

ZÜLAL KAPTAN

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

DOKTORA TEZİ

İSTANBUL-2018

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(DOKTORA TEZİ)

**SIÇANLARDA ADOLESAN DÖNEMDE
ÖNGÖRÜLEBİLİR KRONİK STRES VE ZENGİN ÇEVRE
UYGULANMASININ SPASYAL HAFIZA VE HIPOKAMPAL
ASİMETRİ ÜZERİNE ETKİSİ**

ZÜLAL KAPTAN

**DANIŞMAN
PROF. DR. GÜLAY ÜZÜM**

**FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI
FİZYOLOJİ DOKTORA PROGRAMI**

İSTANBUL-2018

TEZ ONAYI
DOKTORA TEZİ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü İstanbul Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, Fizyoloji Doktora Programında Doktora öğrencisi **Zülal KAPTAN** tarafından Prof.Dr.Gülay ÜZÜM danışmanlığında hazırlanan “**Sıçanlarda Adolesan Dönemde Öngürülebilir Kronik Stres ve Zengin Çevre Uygulanmasının Spasyal Hafıza ve Hipokampal Asimetri Üzerine Etkisi** ” başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 10 /10/2018 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı

Prof.Dr.Fatma Aytül UYAR
İ.Ü İstanbul Tıp Fakültesi
Fizyoloji Anabilim Dalı Başkanı

Jüri-Danışman

Prof.Dr.Gülay ÜZÜM
İ.Ü İstanbul Tıp Fakültesi
Fizyoloji AD

Jüri

Prof.Dr.Serap ERDEM-KURUCA
İ.Ü. İst.Tıp Fakültesi Fizyoloji AD

Jüri

Prof.Dr.Fatma TÖRE
Biruni Üniversitesi Tıp Fak.
Fizyoloji AD

Jüri

Prof.Dr.Asiye NURTEN
İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversite
Tıp Fakültesi Fizyoloji AD

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Zülal Kaptan

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimimi tamamlamamı sağlayan, her konuda arkamda olduğunu bilerek güç bulduğum danışmanım Prof. Dr. Gülay Üzüm'e sonsuz sevgi ve saygılarımla teşekkür ederim.

İstanbul Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı'nın tüm imkanlarından yararlanmamı sağlayan Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Aytül Uyar'a teşekkür ederim.

Çalışmamın immunohistokimyasal analizlerinin yapılması ve yorumlanmasında bana kıymetli zamanını ayıran Prof. Dr. Kadriye Akgün Dar'a ve Arş. Gör. Dr. Ayşegül Kapucu'ya ve ELISA çalışmalarında yardımlarından dolayı Arş. Gör. Huri Bulut'a minnettarlıkla teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TDK-2017-25108

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
TEŞEKKÜR.....	İV
İÇİNDEKİLER	V
ŞEKİLLER LİSTESİ	Vİİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	İX
ÖZET	Xİ
ABSTRACT.....	Xİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Öğrenme ve hafıza	4
2.2. Spasyal hafıza oluşumundan sorumlu beyin bölgeleri.....	7
2.2.1. Hipokampus	8
2.3. Öğrenme ve hafıza oluşumuna etkili sinyal molekülleri	10
2.3.1. Beyin kökenli nörotrofik faktör (BDNF)	10
2.3.2. Nitrik oksit (NO).....	12
2.3.3. Oksidatif stres molekülleri	14
2.4. Öğrenme ve hafıza üzerine etkili dış faktörler.....	17
2.4.1. Kronik stres	17
2.4.2. Öngörülebilir kronik stres	19
2.4.3. Zengin çevre.....	20
2.5. Adolesan dönem ve beyin gelişimi	21
2.6. Beyin asimetrisi	22
2.6.1. Hipokampal asimetri	22
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	26
3.1. Deney grupları ve deney planı	26
3.2. Öngörülebilir kronik stres	27
3.3. Zengin çevre.....	28
3.4. Morris su labirenti testi	28
3.5. Serum örneklerinin toplanması	29

3.6. Hipokampus ve frontal korteks örneklerinin toplanması.....	29
3.7. İmmunohistokimyasal analizler	30
3.8. Biyokimyasal analizler.....	31
3.9. İstatistiksel analizler.....	32
4. BULGULAR.....	33
4.1. Vücut ağırlığı değişimleri	33
4.2. Spasyal hafıza performansı	33
4.3. Kortikosteron düzeyleri	37
4.4. Hipokampus BDNF düzeyleri.....	37
4.5. Hipokampus CREB düzeyleri.....	38
4.6. Hipokampus alt alanlarında NeuN dağılımı	39
4.7. Hipokampus alt alanlarında nNOS ve eNOS dağılımı	43
4.8. Hipokampus ve frontal korteks MDA düzeyleri.....	51
4.9. Hipokampus ve frontal korteks PCO düzeyleri	52
4.10. Hipokampus ve frontal korteks SOD düzeyleri	53
5. TARTIŞMA	54
ETİK KURUL KARARI	74
KAYNAKLAR	75
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	84
ÖZGEÇMİŞ	85

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1 Uzun süreli potansiyel artışının (LTP) mekanizması [26]	6
Şekil 2-2 Hafıza sınıflandırması.	7
Şekil 2-3 Hipokampus alt alanları ve hipokampal devre [33]	10
Şekil 2-4 Dendritik dikenlerin yapısal plastisitesinde reaktif oksijen türleri sinyalleme sinin olası rolünün şematik özeti [28]	16
Şekil 3-1 İmmobilizasyon stresi uygulamak için kullanılan plastik aparatlar	27
Şekil 3-2 Adolesan sıçanlar için zengin çevre kafesleri	28
Şekil 4-1 Grupların deney süresince haftalık olarak ölçülen vücut ağırlıkları	33
Şekil 4-2 Morris su labirenti testi öğrenme fazı performansları	34
Şekil 4-3 Probe test sırasında hedef kadranda (platformun daha önce bulunduğu kadranda) geçirilen süre.....	35
Şekil 4-4 Probe testte toplam kat edilen mesafe	35
Şekil 4-5 Probe testte ortalama hız	36
Şekil 4-6 Probe testte izlenen yola ait örnekler	36
Şekil 4-7 Serum kortikosteron düzeyleri	37
Şekil 4-8 Hipokampal BDNF düzeyleri.....	38
Şekil 4-9 Hipokampal CREB düzeyleri.....	38
Şekil 4-10 Hipokampal DG’de NeuN işaretli hücrelerin sayısı ve şiddetine göre hesaplanmış H-skorlar	39
Şekil 4-11 Hipokampal DG’de NeuN işaretli hücreler.....	40
Şekil 4-12 Hipokampal CA3’te NeuN işaretli hücrelerin sayısı ve şiddetine göre hesaplanmış H-skorlar	41
Şekil 4-13 Hipokampal CA3’te NeuN işaretli hücreler.....	41
Şekil 4-14 Hipokampal CA1’de NeuN işaretli hücrelerin sayısı ve şiddetine göre hesaplanmış H-skorlar	42
Şekil 4-15 Hipokampal CA1’de NeuN işaretli hücreler	43
Şekil 4-16 Hipokampal DG’de nNOS işaretli hücrelerin sayısı ve şiddetine göre hesaplanmış H-skorlar	44
Şekil 4-17 Hipokampal DG’de nNOS işaretli hücreler	44

