, Cooke SF. Long-term potentiation and long-term depression: a clinical perspective. *Clinics (Sao Paulo)*. 2011;66 Suppl 1(Suppl 1):3-17.
- Bliss TV, Lomo T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol*. 1973;232(2):331-56.
- Blitzer RD, Gil O, Landau EM. Cholinergic stimulation enhances long-term potentiation in the CA1 region of rat hippocampus. *Neurosci Lett*. 1990 13;119(2):207-10.
- Bramham CR, Messaoudi E. BDNF function in adult synaptic plasticity: the synaptic consolidation hypothesis. *Prog Neurobiol*. 2005;76(2):99-125.
- Bruce G, Hersh LB. The phosphorylation of choline acetyltransferase. *Neurochem Res*. 1989;14(7):613-20.

Burgdorf J, Zhang XL, Nicholson KL, Balster RL, Leander JD, Stanton PK, Gross AL, Kroes RA, Moskal JR. GLYX-13, a NMDA receptor glycine-site functional partial agonist, induces antidepressant-like effects without ketamine-like side effects. *Neuropsychopharmacology*. 2013;38(5):729-42.

Busa WB, Nuccitelli R. Metabolic regulation via intracellular pH. *Am J Physiol*. 1984;246(4 Pt 2):R409-38.

Cajal S. R. *Histologie du système nerveux de l'homme et des vertébrés*. Maloine (Paris). 1911; 2: 891-942.

Cavuş I, Teyler T. Two forms of long-term potentiation in area CA1 activate different signal transduction cascades. *J Neurophysiol*. 1996 Nov;76(5):3038-47.

Cavicchioli L, Flanigan TP, Dickson JG, Vantini G, Dal Toso R, Fusco M, Walsh FS, Leon A. Choline acetyltransferase messenger RNA expression in developing and adult rat brain: regulation by nerve growth factor. *Brain Res Mol Brain Res*. 1991 Mar;9(4):319-25.

Cesca F, Baldelli P, Valtorta F, Benfenati F. The synapsins: Key actors of synapse function and plasticity. *Prog Neurobiol*. 2010; 91 (4): 313-348.

Chowdhury S, Shepherd JD, Okuno H, Lyford G, Petralia RS, Plath N, Kuhl D, Huganir RL, Worley PF. Arc/Arg3.1 interacts with the endocytic machinery to regulate AMPA receptor trafficking. *Neuron*. 2006 Nov 9;52(3):445-59.

Cohen HJ, Drew RT, Johnson JL, Rajagopalan KV. Molecular basis of the biological function of molybdenum: the relationship between sulfite oxidase and the acute toxicity of bisulfite and SO₂. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1973 Dec;70(12):3655-9.

Coleman WL, Bykhovskaia M. Synapsin I accelerates the kinetics of neurotransmitter release in mouse motor terminals. *Synapse*. 2009 Jun;63(6):531-3.

Colgin LL, Moser EI. Gamma oscillations in the hippocampus. *Physiology*. 2010;25(5):319-29.

Daberkow DP, Riedy MD, Kesner RP, Keefe KA. Arc mRNA induction in striatal efferent neurons associated with response learning. *Eur J Neurosci*. 2007;26(1):228-41.

Dalton-Bunnaw MF. Review of sulfite sensitivity. *Am J Hosp Pharm*. 1985;42(10):2220-6.

Dasari S, Gullledge AT. M1 and M4 receptors modulate hippocampal pyramidal neurons. *J Neurophysiol*. 2011;105(2):779-92.

Davidson M. Thiamin deficiency in a colony of cats. *Vet Record*. 1992; 130 (5): 94-97.

Davies P, Maloney A. Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *The Lancet*. 1976; 308 (8000): 1403.

Day J, Damsma G, Fibiger H. C. Cholinergic activity in the rat hippocampus, cortex and striatum correlates with locomotor activity: An in vivo microdialysis study. *Pharmacol Biochem and Behav* 1991; 38 (4): 723-729.

De Camilli P, Cameron R, Greengard P. Synapsin I (protein I), a nerve terminal-specific phosphoprotein. I. Its general distribution in synapses of the central and peripheral nervous system demonstrated by immunofluorescence in frozen and plastic sections. *J Cell Biol*. 1983; 96 (5): 1337-1354.

Deák F, Xu Y, Chang WP, Dulubova I, Khvotchev M, Liu X, Südhof TC, Rizo J. Munc18-1 binding to the neuronal SNARE complex controls synaptic vesicle priming. *J Cell Biol*. 2009;184(5):751-64.

Derin N, Yargıçoğlu P, Aslan M, Elmas O, Agar A, Aicigüzel Y. The effect of sulfite and chronic restraint stress on brain lipid peroxidation and anti-oxidant enzyme activities. *Toxicol Ind Health*. 2006;22(6):233-40.

Demiralp T., Sinir Sisteminin Genel Organizasyonu. Ağar E. (Ed.), İnsan Fizyolojisi. Türk Fizyolojik Derneği; 2020, p: 523-561

Disney AA, Domakonda KV, Aoki C. Differential expression of muscarinic acetylcholine receptors across excitatory and inhibitory cells in visual cortical areas V1 and V2 of the macaque monkey. *J Comp Neurol*. 2006 Nov 1;499(1):49-63.

Dutar P., Bassant M.-H., Senut M.-C., Lamour Y. The septohippocampal pathway: Structure and function of a central cholinergic system. *Physiol. Rev*. 1995; 75 (2): 393-427.

EFSA. Scientific opinion on the re-evaluation of sulfur dioxide (E 220), sodium sulfite (E 221), sodium bisulfite (E 222), sodium metabisulfite (E 223), potassium metabisulfite (E 224), calcium sulfite (E 226), calcium bisulfite (E 227) and potassium bisulfite (E 228) as food additives. *EFSA Journal*. 2016; 14 (4): 4438.

El Kadi F. Z., Bénali A. I., Bénali M., Belbraouet, S. Effect of sodium metabisulphite on blood metabolic status of wistar rats. *Food Nutr Sci*. 2014; 2014.

Ercan S, Basaranlar G, Gungor NE, Kencebay C, Sahin P, Celik-Ozenci C, Derin N. Ghrelin inhibits sodium metabisulfite induced oxidative stress and apoptosis in rat gastric mucosa. *Food Chem Toxicol*. 2013;56:154-61.

Fan A., Book S. Sulfite hypersensitivity: A review of current issues. *J App Nutr*. 1987; 39 (2): 71-78.

Ferreira A., Chin L.-S., Li L., Lanier L. M., Kosik K. S., Greengard P. Distinct roles of synapsin I and synapsin II during neuronal development. *Mol. Med.* 1998; 4 (1): 22-28.

Ferreira A, Kao HT, Feng J, Rapoport M, Greengard P. Synapsin III: developmental expression, subcellular localization, and role in axon formation. *J Neurosci.* 2000 May 15;20(10):3736-44.