Şekil 4-18 Hipokampal CA3'te nNOS işaretli hücrelerin sayısı ve şiddetine göre hesaplanmış H-skorlar	45
Şekil 4-19 Hipokampal CA3'te nNOS işaretli hücreler	45
Şekil 4-20 Hipokampal CA1'de nNOS işaretli hücrelerin sayısı ve şiddetine göre hesaplanmış H-skorlar	46
Şekil 4-21 Hipokampal CA1'de nNOS işaretli hücreler	46
Şekil 4-22 Hipokampal DG'de eNOS işaretli hücrelerin sayısı ve şiddetine göre hesaplanmış H-skorlar	47
Şekil 4-23 Hipokampal DG'de eNOS işaretli hücreler	48
Şekil 4-24 Hipokampal CA3'te eNOS işaretli hücrelerin sayısı ve şiddetine göre hesaplanmış H-skorlar	49
Şekil 4-25 Hipokampal CA3'te eNOS işaretli hücreler.....	49
Şekil 4-26 Hipokampal CA1'de eNOS işaretli hücrelerin sayısı ve şiddetine göre hesaplanmış H-skorlar	50
Şekil 4-27 Hipokampal CA1'de eNOS işaretli hücreler.....	51
Şekil 4-28 Hipokampus ve frontal kortekste MDA düzeyleri	52
Şekil 4-29 Hipokampus ve frontal kortekste PCO düzeyleri.....	52
Şekil 4-30 Hipokampus ve frontal kortekste SOD düzeyleri	53

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

AMPA: alfa-amino-3-hidroksi-5-metilizoazol-4-propriyonik asit

BDNF: Beyin kökenli nörotrofik faktör

CA1: Cornu Ammonis 1

CA3: Cornu Ammonis 3

Ca⁺²: Kalsiyum

CaMKII: Kalsiyum kalmodulin bağımlı protein kinaz II

cAMP: Siklik adenosin monofosfat

cGMP: Siklik guanosin monofosfat

cm: Santimetre

CREB: Siklik adenosin monofosfat yanıt elemanı bağlayıcı protein

DG: Dentat girus

EK: Entorinal korteks

ELISA: Enzim bağı immün assay

g: Gram

HPA: Hipotalamo-Pitüiter-Adrenal

IFG: İnferior frontal girus

LTP: Uzun süreli potansiyel artışı

MDA: Malondialdehid

Mg⁺²: Magnezyum

m: Metre

ml: Mililitre

mm³: Milimetre küp

MSS: Merkezi sinir sistemi

NeuN: Nöronal nükleer antijen

NMDA: N-metil-D-aspartat

NO: Nitrik oksit

nNOS: Nöronal nitrik oksit sentaz

NOS-1: Nöronal nitrik oksit sentaz

iNOS: İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
NOS-II: İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
eNOS: Endotelyal nitrik oksit sentaz
NOS-III: Endotelyal nitrik oksit sentaz
PET: Pozitron emisyon tomografisi
PCO: Protein karbonil
PKC: Protein kinaz C
ROS: Reaktif oksijen türleri
rpm: Dakikada devir
sGC: Çözünür guanilil siklaz
SOD: Süperoksit dismutaz
sn: Saniye

ÖZET

Kaptan, Z.K. (2018). Sıçanlarda Adolesan Dönemde Öngörülebilir Kronik Stres ve Zengin Çevre Uygulanmasının Spasyal Hafıza ve Hipokampal Asimetri Üzerine Etkisi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Fizyoloji ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

Adolesan dönemde maruz kalınan birçok uyaran öğrenme-hafıza için kritik beyin bölgesi olan hipokampusu yapısal ve fonksiyonel olarak etkilemektedir. Kronik stresin hipokampus üzerine olumsuz etkileri bilinmektedir. Ancak çelişen sonuçlar olmakla birlikte az sayıda araştırmada kısa süreli öngörülebilir stresin hafıza üzerine olumlu etkileri bildirilmiştir. Ayrıca bilişsel yetilerin kazanılmasında zengin çevrenin olumlu etkileri çok sayıda çalışmada gösterilmiştir. Çalışmamızda, adolesan sıçanlara günde 15 dakika 4 hafta süreyle uygulanan kronik immobilizasyon stresinin ve ayrı bir grupta günde 1 saat süreyle 4 hafta boyunca uygulanan zengin çevrenin spasyal hafızaya etkisini araştırdıktan sonra öğrenme-hafıza sürecinin nörobiyolojik temeli LTP'nin oluşumunda kritik medyatörler (BDNF, CREB, NOS), nöronal (NeuN) ve oksidatif stres (MDA, PCO, SOD) markırları sol ve sağ hipokampusta değerlendirildi. Her iki deney grubunda da spasyal hafıza kontrol grubuna göre anlamlı olarak iyileşti. Kontrol grubunda tüm markırlarda sol>sağ asimetrisi saptandı. Deney gruplarında; hipokampal BDNF, grubuna göre farklı asimetri göstererek her iki yarıda anlamlı olarak arttı. Diğer markırlar için sağ>sol asimetrisi saptandı. İlginç olarak sağ hipokampusta MDA'da artış, her iki taraf DG'de NeuN pozitif hücre sayısında azalma saptandı. Ayrıca nNOS hipokampus alt alanlarında farklı asimetri gösterirken, DG'de eNOS, BDNF'ye paralel asimetri gösterdi. Özgün ve ilk olan bulgularımız, spasyal hafıza oluşumunda etkili nörobiyolojik medyatörlerin hipokampusta asimetrik ekspresyonunu ortaya koymuştur ve bu alanda yeni hipotezler geliştirilmesine katkı sağlayacaktır.

Anahtar Kelimeler: Adolesan, Hipokampal Asimetri, BDNF, NOS, Oksidatif stres

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TDK-2017-25108

ABSTRACT

Kaptan Z.K. (2018). The Effect of Predictable Chronic Stress and Enriched Environment in Adolescence in Rats on Spatial Memory and Hippocampal Asymmetry. İstanbul University, Institute of Health Science, Physiology Department. Doktora Tezi. İstanbul.

Many stimuli exposed during adolescence are structurally and functionally affecting hippocampus, critical brain region for learning-memory. Negative effects of chronic stress on hippocampus are known. However, with few conflicting results, positive effects of short-term predictable stress on memory have been reported. In addition, positive effects of the enriched environment in acquisition of cognitive abilities have been shown in numerous studies. In our study, after investigating effects of chronic immobilization stress applied to adolescent rats for 15 minutes a day for 4 weeks and effects of enriched environment for an hour a day for 4 weeks in a separate group on memory, critical mediators of LTP which is neurobiological basis of leaning-memory process (BDNF, CREB, NOS), neuronal (NeuN), and oxidative stress (MDA, PCO, SOD) markers were evaluated in left and right hippocampus. In both experimental groups, spatial memory was significantly improved compared to control group. We found left>right asymmetry in all markers in control group. In experimental groups; hippocampal BDNF significantly increased in both hemispheres, showing different asymmetry according to group. Right>left asymmetry was detected for other markers. Interestingly, we found an increase in MDA in the right hippocampus and decrease of NeuN positive cell number in DG in both side. Furthermore, while nNOS showed different asymmetry in hippocampus subregions, eNOS in DG showed asymmetry parallel to BDNF. Our original and first findings reveal the asymmetric expression of neurobiological mediators in hippocampus, which is effective in formation of spatial memory, and will contribute to development of new hypotheses in this area.

Key Words: Adolescent, Hippocampal Asymmetry, BDNF, NOS, Oxidative stress

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No. TDK-2017-25108

1. GİRİŞ VE AMAÇ

İnsan ve hayvan çalışmaları hipokampus dahil birçok beyin bölgesinde sol ve sağ hemisfer arasında hacim ve nöronal yoğunluk açısından yapısal farklılık (lateralizasyon-asimetri) olduğunu göstermiştir. Bu yapısal asimetrinin optimal bilgi işlemede hemisferik uzmanlaşmanın bir karşılığı olduğu düşünülmüştür. Örneğin sol hemisfer sözel bilişsel işlev için baskınken, sağ hemisfer mekansal işlev ve duygudurum için daha baskındır. Öte yandan normal asimetriden sapmalar klinik olarak patofizyolojik süreçlerle ilişkilendirilmiştir [1-2].

Hipokampus öğrenme hafıza gibi yüksek beyin fonksiyonlarında kritik beyin bölgesidir. Hipokampus daha çok bilginin kodlanması ve konsolidasyonundan sorumludur. Ancak bilginin uzun süreli depolanmasında hipokampus dışı bölgelerin (özellikle frontal korteksin) sorumluluğu bilinmektedir [3]. Çalışmalar hipokampal asimetri ve kognitif fonksiyonlar arasındaki ilişkiye işaret etmektedir [4-7]. Dahası serebral asimetrinin hipokampal asimetri tarafından modüle edilebileceği ifade edilmektedir. Hipokampusta yapısal ve fonksiyonel asimetri sinirbilimde üzerinde yoğun çalışılan önemli konulardan biridir, ancak hipokampal fonksiyonlara aracılık eden sinyal molekülleri açısından çalışmalar eksiktir ya da yeterince açık değildir.

Normal bireylerin sağ hipokampuslarının sol hipokampuslarına göre daha büyük olduğu gözlenmiştir [8]. Çoğunlukla sol hipokampusun öğrenme fonksiyonunda, sağ hipokampusun spasyal hafıza oluşumunda baskın olduğu görülmüştür [5]. Yapılan araştırmalarda daha çok toplam hipokampal hacimler açısından asimetri ortaya konmuştur ancak hipokampusta moleküler ve mikroskopik düzeylerde lateralitenin (asimetrinin) olduğunu ortaya koyan çalışmalar da mevcuttur. Hipokampusta hafıza oluşumunda yeni nöronların oluşturulduğu bölge olan dentat girus, ana piramidal hücre alanları olan CA1 ve CA3 bölgelerinin farklı fonksiyonları olduğu bildirilmiştir [9]. İlginç olarak hafıza oluşumunun nörobiyolojik temeli olan uzun süreli potansiyel artışı (LTP) oluşumunda da hemisferik asimetri gösterilmiştir [10]. Beynin öğrenme hafıza gibi yüksek fonksiyonlarının bozulduğu hastalıkların patofizyolojisinin daha iyi anlaşılması ve tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesi hipokampusta bu fonksiyonların nasıl düzenlendiğinin, sol ve sağ hipokampusun fonksiyonlara katkısının daha fazla araştırılması gerekmektedir. Ancak hipokampusta fonksiyonlara aracılık eden sinyal

molekülleri açısından asimetri araştırmaları çok sınırlıdır ve sinirbilimde hala araştırılmaya muhtaç önemli konulardan biridir.

Hipokampal lateralizasyon intrauterin dönemde başlayıp adolesan dönem boyunca gelişip erişkinlikte de korunmaktadır [11]. Yaşla birlikte hipokampal lateralizasyon gelişiminin spasyal hafıza performansının artması ile pozitif korelasyon göstermesi, lateralizasyonun olgun ve etkin bir beynin göstergesi olduğuna işaret etmektedir. Bunun yanında lateralizasyon gelişimindeki bozukluğun birçok nöropsikiyatrik hastalığın patogenezinin sorumlu olabileceği kabul edilmektedir [12-14]. Hipokampus çevresel faktörlere karşı en hassas beyin bölgesidir. Adolesan dönemde maruz kalınan stres, diyet ve çevresel faktörler hipokampus gelişimini ve erişkin dönemde hipokampal fonksiyonları etkilemektedir [15]. Dolayısıyla erken dönemde maruz kalınan olumlu ya da olumsuz faktörler erişkin dönemde ortaya çıkabilecek nöropsikiyatrik hastalıklara karşı koruyucu olabilmekte veya hastalıklara zemin hazırlayabilmektedir.

Öğrenme ve hafıza fonksiyonuna birçok faktör etki edebilmektedir. Bunlardan kronik stresin daha çok negatif etkisi [16], zengin çevre uygulanmasının ise pozitif etkisi olduğu bilinmektedir [16]. Stres, beynin yapısını ve kognitif fonksiyonlar başta olmak üzere tüm fonksiyonlarını etkileyen önemli bir uyarandır. Ancak stresin etkisinde süresi ve tipi çok önemlidir. Literatürde çeşitli stres modelleri mevcuttur. Her gün bir saat ve daha fazla sürelerde uygulanan immobilizasyon stresinin stres hormonu olan serum kortikosteron düzeylerini artırdığı, öğrenme hafıza üzerine zararlı etkisi olduğu çok sayıda araştırmada gösterilmiştir [17-18]. Ancak çelişen raporlar olsa da, kısa süreli (5 dakika) kronik immobilizasyon stresin hafıza üzerine olumlu etkisi olduğunun saptanması stresin ılımlı ve öngörülebilir olması durumunda kognitif fonksiyonlar üzerine faydalı olabileceğini düşündürmüştür [19]. Öte yandan immobilizasyon stresin 10 dakikadan sonra serum kortikosteron düzeylerini artırdığı rapor edilmiştir [20].

Verilen bilgiler ışığında, bu çalışmada erkek sıçanlara adolesan dönem boyunca hipokampal fonksiyonlar üzerine olumlu etkisi olduğu kabul edilen günde 1 saat süreyle kronik zengin çevre ve daha çok zararlı olduğu kabul edilen ancak süreye bağlı olarak olumlu olduğu da düşünülen kronik immobilizasyon stres uygulaması yapılmıştır. Çalışma adolesan sıçanlarla yapıldığı için serum kortikosteron düzeyini artırabilen ılımlı

stres olması gözetilerek daha önce hiç uygulanmamış olan 15 dakika süreyle kronik immobilizasyon stresi (öngörülebilir stres) uygulanmıştır.