Ferreira A, Rapoport M. The synapsins: beyond the regulation of neurotransmitter release. *Cell Mol Life Sci.* 2002 Apr;59(4):589-95.

Frey U, Huang YY, Kandel ER. Effects of cAMP simulate a late stage of LTP in hippocampal CA1 neurons. *Science.* 1993 Jun 11;260(5114):1661-4.

Fridovich I, Handler P. Detection of free radicals generated during enzymic oxidations by the initiation of sulfite oxidation. *J Biol Chem.* 1961; 236 (6): 1836-1840.

Gil Bea F. J., Sola M., Mateos L., Winblad B., Ramírez M. J., & Cedazo-Mínguez, A. Cholinergic hypofunction impairs memory acquisition possibly through hippocampal Arc and BDNF downregulation. *Hippocampus.* 2011; 21 (9): 999-1009.

Giller E., Neale J., Bullock P., Schrier B., Nelson P. Choline acetyltransferase activity of spinal cord cell cultures increased by co-culture with muscle and by muscle-conditioned medium. *J. Cell Biol.* 1977; 74 (1): 16-29.

Gitler D, Cheng Q, Greengard P, Augustine G. J. Synapsin IIa controls the reserve pool of glutamatergic synaptic vesicles. *J Neurosci.* 2008; 28 (43): 10835-10843.

Goelz SE, Nestler EJ, Chehraz B, Greengard P. Distribution of protein I in mammalian brain as determined by a detergent-based radioimmunoassay. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1981;78(4):2130-4.

Gold CA, Budson AE. Memory loss in Alzheimer's disease: implications for development of therapeutics. *Expert Rev Neurother.* 2008 Dec;8(12):1879-91.

Greengard P, Valtorta F, Czernik AJ, Benfenati F. Synaptic vesicle phosphoproteins and regulation of synaptic function. *Science.* 1993; 5;259(5096):780-5.

Grothe M, Zaborszky L, Atienza M, Gil-Neciga E, Rodriguez-Romero R, Teipel SJ, Amunts K, Suarez-Gonzalez A, Cantero JL. Reduction of basal forebrain cholinergic system parallels cognitive impairment in patients at high risk of developing Alzheimer's disease. *Cereb Cortex.* 2010;20(7):1685-95.

Guesmi F, Bellamine H, Landoulsi A. Hydrogen peroxide-induced oxidative stress, acetylcholinesterase inhibition, and mediated brain injury attenuated by Thymus algeriensis. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2018;43(12):1275-1281.

Gunnison AF. Sulphite toxicity: a critical review of in vitro and in vivo data. *Food Cosmet Toxicol.* 1981;19(5):667-82.

Gunnison AF, Palmes ED. Species variability in plasma S-sulfonate levels during and following sulfite administration. *Chem Biol Interact.* 1978;21(2-3):315-29.

Guzowski JF, Lyford GL, Stevenson GD, Houston FP, McGaugh JL, Worley PF, Barnes CA. Inhibition of activity-dependent arc protein expression in the rat hippocampus impairs the maintenance of long-term potentiation and the consolidation of long-term memory. *J Neurosci.* 2000;1;20(11):3993-4001.

Guzowski JF, McNaughton BL, Barnes CA, Worley PF. Environment-specific expression of the immediate-early gene Arc in hippocampal neuronal ensembles. *Nat Neurosci.* 1999;2(12):1120-1124.

Guzowski JF, Setlow B, Wagner EK, McGaugh JL. Experience-dependent gene expression in the rat hippocampus after spatial learning: a comparison of the immediate-early genes Arc, c-fos, and zif268. *J Neurosci.* 2001;21(14):5089-5098.

Güneş FE. Sülfidler ve gıda katkı maddesi olarak kullanılması. *Academic Food Journal.* 2014; 12 (2): 114-119.

Haga T, Noda H. Choline uptake systems of rat brain synaptosomes. *Biochim Biophys Acta.* 1973;26;291(2):564-75.

Han HQ, Nichols RA, Rubin MR, Bähler M, Greengard P. Induction of formation of presynaptic terminals in neuroblastoma cells by synapsin IIb. *Nature.* 1991;349(6311):697-700.

Harraan D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol.* 1956;11(3):298-300.

Hasselmo ME. The role of acetylcholine in learning and memory. *Curr Opin Neurobiol.* 2006;16(6):710-5.

Hebb D. O. The organization of behavior: A neuropsychological theory: J. Wiley; Chapman Hall; 1949

Hebert AE, Dash PK. Nonredundant roles for hippocampal and entorhinal cortical plasticity in spatial memory storage. *Pharmacol Biochem Behav.* 2004;79(1):143-53.

Huttner WB, Schiebler W, Greengard P, De Camilli P. Synapsin I (protein I), a nerve terminal-specific phosphoprotein. III. Its association with synaptic vesicles studied in a highly purified synaptic vesicle preparation. *J Cell Biol.* 1983;96(5):1374-88.

İlcol Ozarda Y, Uncu G, Ulus IH. Free and phospholipid-bound choline concentrations in serum during pregnancy, after delivery and in newborns. *Arch Physiol Biochem.* 2002;110(5):393-9.

Inoue H, Li YP, Wagner JA, Hersh LB. Expression of the choline acetyltransferase gene depends on protein kinase A activity. *J Neurochem.* 1995 Mar;64(3):985-90.

Joint, F. A. O., WHO Expert Committee on Food Additives, and World Health Organization (JECFA). Evaluation of certain food additives and contaminants: thirty-third report of the Joint FAO. World Health Organization, 1989.

Johnson Eric. A. A study of the effects of immersion on short-term spatial memory. Purdue University Graduate School, Collage of Technology Masters Thesis, 2010.

Joint F., Additives, W. E. C. o. F., Organization, W. H. Toxicological evaluation of certain food additives with a review of general principles and of specifications: Seventeenth report of the joint FAO/WHO expert committee on food additives, geneva, 25 june-4 july 1973. 1974.

Jovanovic JN, Czernik AJ, Fienberg AA, Greengard P, Sihra TS. Synapsins as mediators of BDNF-enhanced neurotransmitter release. *Nat Neurosci.* 2000;3(4):323-329.

Kandel E., Spencer, W. Electrophysiology of hippocampal neurons: II. After-potentials and repetitive firing. *J. Neurophysiol.* 1961; 24 (3): 243-259.

Kandel E, Siegelbaum AS. Cellular Mechanisms of Implicit Memory Storage and Biological Basis of Individuality. Eric K. Schwartz J, Jessell TM, Siegelbaum SA, Hudspeth AJ (Ed). *Principles of Neural Science*, 5th ed. McGraw-Hill Companies, New York, 2013; p: 1462-1476

Kandel E. R., Markram H., Matthews P. M., Yuste, R., Koch, C. Neuroscience thinks big (and collaboratively). *Nature reviews. Neuroscience.* 2013; 14 (9): 659-664.

Kanıt L., Sinir Sistemi Üst Düzey Fonksiyonları. Ağar E. (Ed.), *İnsan Fizyolojisi. Türk Fizyolojik Derneği.* 2020; p: 607-622

Kao HT, Li P, Chao HM, Janoschka S, Pham K, Feng J, Mcewen BS, Greengard P, Pieribone VA, Porton B. Early involvement of synapsin III in neural progenitor cell development in the adult hippocampus. *J Comp Neurol.* 2008;20;507(6):1860-70.

Kao PN, Karlin A. Acetylcholine receptor binding site contains a disulfide cross-link between adjacent half-cystinyl residues. *J Biol Chem.* 1986;25;261(18):8085-8.

Karson A., Onat F., Balcı F., Ateş N. Absans epilepsili WAG/Rij sıçanlarda lokomotor aktivite, öğrenme ve bellek. *Epilepsi Dergisi.* 2008; 14 (3): 167-175.

Kencebay C, Derin N, Ozsoy O, Kipmen-Korgun D, Tanriover G, Ozturk N, Basaranlar G, Yargicoglu-Akkiraz P, Sozen B, Agar A. Merit of quinacrine in the decrease of ingested sulfite-induced toxic action in rat brain. *Food Chem Toxicol.* 2013;52:129-36.

Kencebay C. Farklı Dozlarda Diyetle Alınan Sodyum Metabisülfitin Öğrenme Üzerine Etkilerinde Glutamatın Rolü. A.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 2017, Antalya (Danışman: Prof. Dr. N Derin).

Khan WA, Dechkovskaia AM, Herrick EA, Jones KH, Abou-Donia MB. Acute sarin exposure causes differential regulation of choline acetyltransferase, acetylcholinesterase, and acetylcholine receptors in the central nervous system of the rat. *Toxicol Sci.* 2000;57(1):112-20.

Kojima J, Onodera K. NIK-247 induces long-term potentiation of synaptic transmission in the CA1 region of rat hippocampal slices through M2 muscarinic receptors. *Gen Pharmacol.* 1998;31(2):297-300.

Komaki H, Faraji N, Komaki A, Shahidi S, Etaee F, Raoufi S, Mirzaei F. Investigation of protective effects of coenzyme Q10 on impaired synaptic plasticity in a male rat model of Alzheimer's disease. *Brain Res Bull.* 2019;147:14-21.

Korb E, Finkbeiner S. Arc in synaptic plasticity: from gene to behavior. *Trends Neurosci.* 2011;34(11):591-598.

Kruk-Słomka M, Michalak A, Budzyńska B, Biała G. A comparison of mecamylamine and bupropion effects on memory-related responses induced by nicotine and scopolamine in the novel object recognition test in mice. *Pharmacol Rep.* 2014;66(4):638-46.

Kucukatay V, Bor-Kucukatay M, Atsak P, Açar A. Effect of ingested sulfite on hippocampus antioxidant enzyme activities in sulfite oxidase competent and deficient rats. *Int J Neurosci.* 2007;117(7):971-983.

Kushner SA, Elgersma Y, Murphy GG, Jaarsma D, van Woerden GM, Hojjati MR, Cui Y, LeBoutillier JC, Marrone DF, Choi ES, De Zeeuw CI, Petit TL, Pozzo-Miller L, Silva AJ. Modulation of presynaptic plasticity and learning by the H-ras/extracellular signal-regulated kinase/synapsin I signaling pathway. *J Neurosci.* 2005;19;25(42):9721-34.

Maqsood S, Benjakul S, Shahidi F. Emerging role of phenolic compounds as natural food additives in fish and fish products. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2013;53(2):162-179.

Law CSH, Leung LS. Long-term potentiation and excitability in the hippocampus are modulated differently by θ Rhythm. *eNeuro.* 2018;5(6):ENEURO.0236-18.2018.

Lehéricy S, Hirsch EC, Cervera-Piérot P, Hersh LB, Bakchine S, Piette F, Duyckaerts C, Hauw JJ, Javoy-Agid F, Agid Y. Heterogeneity and selectivity of the degeneration of cholinergic neurons in the basal forebrain of patients with Alzheimer's disease. *J Comp Neurol.* 1993;1;330(1):15-31.

Lester MR. Sulfite sensitivity: significance in human health. *J Am Coll Nutr.* 1995;14(3):229-232.

Li L, Chin LS, Shupliakov O, Brodin L, Sihra TS, Hvalby O, Jensen V, Zheng D, McNamara JO, Greengard P, et al. Impairment of synaptic vesicle clustering and of synaptic transmission, and increased seizure propensity, in synapsin I-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;26;92(20):9235-9.

Link W, Konietzko U, Kauselmann G, Krug M, Schwanke B, Frey U, Kuhl D. Somatodendritic expression of an immediate early gene is regulated by synaptic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;6;92(12):5734-8.

Lisman JE, Jensen O. The θ - γ neural code. *Neuron*. 2013;77(6):1002-1016.

Liu A, Zhang Y, Han L, He G, Xie W, Zhou Z, Jia Z. Regulation of neurotransmitter release by amyloid precursor protein through synapsin phosphorylation. *Neurochem Res*. 2019;44(3):683-691.

Llinás R, McGuinness TL, Leonard CS, Sugimori M, Greengard P. Intraterminal injection of synapsin I or calcium/calmodulin-dependent protein kinase II alters neurotransmitter release at the squid giant synapse. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985;82(9):3035-9.

Lohmann SM, Ueda T, Greengard P. Ontogeny of synaptic phosphoproteins in brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1978;75(8):4037-4041.

Lozada AF, Wang X, Goukko NV, Massey KA, Duan J, Liu Z, Berg DK. Glutamatergic synapse formation is promoted by $\alpha 7$ -containing nicotinic acetylcholine receptors. *J Neurosci*. 2012;30;32(22):7651-61.

Lyford GL, Yamagata K, Kaufmann WE, Barnes CA, Sanders LK, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Lanahan AA, Worley PF. Arc, a growth factor and activity-regulated gene, encodes a novel cytoskeleton-associated protein that is enriched in neuronal dendrites. *Neuron*. 1995;14(2):433-45.

Lynch MA, Voss KL, Rodriguez J, Bliss TV. Increase in synaptic vesicle proteins accompanies long-term potentiation in the dentate gyrus. *Neuroscience*. 1994;60(1):1-5.

Malbon C. C., George S. T., Moxham C. P. Intramolecular disulfide bridges: Avenues to receptor activation? *Trends Biochem. Sci*. 1987; 12: 172-175.

Malenka RC, Madison DV, Nicoll RA. Potentiation of synaptic transmission in the hippocampus by phorbol esters. *Nature*. 1986;321(6066):175-177.

Malenka RC, Nicoll RA. Long-term potentiation--a decade of progress?. *Science*. 1999;285(5435):1870-1874.

Martí E, Ferrer I, Blasi J. Transient increase of synapsin-I immunoreactivity in the mossy fiber layer of the hippocampus after transient forebrain ischemia in the mongolian gerbil. *Brain Res*. 1999;10;824(2):153-60.