Uygulamalar sonunda (genç erişkin dönemde) sıçanlarda Morris Su Labirenti testi ile spasyal hafıza performansı ölçülüp, sol ve sağ hipokampuslarda hafıza oluşumuna katkıda bulunan kritik sinyal molekülü olan BDNF, CREB seviyelerine bakılmıştır. Ayrıca son yıllarda ilginç olarak hafıza oluşumuna sinyal molekülü olarak fizyolojik katkı sağladığı ortaya atılmış olan oksidatif stres markırları (MDA, PO, SOD), sağ ve sol hipokampus ve sağ ve sol frontal kortekste değerlendirilmiştir. Ek olarak hipokampus alt bölgelerinde (dentat girus, CA3, CA1) öğrenme ve hafıza için kritik haberci moleküllerden biri olan NO üretimini sağlayan nNOS ve eNOS ekspresyonu, ve nöron spesifik markır olan NeuN ekspresyonun her iki yarıda karşılaştırılması amaçlanmıştır. Özellikle NOSların hipokampal alt alanlarda ayrı ayrı çalışılması gerekli görülmüştür. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda özellikle nNOS ve eNOS düzeylerinin hipokampus alt bölgelerinde heterojen dağıldığı rapor edilmiştir [21]. Örneğin bu NOS'lar tarafından üretilen NO'nun CA1'de retrograd haberci olabileceği bildirilmiştir [22]. NO oluşumunu sağlayan NOS türlerinden nNOS ve eNOS'un hipokampus alt bölgelerinde farklı dağılımı, NOS'ların hafıza oluşum sürecinde etkilerinin NOS türüne bağlı olarak değişebileceğini düşündürmektedir. Ayrıca hipokampusta eNOS ve BDNF ekspresyonu arasında da pozitif etkileşim olabileceği bildirilmektedir [22].

Çalışmamız adolesan dönemde zengin çevre ve öngörülebilir immobilizasyon stresi olarak farklı iki uyaranın uygulandığı iki ayrı grupta spasyal hafızaya ve spasyal hafızada kritik beyin bölgesi olan hipokampusta hafıza oluşumuna katkı sağlayan önemli moleküllerin hipokampus ve hipokampus alt bölgelerinde ekspresyonlarına etkisini asimetri açısından araştıran ilk çalışmadır ve sonuçları özellikle kognitif fonksiyonların etkilendiği nöropsikiyatrik hastalıkların patogenezi araştıran, tedavi ve cerrahi yaklaşımları amaçlayan çalışmalar için yararlı olabilecektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Öğrenme ve hafıza

Bilimdeki en önemli sorulardan biri, beynin bilgiyi nasıl kodladığı, depoladığı ve geri çağırdığıdır. Öğrenme ve hafızanın hücresel ve moleküler mekanizmalarını analiz eden devrelerin ve ağların, depolama alanlarının araştırılması nörobilimin çok önemli ve ilgi çeken konularından biridir.

Hafızayı bir deneyimin neden olduğu davranışsal bir değişim olarak, öğrenmeyi ise hafızanın oluşması için gerekli süreç olarak tanımlayabiliriz. Öğrenme sürecini non-asosiyatif ve asosiyatif olmak üzere iki temel kategoriye ayırmak yararlı olacaktır. Non-asosiyatif öğrenme, tek bir olay türü ile elde edilen deneyimin sonucudur. Habitüasyon-tekrarlanan (genellikle güçlü) stimülasyona cevaben duyarlılıkta azalma- sensitizasyon - stimülasyondan sonra duyarlılıkta artış- non-asosiyatif öğrenme örnekleridir [23]. İki ya da daha fazla olayın birleşmesinden kaynaklanan asosiyatif öğrenme, genellikle Pavlovian (ya da klasik) ve operan koşullama olarak kategorize edilir [23]. En temel düzeyde, asosiyatif öğrenme organizmanın ortamında meydana gelen olaylar arasındaki nedensel ilişkilerle ilgilidir. Nörobiyolojik açıdan bakıldığında, deneysel bir araç olarak Pavlovian koşullandırmanın, operan öğrenmeye göre birçok avantajı vardır. En önemlisi, deneysel manipülasyonların öğrenme üzerindeki etkilerinin daha kolay değerlendirilebilmesidir [23].

Farklı hafıza tipleri, beynin farklı bölgelerine yerleşik farklı nöral devrelerde işlenmektedir. Hafıza oluşumunda frontal, parietal, oksipital ve temporal loblar, hipokampus ve limbik sistemin diğer yapıları arasındaki nöral ağların görev yaptığı bilinmektedir [24]. Yapılan çalışmalar hipokampusun bilgilerin kısa süreli hafızadan uzun süreli hafızaya aktarılması aşamasında oldukça önemli bir yapı olduğunu göstermiştir [24]

Ne olursa olsun, nörobilimciler hafızanın oluşması için nöronlarda bazı değişiklikler olduğunu düşünmektedirler. Sinir sisteminin gelişimsel ve çevresel durumlardaki değişimlere yapısal olarak adaptasyonu söz konusudur. Hafıza oluşumunda en bilinen süreç, nöronlar arası iletişimin kurulduğu sinapslarda iletim etkinliğindeki değişiklik, sinaptik bağlantıların artması ve kuvvetlenmesidir (sinaptik plastisite). Sinaptik plastisitenin nasıl indüklendiği ve sinaptik plastisitenin öğrenme ve

hafızada nasıl etkilendiği gibi birçok soru yanıtlanmaya devam etmektedir. Bu konularla ilgili çalışmalar yoğun bir şekilde devam etmektedir.

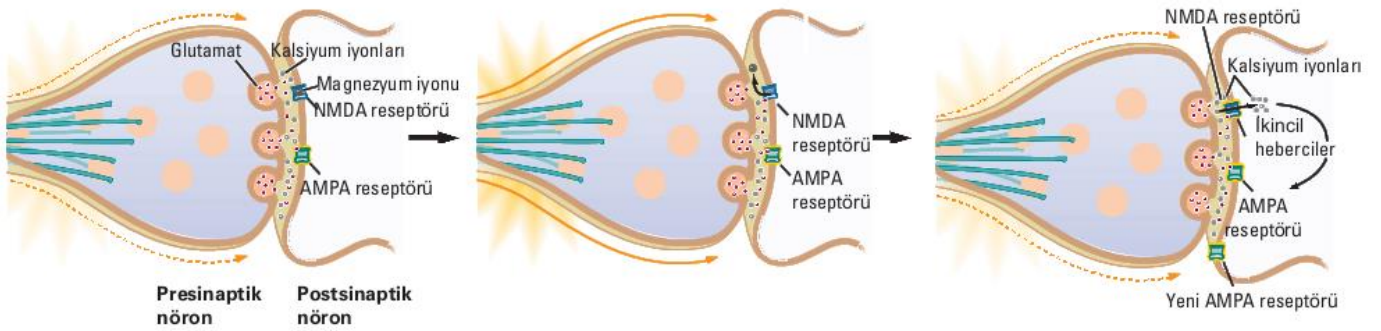
Öğrenmenin sinaptik plastisite sonucu gerçekleştiği kabul edilmektedir. Bilgileri depolama yeteneğinin ise uzun süreli potansiyel artışı (LTP) olarak ifade edilen mekanizma aracılığıyla sağlandığı düşünülmektedir [25]. Nörobilimciler, her hafıza türü için muhtemelen ayrı beyin alanlarında ayrı mekanizmaların olduğuna inanırlar. LTP en belirgin şekilde hafıza için önemli işlevi olduğu bilinen hipokampusta görülmektedir. LTP kısa ve yüksek frekanslı bir uyarıyı takiben postsinaptik nöronun kalıcı olarak depolarize olması anlamına gelmektedir. LTP'nin neden olduğu sinaptik güçlenme ile ikincil habercilerin yer aldığı bir süreç sonunda yapısal değişiklikler meydana gelmektedir [26]. Bu yapısal değişiklikler hafıza ile ilişkilendirilmektedir.