Martyn AC, De Jaeger X, Magalhães AC, Kesarwani R, Gonçalves DF, Raulic S, Guzman MS, Jackson MF, Izquierdo I, Macdonald JF, Prado MA, Prado VF. Elimination of the vesicular acetylcholine transporter in the forebrain causes hyperactivity and deficits in spatial memory and long-term potentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;23;109(43):17651-6.

Matsuyama S, Matsumoto A, Enomoto T, Nishizaki T. Activation of nicotinic acetylcholine receptors induces long-term potentiation in vivo in the intact mouse dentate gyrus. *Eur J Neurosci*. 2000;12(10):3741-3747.

Matsuzaki M, Honkura N, Ellis-Davies GC, Kasai H. Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines. *Nature*. 2004;429(6993):761-766.

Meriney S. D., Fanselow, E. Synaptic transmission: Academic Press; 2019,

Messaoudi E, Kanhema T, Soulé J, Tiron A, Dagyte G, da Silva B, Bramham CR. Sustained Arc/Arg3.1 synthesis controls long-term potentiation consolidation through regulation of local actin polymerization in the dentate gyrus in vivo. *J Neurosci*. 2007;26;27(39):10445-55.

Miyakawa T, Yamada M, Duttaroy A, Wess J. Hyperactivity and intact hippocampus-dependent learning in mice lacking the M1 muscarinic acetylcholine receptor. *J Neurosci*. 2001;21(14):5239-5250.

Mora F, Segovia G, del Arco A. Aging, plasticity and environmental enrichment: structural changes and neurotransmitter dynamics in several areas of the brain. *Brain Res Rev*. 2007;55(1):78-88.

Moriwaki Y, Yamamoto T, Higashino K. Distribution and pathophysiologic role of molybdenum-containing enzymes. *Histol Histopathol*. 1997;12(2):513-524.

Morris R. G. Spatial localization does not require the presence of local cues. *Learning and motivation*. 1981; 12 (2): 239-260.

Morris RG, Garrud P, Rawlins JN, O'Keefe J. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature*. 1982;297(5868):681-683.

Moser E, Moser MB. Mapping your every move. *Cerebrum*. 2014 Mar 1;2014:4.

Moser MB, Rowland DC, Moser EI. Place cells, grid cells, and memory. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2015;7(2):a021808.

Mutlu O. Depresyon, anksiyete ve bellek çalışmaları ile ilişkili deney hayvanı modelleri. *Türkiye Klinikleri Pharmacology-Special Topics*. 2016; 4 (1): 48-52.

Liso Navarro AA, Sikoglu EM, Heinze CR, Rogan RC, Russell VA, King JA, Moore CM. Effect of diet on brain metabolites and behavior in spontaneously hypertensive rats. *Behav Brain Res*. 2014;15;270:240-7.

Nayak AS, Moore CI, Browning MD. Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation of the presynaptic protein synapsin I is persistently increased during long-term potentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(26):15451-15456.

Nazari M, Komaki A, Salehi I, Sarihi A, Shahidi S, Komaki H, Ganji A. Interactive effects of AM251 and baclofen on synaptic plasticity in the rat dentate gyrus. *Brain Res*. 2016 Nov 15;1651:53-60.

Netherlands H. C. Committee on updating of occupational exposure limits (OEL Limits). Sodium hydrogen sulphite. Health-based reassessment of administrative occupational exposure limits 2005.

Nguyen PV, Woo NH. Regulation of hippocampal synaptic plasticity by cyclic AMP-dependent protein kinases. *Prog Neurobiol*. 2003;71(6):401-437.

Noorafshan A, Asadi-Golshan R, Karbalay-Doust S, Abdollahifar MA, Rashidiani-Rashidabadi A. Curcumin, the main part of turmeric, prevents learning and memory changes induced by sodium metabisulfite, a preservative agent, in rats. *Exp Neurobiol*. 2013;22(1):23-30.

Nordberg A, Alafuzoff I, Winblad B. Nicotinic and muscarinic subtypes in the human brain: changes with aging and dementia. *J Neurosci Res*. 1992;31(1):103-111.

Nowak L, Bregestovski P, Ascher P, Herbet A, Prochiantz A. Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature*. 1984;307(5950):462-465.

O'Keefe J. Place units in the hippocampus of the freely moving rat. *Exp Neurol*. 1976;51(1):78-109.

Omidi G, Rezvani-Kamran A, Ganji A, Komaki S, Etaee F, Asadbegi M, Komaki A. Effects of hypericum scabrum extract on dentate gyrus synaptic plasticity in high fat diet-fed rats. *J Physiol Sci*. 2020;24;70(1):19.

Orta-Salazar E, Cuellar-Lemus CA, Díaz-Cintra S, Feria-Velasco AI. Cholinergic markers in the cortex and hippocampus of some animal species and their correlation to Alzheimer's disease. *Neurologia*. 2014;29(8):497-503.

Otto T, Eichenbaum H, Wiener SI, Wible CG. Learning-related patterns of CA1 spike trains parallel stimulation parameters optimal for inducing hippocampal long-term potentiation. *Hippocampus*. 1991;1(2):181-192.

Ough C. S., Were, L. Sulfur dioxide and sulfites. *Food Science and Technology-New Y-marcel dekker*-. 2005; 145: 143.

Ozsoy O, Hacıoglu G, Savcioglu F, Kucukatay V, Yargicoglu P, Agar A. The effect of sodium metabisulphite on active avoidance performance in hypercholesterolemic rats. *Environ Toxicol*. 2012;27(8):453-460.

Ozturk N, Yargicoglu P, Derin N, Akpinar D, Agar A, Aslan M. Dose-dependent effect of nutritional sulfite intake on visual evoked potentials and lipid peroxidation. *Neurotoxicol Teratol.* 2011;33(2):244-254.

Oztürk OH, Küçükata V, Yönden Z, Ağar A, Bağcı H, Delibaş N. Expressions of N-methyl-D-aspartate receptors NR2A and NR2B subunit proteins in normal and sulfite-oxidase deficient rat's hippocampus: effect of exogenous sulfite ingestion. *Arch Toxicol.* 2006;80(10):671-679.

Pardridge WM. Transport of nutrients and hormones through the blood-brain barrier. *Diabetologia.* 1981;20 (1):246-254.

Pardridge W. M. Transport of small molecules through the blood-brain barrier: Biology and methodology. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 1995; 15 (1-3): 5-36.

Paredes D, Rada P, Bonilla E, Gonzalez LE, Parada M, Hernandez L. Melatonin acts on the nucleus accumbens to increase acetylcholine release and modify the motor activity pattern of rats. *Brain Res.* 1999;850(1-2):14-20.

Pastalkova E, Serrano P, Pinkhasova D, Wallace E, Fenton AA, Sacktor TC. Storage of spatial information by the maintenance mechanism of LTP. *sci.* 2006;313(5790):1141-1144.