LTP'nin hafızadan sorumlu alanlarda oluşuyor olması, hafızanın sinaptik mekanizmasının temeli olduğunu düşündürmüştür. LTP sırasında glutamat, hipokampal nöronlar üzerine iki farklı reseptör aracılığıyla etki etmektedir. Bunlar N-metil-D-aspartat (NMDA) ve alfa-amino-3-hidroksi-5-metilizoazol-4-propriyonik asit (AMPA) reseptörleridir. Presinaptik membrandan glutamat salındığında gerçekleşen yanıtlara genellikle AMPA reseptörleri aracılık etmektedir. NMDA reseptörlerinin porları magnezyum iyonu (Mg^{+2}) tarafından kapatıldığı için genellikle glutamata yanıt vermemektedir [26]. Ancak NMDA reseptörleri çift kapılı kanallardır, aynı anda iki olayın meydana gelmesi bu kanalları açmaktadır:

1. Postsinaptik membranın güçlü bir elektriksel uyarım ile depolarize olmasıyla Mg^{+2} 'nin NMDA porlarını boşaltması.
2. NMDA reseptörlerinin, presinaptik zardan salınan glutamat tarafından aktive edilmesi (Şekil 2-1).

NMDA kanalının açılması sonucu kalsiyum iyonları (Ca^{+2}) postsinaptik nörona akar ve LTP ile ilgili olayların gerçekleşmesi için ikincil haberci sistemini uyarır [26]. Bu olaylar; AMPA reseptörünün glutamata sensitivitesinin artırılması, yeni AMPA reseptörlerinin yapılması, presinaptik zardan daha fazla glutamat salınımı için retrograd habercilerin gönderilmesi ve yeni sinapsların oluşmasıdır [27]. Yapılan farmakolojik ve genetik deneylerde nitrik oksidin (NO) LTP oluşumunda retrograd haberci olabileceğine dair kanıtlar bulunmuştur [26]. NMDA reseptörünün aktiflenmesi hücre içine Ca^{+2} akışını artırarak ROS ürünlerinin oluşumunu tetikler. Bu oksidasyon çinko salınımı ve otonom olarak protein kinaz C'nin (PKC) aktiflenmesine neden olur. ROS ayrıca

sinapstan presinaptik PKC'yi aktive etmek için retrograd haberciler olarak davranabilir. Bununla birlikte, süperoksit türevli habercinin kesin kaynağı şu anda bilinmemektedir ve bu, aktif bir araştırma alanıdır. Olanaklar arasında NOS (süperoksit yanı sıra nitrik oksit üretebilen), NADPH oksidazlar, mitokondriyal elektron taşınması ve lipit peroksidazlar bulunur [28].



Şekil 2-1 Uzun süreli potansiyel artışının (LTP) mekanizması [26]

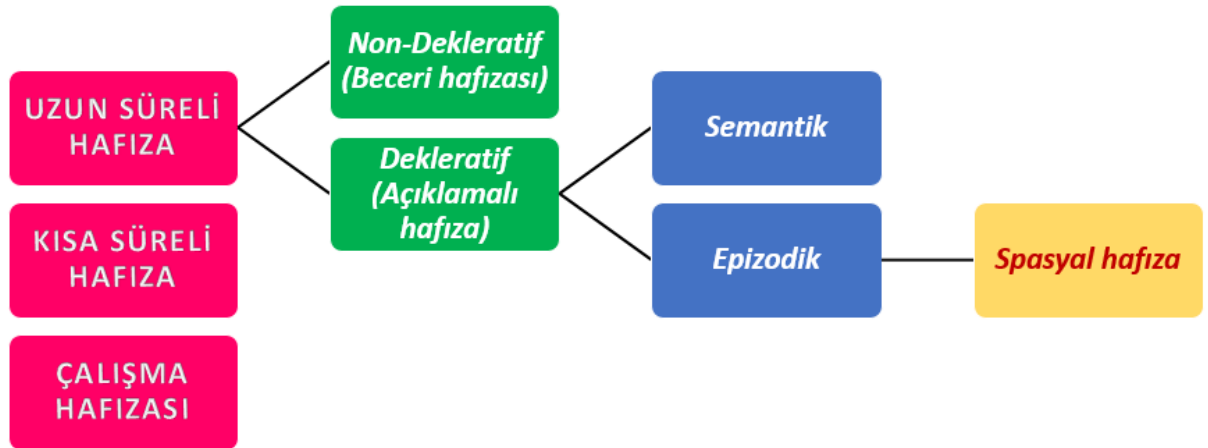
NMDA reseptör poru bir magnezyum iyonu tarafından bloke edildiğinden, zayıf bir elektrik stimülasyonu ile glutamat salımı sadece AMPA reseptörünü aktive eder. Güçlü bir elektriksel uyarım, postsinaptik zarın magnezyum iyonunun NMDA reseptör porundan uzaklaştırılmasına yetecek kadar depolarize edebilir. Böylece glutamat, bir ikincil haberci vasıtasıyla, AMPA reseptörlerinin işlevini veya sayısını artıran Ca^{+2} akışına izin vermek için NMDA reseptörünü aktive edebilir. (NMDA: N-metil-D-aspartat; AMPA: alfa-amino-3-hidroksi-5-metilizoazol-4-propriyonik asit; Ca^{+2} : Kalsiyum)

Hafızayı süreçler ve sistemler açısından tanımlayabiliriz. Hafıza süreç açısından kodlama (bilginin kaydedilmesi ve hafızadaki bilgilerle bağlantısının kurulma süreci), konsolidasyon (bilginin depolanmadan önce protein sentezi, gen ekspresyonu ve sinapsların güçlenmesiyle kalıcı hale getirilme süreci) ve geri çağırma (beynin farklı bölgelerinde depolanan bilginin hatırlanma süreci) olarak tanımlanan üç aşamaya yayılır.

Zihinde kalma süresine göre hafıza; kısa süreli hafıza ve uzun süreli hafıza olarak ayrılmaktadır (Şekil 2-2) [27]. Bu genel sınıflandırma dışında, frontal lob ile ilişkili olarak çalışma hafızası denilen bir başka hafıza türü bulunmaktadır (Şekil 2-2) [27]. Çalışma hafızası, zihinsel sorgulama sürecinde kullanılan, ama sorun çözümlendikçe her aşamada sonlandırılan, genellikle kısa erimli hafıza niteliğindedir [25].

Hafıza, bilginin türüne göre ise açıklamalı (dekleratif) hafıza ve beceri hafızası olarak sınıflandırılmaktadır (Şekil 2-2) [27]. Açıklamalı hafıza olayların ve gerçeklerin bilinçli bir şekilde hatırlanmasını ifade etmektedir. Belli bir zaman ve mekan bağlamında öğrenilen ya da yaşanan şeylere ilişkin uzun süreli hafıza anlamına gelen epizodik (anısal) hafızayı ve belli bir yer ve zamanla ilişkisi olmayan bilgileri içeren olgusal (semantik) hafızayı kapsamaktadır.