Paxinos G., Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates: Hard cover edition: Elsevier; 2006.

Peebles CL, Yoo J, Thwin MT, Palop JJ, Noebels JL, Finkbeiner S. Arc regulates spine morphology and maintains network stability in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(42):18173-18178.

Phaniendra A, Jestadi DB, Periyasamy L. Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian J Clin Biochem.* 2015;30(1):11-26.

Pintchovski S. A., Peebles C. L., Kim H. J., Verdin, E., Finkbeiner, S. The serum response factor and a putative novel transcription factor regulate expression of the immediate-early gene Arc/Arg3.1 in neurons. *J. Neurosci.* 2009; 29 (5): 1525-1537.

Plath N, Ohana O, Dammermann B, Errington ML, Schmitz D, Gross C, Mao X, Engelsberg A, Mahlke C, Welzl H, Kobalz U, Stawrakakis A, Fernandez E, Waltereit R, Bick-Sander A, Therstappen E, Cooke SF, Blanquet V, Wurst W, Salmen B, Bösl MR, Lipp HP, Grant SG, Bliss TV, Wolfer DP, Kuhl D. Arc/Arg3.1 is essential for the consolidation of synaptic plasticity and memories. *Neuron.* 2006;9;52(3):437-44.

Pavlov, Ivan Petrovich. The work of the digestive glands. Charles Griffin, 1902.

Quines CB, Rosa SG, Velasquez D, Da Rocha JT, Neto JS, Nogueira CW. Diphenyl diselenide elicits antidepressant-like activity in rats exposed to monosodium

glutamate: A contribution of serotonin uptake and Na(+), K(+)-ATPase activity. *Behav Brain Res.* 2016;301:161-167.

Ramírez-Amaya V, Vazdarjanova A, Mikhael D, Rosi S, Worley PF, Barnes CA. Spatial exploration-induced Arc mRNA and protein expression: evidence for selective, network-specific reactivation. *J Neurosci.* 2005;25(7):1761-1768.

Rao VR, Pintchovski SA, Chin J, Peebles CL, Mitra S, Finkbeiner S. AMPA receptors regulate transcription of the plasticity-related immediate-early gene Arc. *Nat Neurosci.* 2006;9(7):887-895.

Rencüzogullari E, Ila HB, Kayraldiz A, Topaktaş M. Chromosome aberrations and sister chromatid exchanges in cultured human lymphocytes treated with sodium metabisulfite, a food preservative. *Mutat Res.* 2001;490(2):107-112.

Rojas L, Zuazaga C, Steinacker A. Acetylcholine receptor channel gating and conductance involve extracellular disulfide bond(s). *Brain Res.* 1991;551(1-2):10-15.

Roozendaal B, Hernandez A, Cabrera SM, Hagewoud R, Malvaez M, Stefanko DP, Haettig J, Wood MA. Membrane-associated glucocorticoid activity is necessary for modulation of long-term memory via chromatin modification. *J Neurosci.* 2010;30(14):5037-46.

Rosini M, Simoni E, Milelli A, Minarini A, Melchiorre C. Oxidative stress in Alzheimer's disease: are we connecting the dots?. *J Med Chem.* 2014;57(7):2821-2831.

Saha RN, Wissink EM, Bailey ER, Zhao M, Fargo DC, Hwang JY, Daigle KR, Fenn JD, Adelman K, Dudek SM. Rapid activity-induced transcription of Arc and other IEGs relies on poised RNA polymerase II. *Nat Neurosci.* 2011;29;14(7):848-56.

Santos-Fandila A, Zafra-Gómez A, Barranco A, Navalón A, Rueda R, Ramírez M. Quantitative determination of neurotransmitters, metabolites and derivatives in microdialysates by UHPLC-tandem mass spectrometry. *Talanta.* 2013;114:79-89.

Sato K, Morimoto K, Suemaru S, Sato T, Yamada N. Increased synapsin I immunoreactivity during long-term potentiation in rat hippocampus. *Brain Res.* 2000;872(1-2):219-222.

Scheff SW, Roberts KN. Cognitive assessment of pycnogenol therapy following traumatic brain injury. *Neurosci Lett.* 2016;634:126-131.

Schilström B., Konradsson-Geuken Å., Ivanov V., Gertow J., Feltmann, K., Marcus, M. M. Svensson, T. H. Effects of s-citalopram, citalopram, and r-citalopram on the firing patterns of dopamine neurons in the ventral tegmental area, n-methyl-d-aspartate receptor-mediated transmission in the medial prefrontal cortex and cognitive function in the rat. *Synapse.* 2011; 65 (5): 357-367.

Schoch S., Cibelli G., Thiel G. Neuron-specific gene expression of synapsin i major role of a negative regulatory mechanism. *J. Biol. Chem.* 1996; 271 (6): 3317-3323.

Schwarz, G. Molybdenum cofactor and human disease. *Curr Opin Chem Biol.* 2016; 31: 179-187.

Shad M. A., Zafar Z. I., Nawaz, H., & Anwar, F. Effect of sorbic acid and some other food preservatives on human serum cholinesterase activity. *Afr. J. Biotechnol.* 2012; 11 (51): 11280-11286.

Shapiro R. Genetic effects of bisulfite (sulfur dioxide). *Mutat Res.* 1977;39(2):149-75.

Shute C., Lewis, P. The ascending cholinergic reticular system: Neocortical, olfactory and subcortical projections. *Brain.* 1967; 90 (3): 497-520.

Simon RA. Sulfite Sensitivity. *Ann Allergy*, 1986; 56: 281-288..

Singh K. D., Labala R. K., Devi, T. B., Singh N. I., Chanu, H. D., Sougrakpam, S. Rajashekar Y. Biochemical efficacy, molecular docking and inhibitory effect of 2, 3-dimethylmaleic anhydride on insect acetylcholinesterase. *Sci. Rep.* 2017; 7 (1): 1-11.

Squire L. R., Knowlton, B., Musen, G. The structure and organization of memory. *Annu. Rev. Psychol.* 1993; 44 (1): 453-495.

Stanton P. K., Sarvey J. M. Norepinephrine regulates long-term potentiation of both the population spike and dendritic EPSP in hippocampal dentate gyrus. *Brain Res. Bull.* 1987; 18 (1): 115-119.

Steckler T., Drinkenburg W., Sahgal A., Aggleton, J. Recognition memory in rats I. Concepts and classification. *Prog. Neurobiol.* 1998; 54 (3): 289-311.

Steinacker A. Presynaptic effects of sodium bisulfite at the frog neuromuscular junction. *J. Neurosci. Res.* 1982; 7 (3): 313-319.

Steward O., Worley P. F. A cellular mechanism for targeting newly synthesized mrnas to synaptic sites on dendrites. *PNAS.* 2001a; 98 (13): 7062-7068

Steward O., Worley, P. F. Selective targeting of newly synthesized Arc mRNA to active synapses requires nmda receptor activation. *Neuron.* 2001b; 30 (1): 227-240.