Epizodik, semantik, çalışma, prosedürel (beceri), algısal olmak üzere en az beş hafıza sistemi sayılabilir. Epizodik hafıza ile bağlantılı olduğu düşünülen mekansal veya spasyal hafıza; kişinin yer ve uzaydaki nesneler arasındaki ilişkiyi hatırlamasını sağlayan bilişsel bir süreçtir [24]. Spasyal hafıza kişinin etrafındaki nesneler hakkında topladığı bilgilerle oluşturulmaktadır. Bilgilerin konsolidasyonu için olduğu gibi spasyal hafıza için de en önemli beyin bölgesi hipokampustur. Çalışmamızda spasyal hafızayı test etmek için en güvenilir yöntem olan Morris Su Labirenti testi [29] kullanılmıştır.



Şekil 2-2 Hafıza sınıflandırması.

Hafıza akılda kalma süresine ve bilginin içeriğine göre sınıflandırılır.

2.2. Spasyal hafıza oluşumundan sorumlu beyin bölgeleri

Literatürde spasyal hafızadan sorumlu beyin yapıları olarak hipokampus, frontal loblar ve parietal korteks önerilmektedir [29]. Duyusal yollar (görme, dokunma, duyma ve benzeri...) başlangıçta algısal nesnelerin, olayların ve bunların çıktılarının kimliği hakkında bilgiyi işler ve daha sonra multimodal kortikal alanlara aktarılır. İşlenen bilgiler, olay hafızasında kritik olarak yer alan medyal temporal loba (MTL) gönderilir. Özellikle, peririnal korteks ve lateral entorinal alan, spesifik nesnelerin

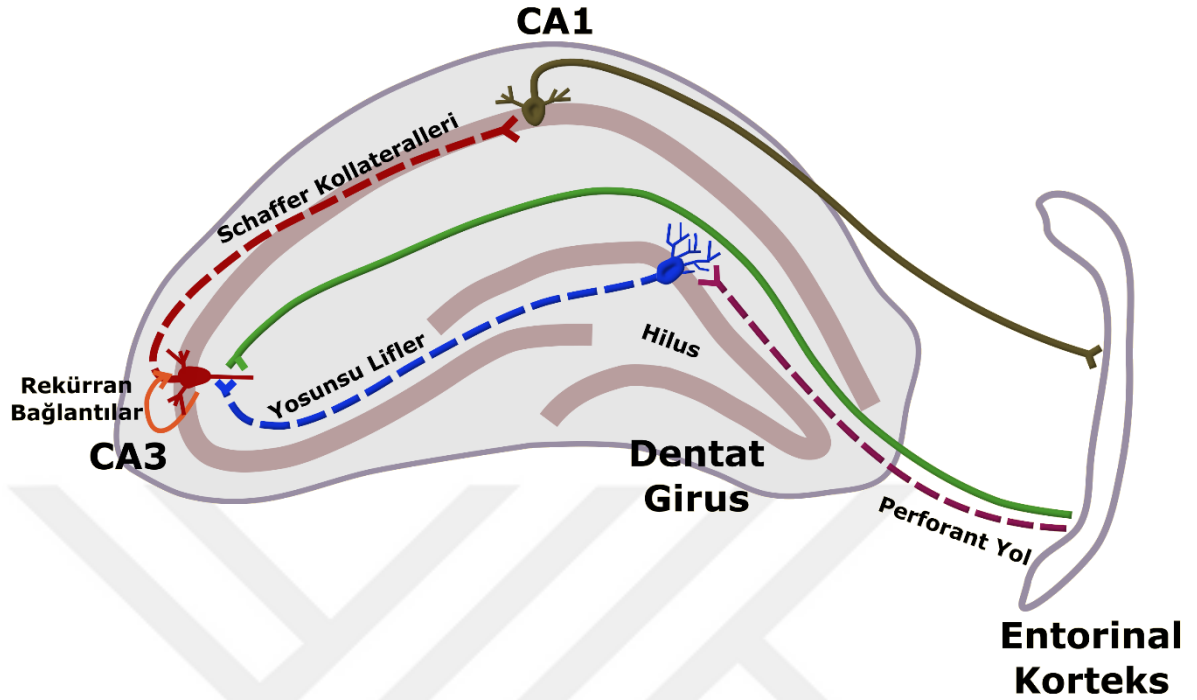
bilgilerini ve aşinalıklarını belirler, oysa parahipokampal korteks ve medyal entorinal alan, akılda kalıcı olayların meydana geldiği mekansal bağlamları işlemede rol oynar. MTL içinde, bilgi akışları hipokampus seviyesinde birleşir. Bu anatomik organizasyonun doğal bir sonucu olarak, hipokampus bilginin hızlı kodlanması ve olayların birbirine bağlı anılarını oluşturmak için gereklidir [30]. Hipokampus çıktılarını medyal prefrontal kortekse (mPFC) gönderir. Frontal korteks, talamus, hipotalamus, hipokampus ve amigdala gibi tüm önemli duyu aferent sistemlerinden girdi alır. Bu projeksiyonların çoğu karşılıklıdır ve frontal korteksten de bu sistemlere projeksiyon vardır. Frontal korteks bu karmaşık bağlantı ağları ile özellikle planlama, sıralama ya da koordinasyon ve çoklu bilgilerin entegrasyonunu koordine eder. Frontal korteks anıların organizasyonu, konsolidasyonu ve geri çağırılmasında etkilidir [31]. Bu tezde spasyal hafıza için kritik beyin bölgesi olan hipokampusa odaklandık.

2.2.1. Hipokampus

Hipokampus temporal lobun medyal kısmında bulunur ve lateral ventrikülün temporal hornu ile yakın komşuluk içindedir [32]. Hipokampus, üzerinde en fazla klinik ve laboratuvar çalışma yapılan beynin en plastik bölgelerinden biridir. Bugün sadece hipokampus üzerine yapılan çalışmaları yayımlayan “Hippocampus” isimli uluslararası bir dergi bile vardır [32].

Hayvanlarda yapılan deneyler, hipokampustaki birçok sinir hücresinin yer hafızasını taşıdığını ve hayvan bildik yerlerden geçerken bu sinirlerde aktivasyon olduğunu göstermiştir [32]. 1970’lerde bu konum (yer) hücrelerinin O’Keefe tarafından keşfi, hipokampusun, çevre topografyasının sinir sistemindeki temsilini oluşturan bilişsel bir harita olduğu düşüncesini ortaya çıkartmıştır [32]. Gerçekten de sağlam bir hipokampus olmaksızın insanların nerede olduklarını bilmesi ve gidecekleri yolu saptaması olanaksız hale gelmektedir [32]. Beyin görüntüleme teknikleriyle, yön bulma çabasındaki insanların hipokampuslarının çok daha aktif çalıştığı görülmüştür. Ayrıca, hipokampus, bilinen mekanlarda kestirme yolların bulunması konusunda da role sahiptir. Örneğin, Londra’daki taksi şoförleri işe başlamadan sıkı bir testten geçerler ve kendilerinden pek çok yeri ve aralarındaki en kısa yolları bilmeleri istenir. London College Üniversitesi’nde yapılan araştırmada taksi şoförlerinin hipokampuslarının daha büyük olduğu, şoför deneyimi arttıkça bu büyüklüğün de daha fazlaştığı saptanmıştır [32].