Su C, Chen K, Zou Y, Shen Y, Xia B, Liang G, Lv Y, Wang F, Huang D, Yang X. Chronic exposure to manganese sulfate leads to adverse dose-dependent effects on the neurobehavioral ability of rats. *Environ Toxicol.* 2016;31(11):1571-1579.

Sudhof TC, Czernik AJ, Kao HT, Takei K, Johnston PA, Horiuchi A, Kanazir SD, Wagner MA, Perin MS, De Camilli P, et al. Synapsins: mosaics of shared and individual domains in a family of synaptic vesicle phosphoproteins. *Science.* 1989;245(4925):1474-80.

Sudweeks SN, Yakel JL. Functional and molecular characterization of neuronal nicotinic ACh receptors in rat CA1 hippocampal neurons. *J Physiol.* 2000 ;527 Pt 3(Pt 3):515-28.

Suemaru S., Sato, K., Morimoto K., Yamada N., Sato, T., Kuroda, S. Increment of synapsin I immunoreactivity in the hippocampus of the rat kindling model of epilepsy. *Neuroreport.* 2000; 11 (6): 1319-1322.

Sun J., Sakamoto T., Chung, K. Effects of sodium metabisulphite on guinea pig contractile airway smooth muscle responses in vitro. *Thorax.* 1995; 50 (8): 875-879.

Süer C, Dolu N, Artis AS, Sahin L, Yilmaz A, Cetin A. The effects of long-term sleep deprivation on the long-term potentiation in the dentate gyrus and brain oxidation status in rats. *Neurosci Res.* 2011, (1):71-7.

Takehara-Nishiuchi K. Entorhinal cortex and consolidated memory. *Neurosci Res.* 2014; 84: 27-33.

Taylor SL, Higley NA, Bush RK. Sulfites in foods: uses, analytical methods, residues, fate, exposure assessment, metabolism, toxicity, and hypersensitivity. *Adv Food Res.* 1986;30:1-76.

Teber I, Köhling R, Speckmann EJ, Barnekow A, Kremerskothen J. Muscarinic acetylcholine receptor stimulation induces expression of the activity-regulated cytoskeleton-associated gene (ARC). *Brain Res Mol Brain Res.* 2004;121(1-2):131-6.

Teipel S, Heinsen H, Amaro E Jr, Grinberg LT, Krause B, Grothe M; Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. Cholinergic basal forebrain atrophy predicts amyloid burden in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 2014 (3):482-91.

Til HP, Feron VJ, De Groot AP. The toxicity of sulphite. I. Long-term feeding and multigeneration studies in rats. *Food Cosmet Toxicol.* 1972 Jun;10(3):291-310.

Tiwari P., Dwivedi S., Singh M. P., Mishra, R., Chandy, A. Basic and modern concepts on cholinergic receptor: A review. *Abbreviation · Asian Pac J* 2013; 3 (5): 413-420.

Topak G. Çocuklarda Sülfıt Alımına Bağlı EEG ve Lokomotor Aktivite Değişikliklerinin Moleküler Mekanizmalarla Araştırılması. A.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 2017, Antalya (Danışman: Prof. Dr. N Derin).

Tort AB, Komorowski RW, Manns JR, Kopell NJ, Eichenbaum H. Theta-gamma coupling increases during the learning of item-context associations. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009; 106(49):20942-7.

- Tsakiris, Stylianos, et al. "Protective effect of L-phenylalanine on rat brain acetylcholinesterase inhibition induced by free radicals." *Clin. Biochem* 33.2 (2000): 103-106.
- Uran SL, Caceres LG, Guelman LR. Effects of loud noise on hippocampal and cerebellar-related behaviors. Role of oxidative state. *Brain Res.* 2010;1361:102-14.
- Vandevijvere S, Temme E, Andjelkovic M, De Wil M, Vinkx C, Goeyens L, Van Loco J. Estimate of intake of sulfites in the Belgian adult population. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess.* 2010 (8):1072-83.
- Vara H, Onofri F, Benfenati F, Sassoè-Pognetto M, Giustetto M. ERK activation in axonal varicosities modulates presynaptic plasticity in the CA3 region of the hippocampus through synapsin I. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 ;106(24):9872-7.
- Verde E. M. R., Lee-Osbourne J., Worley P. F., Malinow, R., Cline, H. T. Increased expression of the immediate-early gene *Arc/Arg3. 1* reduces ampa receptor-mediated synaptic transmission. *Neuron.* 2006; 52 (3): 461-474.
- Vertes RP. Hippocampal theta rhythm: a tag for short-term memory. *Hippocampus.* 2005;15(7):923-35.
- Wang KH, Majewska A, Schummers J, Farley B, Hu C, Sur M, Tonegawa S. In vivo two-photon imaging reveals a role of *arc* in enhancing orientation specificity in visual cortex. *Cell.* 2006;126(2):389-402.
- Wang X, Cao H, Guan XL, Long LH, Hu ZL, Ni L, Wang F, Chen JG, Wu PF. Sulfite triggers sustained calcium overload in cultured cortical neurons via a redox-dependent mechanism. *Toxicol Lett.* 2016; 258:237-248.
- Wang XB, Jin HF, Tang CS, Du JB. Significance of endogenous sulphur-containing gases in the cardiovascular system. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2010 (7):745-52.
- Warburton E. C., Koder T., Cho K., Massey, P. V., Duguid, G., Barker, G. R. Brown, M. W. Cholinergic neurotransmission is essential for perirhinal cortical plasticity and recognition memory. *Neuron.* 2003; 38 (6): 987-996.
- Watanabe H, Shimizu H. Effect of anticholinergic drugs on striatal acetylcholine release and motor activity in freely moving rats studied by brain microdialysis. *Jpn J Pharmacol.* 1989 Sep;51(1):75-82.
- Waung MW., Pfeiffer BE., Nosyreva ED., Ronesi JA., Huber KM. Rapid translation of *Arc/Arg3. 1* selectively mediates mglur-dependent ltd through persistent increases in ampar endocytosis rate. *Neuron.* 2008; 59 (1): 84-97.
- Wedzicha BL. Chemistry of sulphiting agents in food. *Food Addit Contam.* 1992 (5):449-59.

Whitlock J. R., Heynen A. J., Shuler M. G., Bear M. F. Learning induces long-term potentiation in the hippocampus. *Science*. 2006; 313 (5790): 1093-1097.

Win-Shwe TT, Fujimaki H, Fujitani Y, Hirano S. Novel object recognition ability in female mice following exposure to nanoparticle-rich diesel exhaust. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2012;262(3):355-62.

Winson J. Loss of hippocampal theta rhythm results in spatial memory deficit in the rat. *Science*. 1978 Jul 14;201(4351):160-3.

Woolf NJ. Cholinergic systems in mammalian brain and spinal cord. *Prog Neurobiol*. 1991;37(6):475-524.