Koronal planda, hipokampus Cornu Ammonis 1-3'e (CA1-CA3) ve (çoğunlukla hilus alanı olarak adlandırılan ve dentat girusun bir parçası olduğu düşünülen) CA4'e bölünebilir [32]. Nöral bilginin işlenmesinde hipokampusun her bir bölgesinin ve bölgeler arası bağlantıların rol oynadığı bilinmektedir. Hipokampal ağın omurgasını entorinal korteks (EK), dentat girus (DG), CA3 ve CA1 arasındaki bağlantıları içeren trisinaptik devre oluşturur. Başka bir deyişle hipokampusun 3 ana yolağı vardır (Şekil 2-3) [33]. DG, hipokampusta anahtar konumdadır. Kortikal girdiler hipokampusa DG'den girer. EK'den gelen uyarılar glutamaterjik eksitatör sinaptik bağlantılarla DG granüler hücreleri dendritlerine yayılır (perforant yolak) [33]. Trisinaptik halkanın ikinci yolu DG'nin CA3 ile yaptığı sinaptik bağlantıdır. DG granüler hücrelerinin aksonları CA3'teki piramidal hücrelerle yosunsu lifler aracılığıyla seyrek fakat güçlü bağlantılar yapar (yosunsu lifler yolağı). CA3 piramidal nöronlarından Schaffer kollateralleri ile CA1 piramidal nöronlarının dendritlerine yayılım ile trisinaptik yol tamamlanır (schaffer kollateral yolağı). CA1'den ya direkt olarak çeşitli kortikal alanlara (frontal, anterior singulat, orbitofrontal gibi) ya da EK üzerinden bu alanlara projeksiyon vardır; yani CA1 hipokampustan çıkış bölgesidir. Böylece beynin çeşitli kısımlarından bilgi EK üzerinden hipokampusa gelir, işlenir, konsolide edilir ve bütün beynin aktivitesini etkilemek için EK'ye geri döner [33]. Hipokampustaki yolakların yüksek frekanslı uyarılması sinaptik etkinlikte artış olarak bilinen LTP oluşumuna neden olur. Daha önce de ifade ettiğimiz gibi LTP'nin uzun süreli hafıza oluşumunda önemli rolü vardır. Trisinaptik devre bilginin kodlanması sırasında aktif rol oynar [10].



Şekil 2-3 Hipokampus alt alanları ve hipokampal devre [33]

Beynin çeşitli kısımlarından bilgi entorinal korteks üzerinden hipokampusa gelen bilgiler ya dentat girusa uğrayarak ya da doğrudan CA3'e iletilir (Perforant yol). Buradan kalkan Schaffer kollateralleri CA1'e uzanır. CA1 hipokampusun çıktı kapısıdır. Bilgiyi kortikal alanlara gönderir.

2.3. Öğrenme ve hafıza oluşumuna etkili sinyal molekülleri

Birçok faktör öğrenme ve hafıza işlevi üzerine olumlu ve olumsuz etkilere sahiptir. Bu faktörler arasında en çok bilinenler stres, yaşlanma, alkol ve madde bağımlılığının negatif etkisi, kalori kısıtlaması ve zengin çevrenin pozitif etkisidir. Bu etkenler beyinde bir takım modülatörlerin düzeyini değiştirerek etkilerini göstermektedir. Yapılan çalışmalar, öğrenme ve hafıza fonksiyonunun nörobiyolojik temelini oluşturan LTP için beyin kökenli nörotrofik faktör (BDNF) ve NO'nun kritik önemini göstermiştir. Ayrıca kognitif fonksiyonların bozulduğu nörodejeneratif hastalıkların patogenezinin sorumlu olduğu kabul edilen oksidatif stres moleküllerinin, son yıllarda ilginç olarak sinaptik plastisite ve hafıza oluşumunda sinyal molekülü olarak görev yaptığını rapor eden çalışmalar bulunmaktadır.

2.3.1. Beyin kökenli nörotrofik faktör (BDNF)

BDNF nöronların gelişiminde önemli rol oynayan nörotrofin ailesinin bir üyesidir. BDNF ve onun yüksek afiniteli reseptörü TrkB, gelişmekte olan ve yetişkin

sinir sisteminde yaygın olarak eksprese edilir. BDNF, beyinde, özellikle hipokampusta yüksek konsantrasyonlarda bulunur [34]. Neredeyse otuz yıl önce keşfedilmesinden bu yana, merkezi sinir sistemi (MSS) nöronlarının farklılaşması ve hayatta kalmasının BDNF ile sıkı sıkıya ilişkili olduğu bilinmektedir. Daha yakın zamanlarda BDNF ayrıca MSS'de öğrenme ve hafızanın altında yatan sinaptik plastisite mekanizmalarının önemli bir regülatörü olarak ortaya çıkmıştır. Öte yandan BDNF sinyali mitokondriyal biyogenezi, protein kalite kontrolünü ve hücrelerin oksidatif, metabolik ve proteotoksik strese karşı direncini düzenleyen proteinler de dahil olmak üzere proteinlerin ekspresyonunu da artırır [35].

Fizyolojik ve biyokimyasal kanıtlar BDNF fonksiyonunda NMDA reseptörlerinin (NMDAR) bir hedef olduğunu rapor etmişlerdir. Gerçekten de glutamaterjik sistemler ve BDNF arasında karşılıklı/çift yönlü bağlantılar vardır [36]. Nöronal aktivite, sinapsların işlevini modüle eden BDNF geninin transkripsiyonunu uyarır. BDNF'nin de NMDAR aktivasyonu ile hipokampal nöronlar arasındaki sinaptik iletiyi hızlı bir şekilde artırdığı gösterilmiştir [37]. BDNF'nin aktiviteye bağlı salınımında bozukluğa neden olan, BDNF genindeki Val66Met polimorfizmi ("BDNF fonksiyon kaybı alleli") epizodik hafızayı etkiler [38]. Bu da BDNF'nin hipokampusta sinaptik plastisite üzerinde doğrudan bir etkiye sahip olduğunu gösterir. Ayrıca AMPA reseptörlerinin aktivasyonunun BDNF ekspresyonunu artırdığı gösterilmiştir. Uzun süreli hafıza oluşumunda olduğu gibi, sinaptik olayların uzun süreli kodlanması AMPA reseptörü stabilizasyonu ve korunmasını gerektirir [39]. BDNF'nin de AMPA reseptörlerinin ve ilgili proteinlerin uzun süreli korunmasını sağlayarak sinaptik konsolidasyonda kilit bir düzenleyicisi olduğu bildirilmiştir [39]. Öte yandan stres hormonu olan glukokortikoidler BDNF sinyallerini engelleyerek spin yoğunluğunda azalma ile sinaptik plastisitede, nörogenizde ve LTP'de azalmaya yol açar.