Wu D, Hersh LB. Choline acetyltransferase: celebrating its fiftieth year. *J Neurochem*. 1994 (5):1653-63.

Wyse ATS, Grings M, Wajner M, Leipnitz G. The Role of Oxidative Stress and Bioenergetic Dysfunction in Sulfite Oxidase Deficiency: Insights from Animal Models. *Neurotox Res*. 2019 (2):484-494.

Xing WM, Yuan TJ, Xu JD, Gu LL, Liang P, Lu H. Proteomic identification of mitochondrial targets involved in andrographolide sodium bisulfite-induced nephrotoxicity in a rat model. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2015 (2):592-9.

Xiong H, Zhang J, Liu J. Hippocampus, spatial memory and neuroimmunomodulation. *JNIP* 2017; pp. 69-79

Yang WH, Purchase EC. Adverse reactions to sulfites. *CMAJ*. 1985; 133 (9): 865-867, 880.

Ying SW, Futter M, Rosenblum K, Webber MJ, Hunt SP, Bliss TV, Bramham CR. 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):1532-40.

Zhang Q, Bai Y, Yang Z, Tian J, Meng Z. The molecular mechanisms of sodium metabisulfite on the expression of K ATP and L-Ca²⁺ channels in rat hearts. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2015 (3):440-6.

Zhang X, Vincent AS, Halliwell B, Wong KP. A mechanism of sulfite neurotoxicity: direct inhibition of glutamate dehydrogenase. *J Biol Chem*. 2004 Oct 8;279(41):43035-45.

Zhang XJ, Yang L, Zhao Q, Caen JP, He HY, Jin QH, Guo LH, Alemany M, Zhang LY, Shi YF. Induction of acetylcholinesterase expression during apoptosis in various cell types. *Cell Death Differ*. 2002 (8):790-800.

Zuazaga C., Steinacker A., Castillo, J. d. The role of sulfhydryl and disulfide groups of membrane proteins in electrical conduction and chemical transmission. PR health sci. j. 1984: 125-139.



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Betül	Uyruğu	TC
Soyadı	DANIŞMAN	Tel no	0 534 487 06 09
Doğum tarihi	29.09.1986	e-posta	brrhd02@gmail.com

Eğitim Bilgileri

Mezun olduğu kurum		Mezuniyet yılı
Lise	Babaeski Anadolu Lisesi	2004
Lisans	ODTÜ-Fizik Bölümü	2009
Yüksek Lisans	ODTÜ-Fizik Bölümü	2011
Doktora	Akdeniz Üniversitesi-Biyofizik ABD	2013

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (yıl-yıl)
Araştırma Görevlisi	ODTÜ / Fizik Bölümü	2009-2013
Araştırmacı	Gran Sasso - OPERA Experiment – İtalya	20/01-20/03/2009
Araştırma Görevlisi	Atatürk Üniversitesi/Tıp Fakültesi/ Biyofizik ABD	2013
Araştırma Görevlisi	Akdeniz Üniversitesi/Tıp Fakültesi/ Biyofizik A.D.	2013-2021

Yabancı Dilleri	Sınav türü	Puanı
İngilizce	ÜDS	83

Proje Deneyimi

Proje Adı	Destekleyen kurum	Süre (Yıl-Yıl)
Akustik Travmaya Bağlı Ani İşitme Kaybında Resveratrolün Koruyucu Etkilerinin Mekanizmalarıyla Araştırılması	Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri	2016-2018
Yaşlılığa Bağlı Öğrenme Değişikliklerine L_Karnitinin Etkisi ve Moleküler Mekanizmaları	Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri	2017-2020
Yaşlı Ratlarda LKarnitinin Presbiakuzi Üzerine Etkilerinin Moleküler Mekanizmalarla Araştırılması	Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri	2017-2020
Prenatal, postnatal sülfid maruziyetinin davranış ve öğrenme üzerine etkilerinin ve moleküler mekanizmasının araştırılması	TÜBİTAK	2017-2020
Farklı Dozlardaki Sülfidin Öğrenme ve Hafıza Üzerindeki Etkilerinde Asetilkolinin Rolü	Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri	2018-2020
Diyetle Alınan Sülfidin Hipokampustaki PGE2 Düzeyi ve PGE2 Reseptörlerine Etkileri	Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri	2018-2020
Deneyisel serebral iskemi modeline bağlı öğrenme ve hafıza değişikliklerine transkraniyal doğru akım stimülasyonunun etkilerinin	Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri	2018-2020
Yaşlılığa Bağlı Oluşan Oksidatif Stres ve	Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma	2018-2020

Apoptotik Parametrelerin Moleküler Mekanizmaları Üzerine L Karnitin Uygulamasının Etkileri	Projeleri	
---	-----------	--

Burslar-Ödüller:

TÜBİTAK 1001 Proje, 2018-2019, Bursiyer

Yayınlar ve Bildiriler:

1. S. Ayık, O.Yılmaz, F. Acar, B.Danisman, N.Er, A.Gokalp (2011). Investigations of instabilities in nuclear matter in stochastic relativistic models. Nuclear Physics A, 859(1), 73-86. (Kontrol No: 1696309)
2. Kelek SE, Afşar E, Akçay G, Danışman B, Aslan M (2019) .Effect of chronic L-carnitine supplementation on carnitine levels, oxidative stress and apoptotic markers in peripheral organs of adult Wistar rats. Food Chem Toxicol. Dec;134:110851. doi: 10.1016/j.fct.2019.110851.
3. Yılmaz NDS, Gür ÖE, Ensari N, Bulut E, Kaya OT, Sırvancı S, Danışman B, Derin N, Gezgin B, Aygener N, Yılmaz MD. (2019) Effect of perinatal biotin deficiency on auditory pathway of the Wistar-Albino rats. Acta Otolaryngol. Aug;139(8):677-684. doi: 10.1080/00016489.2019.1614665. Epub 2019 May 24.

Uluslararası Kongrelerde Sunulan ve Uluslararası Dergilerde Özeti Yayınlanan Çalışmalar

1. "The effects of sulfite exposure on learning and memory in prenatal and postnatal periods", Journal of Experimental and Clinical Anatomy, vol.Vol 12, pp.12-12, 2018
2. "The impact of biotin deficiency on spatial memory in rats", Journal of Experimental and Clinical Anatomy, Anatomy, vol.Vol 12, pp.12-12, 2018
3. "Investigation of protective effects of long term L-carnitine treatment on presbycusis", An International Journal of Experimental and Clinical Anatomy, vol.Vol 12, pp.12-12, 2018
4. "Cep Telefonlarının İşitsel Beyinsapı Potansiyellerine Etkileri", Acıbadem Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi, cilt.1, ss.9-9, 2018
5. "Investigation of the Effects of L-Carnitine on Age Related Learning Changes and the Regulation of Glutamate Levels by Behavioral and Molecular Methods", Turkish Society of Physiological Sciences 44th National Physiology Congress, vol. Volume 2, pp.13-14, 2018
6. 'Effect of l-carnitine supplementation on carnitine levels, oxidative stress and apoptotic markers in peripheral organs of aged rats,' Clinica Chimica Acta, 2019. (SCI), 493, 633,

7. 'Effect of chronic L-carnitine supplementation on carnitine levels, oxidative stress and apoptotic markers in peripheral organs of adult Wistar rats,' Food and Chemical Toxicology, 2019. (SSCI), 134, 110851
8. Investigation of the Effects on Sulfite Exposure on EEG, Acta Physiologica, 2018. (SCI)
9. "Effects of Ingested Sulfite on Auditory Evoked Brainstem Response", Acta Physiologica, vol.218, pp.26-91, 2016
10. Effects of Ingested Sulfite on Auditory Evoked Brainstem Response" 42. Ulusal Fizioloji Kongresi, Düzce, 05-08 Eylül 2016.
11. Effects of Diabetes on Brainstem Auditory Evoked Potentials, Acta Physiologica, 2016. (SCI), 218, 87-87

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler

1. Akçay, G., Danışman, B., Saraç, Ç., Aydın, A, M., Derin, N. Investigation of the Effects of L-Carnitine on Age-Related Learning Changes and Glutamate Pathway, FENS Regional Meeting 2019, 2019
2. Ercan, K, S., Afşar, E., Akçay, G., Kaya, S., Danışman, B., Aydın, A, M. Effect of l-carnitine supplementation on carnitine levels, oxidative stress and apoptotic markers in peripheral organs of aged rats, 23rd IFCC-EFLM European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 2019
3. Ercan, K, S., Afşar, E., Akçay, G., Kaya, S., Danışman, B., Aydın, A, M. Effect of l-carnitine supplementation on carnitine levels, oxidative stress and apoptotic markers in peripheral organs of aged rats, 23rd IFCC-EFLM European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 2019
4. Danışman, B., Kencebay, M, C., Akçay, G., Saraç, Ç., Denizaltı, T., Aydın, A, M., Derin, N. Effects of sulphite exposure on behaviour and its molecular mechanisms, 3rd International Multidisciplinary Studies Congress, 2018
5. Akçay, G., Danışman, B., Derin, N. Effect of L-Carnitine on age related Learning Changes and the Role of Oxidative Stress in This Effect, 3. Internaional Multidisciplinary Studies Congress, 2018
6. Tas, G, G., Akçay, G., Danışman, B., Derin, N., Satı, G, L., Derin, A, T. Effect of L-Carnitine Supplementation on Apoptosis in The Cochlea of Aged Rats, XXVI International Symposium on Morphological Sciences, 2018
7. Akçay, G., Danışman, B., Derin, N. Effects of Biotin Deficiency on Learning and Anxiety during Prenatal and Postnatal Periods, XXVI International Symposium on Morphological Sciences, 2018

Ulusal hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

1. Akçay, G., Başaranlar, G., Er, H., Danışman, B., Derin, N., Özen, Ş., Yargıçoğlu, A, P. Cep Telefonlarının İşitsel Beyinsapı Potansiyellerine Etkileri, Acıbadem Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi, 2018. (TR DİZİN)

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler

1. Satı, G. L., Tas, G. G., Babacan, Ö., Kencebay, M. C., Danışman, B., Akçay, G., Derin, N. Prenatal, postnatal sülfite maruziyetinin, ratlarda hipokampus glutamat reseptör ekspresyonları üzerindeki etkisinin araştırılması, 24. ULUSAL ELEKTRONMİKROSKOPİ KONGRESİ, 2019
2. Akçay, G., Kencebay, M. C., Danışman, B., Denizaltı, T., Saraç, Ç., Aydın, A. M., Derin, N. Sıçanlarda Prenatal ve/veya Postnatal Dönemde Sülfite Maruziyetine Bağlı Nörotoksisitede Glutamatın Rolü, 17. Ulusal Sinirbilim Kongresi, 2019
3. Satı, G. L., Tas, G. G., Babacan, Ö., Kencebay, M. C., Danışman, B., Akçay, G., Derin, N. Prenatal, postnatal sülfite maruziyetinin, ratlarda hipokampus glutamat reseptör ekspresyonları üzerindeki etkisinin araştırılması, Uluslararası Katılımlı 24. Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi (EMK2019), 2019
4. Danışman, B., Akçay, G., Yelli, İ., Derin, N. The Impact of Biotin Deficiency on Spatial Memory in Rats, 16. Ulusal Sinirbilim Kongresi (Uluslararası Katılımlı), 2018
5. Saraç, Ç., Akçay, G., Danışman, B., Özkan, A., Derin, N. "L-Karnitin Yaşlılığa Bağlı Öğrenme Değişikliklerine ve Glutamat Düzeyinin Regülasyonuna Etkilerinin Davranışsal ve Moleküler Yöntemler ile Araştırılması, 44. Türk Fizyolojik Bilimler Kongresi, 2018
6. Akçay, G., Kantar, G. D., Danışman, B., Munzuroğlu, M., Kencebay, M. C., Denizaltı, T., Denizaltı, T., Duman, Ö., Derin, N. Sülfite Maruziyetinin EEG Üzerine Etkilerinin Araştırılması, 44. Türk Fizyolojik Bilimler Kongresi, 2018
7. Akçay, G., Danışman, B., Kıymaz, K. Z., Kencebay, M. C., Denizaltı, T., Derin, N. The Effects of Sulfite Exposure on Learning and Memory in Prenatal and Postnatal Periods, 16. Ulusal Sinirbilim Kongresi (Uluslararası Katılımlı), 2018
8. Akçay, G., Danışman, B., Tas, G. G., Satı, G. L., Derin, N., Derin, A. T. Investigation of Protective Effects of Long Term L-Carnitine Treatment on Presbycusis, 16. Ulusal Sinirbilim Kongresi (Uluslararası Katılımlı), 2018
9. Akçay, G., Başaranlar, G., Er, H., Danışman, B., Derin, N., Özen, Ş., Yargıçoğlu, A. P. Cep Telefonlarının İşitsel Beyinsapı Potansiyellerine Etkileri, 28-29. Ulusal Biyofizik Kongres, 2017
10. Danışman, B., Akçay, G., Başaranlar, G., Kencebay, M. C., Derin, N. Diyetle Alınan Sülfite İşitsel Uyarılmış Beyinsapı Potansiyellerine Etkisi, 42. TFBD Kongresi, 2016
11. Akçay, G., Güzel, P., Danışman, B., Başaranlar, G., Derin, A. T., Derin, N. Diyabetin Uyarılmış Beyinsapı İşitsel Potansiyellerine Etkileri, 42. TFBD Kongresi, 2016

Yaptığı Tezler

Yüksek Lisans, "Stochastic mean field teory", ORTA DOĞU TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
Fen edebiyat fakultesi Fizik Ağustos, 2011