Bunların yanı sıra BDNF'nin MSS'deki hem uyarıcı hem de inhibitör sinapsları düzenleme yeteneği sinaptik plastisite ve hafıza oluşumunda çelişkili sonuçlara yol açabileceğini düşündürmüştür. BDNF'nin yüksek bilişsel işlevler ve karmaşık davranışları etkilediği mekanizmalar hakkında bilgiler henüz tam olarak açık değildir,

LTP, sinaptik plastisite oluşumunda en önemli faktör olup öğrenmenin ve hafızanın hücresel bir karşılığı olarak kabul edilir. LTP, bir etkinlik kaynaklı sinaptik güçte sürekli artış olarak tanımlanır. LTP'nin indüksiyonu, BDNF tarafından aktive edilenler de dahil olmak üzere çok sayıda sinyalleşme kaskadının aktivasyonu ile

ilişkilidir. In vitro çalışmalar, ekzojen BDNF'nin, genç hipokampal kesitlerde LTP'nin indüksiyonunu teşvik ettiğini göstermiştir [40]. BDNF mutant farelerde ise LTP bozulmuştur [40]. Bu durum yüksek BDNF düzeylerinin iyileşmiş spasyal hafıza performansına neden olmasını açıklamaktadır [34]. Ayrıca, özellikle yaşlı yetişkinlerde azalmış BDNF seviyelerinin, hafızada bozulmaya, nörodejenerasyona ve diğer çeşitli kognitif bozukluklara yol açabildiği gösterilmiştir [34]. Ek olarak Morris Su Labirenti'nde öğrenme, BDNF mutant farelerde veya anti-BDNF antikorunun intraserebroventriküler infüzyonu yapılmış farelerde bozulmaktadır [38].

Sıklık adenosin monofosfat yanıt elemanı bağlayıcı protein (CREB), adaptif nöronal yanıtların kontrolünde yer alan bir transkripsiyon faktörüdür. CREB'in veya yakından ilişkili bir proteinin, sinaptik aktiviteyi modüle eden bir nörotrofin olan BDNF'nin Ca^{+2} 'ye bağlı düzenlenmesine aracılık ettiğini gösteren deneyler bulunmaktadır [41]. Kortikal nöronlarda, Ca^{+2} akışı, BDNF genindeki kritik bir Ca^{+2} tepki elemanına bağlanarak, BDNF transkripsiyonunu aktive eden CREB'in fosforilasyonunu tetikler. BDNF CRE'nin veya bitişik yeni bir düzenleyici elemanın mutasyonunun yanı sıra CREB fonksiyonunun blokajı, BDNF transkripsiyonunun dramatik bir kaybına yol açmıştır [41]. Bu bulgular BDNF geninin protein ürününün CREB ailesi hedefi olduğu sonucuna götürmüştür. CREB ailesi, Drosophila'dan memelilere kadar çeşitli organizmalarda sinaptik plastisitenin önemli bir regülatörü olarak görülmektedir. CREB ailesinin ürünleri sinapslardaki gen ürünlerini düzenleyebilir ve BDNF transkripsiyonu bir CREB aile üyesi tarafından kontrol edilir [41].

BDNF'den başka ekstraselüler sinaptik haberci olan NO, bazı LTP türlerine aracılık eden önemli hücreler arası sinyal molekülüdür [42-43]. NO ve BDNF, hipokampusun CA1 bölgesinde LTP oluşumunda potansiyel retrograd habercilerlerdir [44]. Sinaptik seviyede NO ve BDNF sinyal yolları arasında olası karşılıklı etkileşimler olduğu rapor edilmiştir [45]. Bununla birlikte, BDNF'ye yanıt olarak NO üretimi ve NO'nun depolarizasyon indüklü sinaptik BDNF sekresyonu üzerindeki etkileri, henüz tam olarak anlaşılamamıştır [45-46].

2.3.2. Nitrik oksit (NO)

NO, sayısız moleküler hedefe sahip, alışılmışın dışında bir haberci moleküldür. NO, nörotransmisyon veya vasküler tonus gibi fonksiyonları kontrol eder, gen transkripsiyonunu ve mRNA translasyonunu düzenler ve proteinlerin translasyon

sonrası modifikasyonlarında rol alır [47]. Keşfedilmesinden otuz yıl sonra bile NO'nun farklı rolleri tespit edilmeye devam etmektedir. NO öğrenme hafıza da dahil olmak üzere sinaptik plastisitede rol alan serbest radikal bir gazdır [40]. NO, L-arjininin sitrüline dönüşümü sırasında nitrik oksit sentaz (NOS) aracılığıyla üretilmektedir [48]. NOS'un üç izoformu bulunmaktadır: Nöronal NOS (n-NOS, NOS-I), indüklenebilir NOS (i-NOS, NOS-II) ve endotelyal NOS (e-NOS, NOS-III). Hipokampus da dahil olmak üzere beynin birçok bölgesinde her üç NOS da bulunmaktadır [48].

NO, beyinde hücre haberleşmesinde önemli bir rol oynayan ancak klasik olmayan bir nörotransmitter olarak tanımlanmıştır, çünkü sinaptik vesiküller içinde depolanmaz ve membran depolarizasyonunda serbest bırakılmaz, ancak sentezlendiği zaman serbest bırakılır. NO, membrana bağlı reseptörler aracılığı ile etki etmez, ancak bir nörondan diğerine difüze olur ve doğrudan hücre içi bileşenlere etki eder. Hedef hücrelerde siklik guanozin monofosfat (cGMP) oluşturmak için çözünebilir guanilil siklazı uyarır.

Hipokampusta oluşturulan NO'nun sinaptik plastisite, LTP oluşumu, öğrenme ve hafıza süreçlerinde önemli rol oynadığını gösteren çok kanıt vardır. NO inhibisyonu veya NOS'un genetik olarak silinmesi, hipokampusun CA1'inde LTP'de azalmaya yol açar ve dolayısıyla hafıza süreçlerini etkileyebilir [49-50]. eNOS ve nNOS'un hipokampal LTP'ye katkıda bulunabileceği bildirilse de katkısının derecesi tartışmalıdır [50-51]. NOS'a bağlı LTP, özellikle daha zayıf sinaptik uyarımda gözlemlenirken, daha güçlü yüksek frekanslı uyarılma NOS bağımsız LTP oluşturabilir [52].

LTP sürecinde NMDA reseptörünün glutamat ile aktivasyonundan sonra hücre içine Ca^{+2} akışı olmaktadır. Ca^{+2} nNOS'u aktive ederek NO üretimini sağlamaktadır. NO ise cGMP üretimi üzerine etkilidir. NO gaz yapısı sayesinde presinaptik hücreye yayılabilmekte ve daha fazla glutamat salınımını uyarmaktadır [53]. Böylece hem sinaptik plastisite hem de glutamat vesiküllerinin yenilenmesini sağlayan cGMP üretimi artmaktadır. Post-sinaptik olarak, NO, nörotransmisyonu güçlendirir ve LTP'de rolü olan transkripsiyon faktörü CREB'in cGMP'ye bağlı aktivasyonuna aracılık eder [53]. Bununla birlikte, NO ve NO türevli reaktif nitrojen türleri, enzim, iyon kanalı ve reseptör ile etkileşime girebilmektedir. Böylece NO'nun hafıza oluşum sürecine etkisinin cGMP'ye ek olarak NO-türevli radikaller aracılığı ile olduğu da rapor edilmiştir [54].

Hayvan çalışmaları, nNOS'un farklı inhibitörler tarafından bloke edilmesinin, hafıza ve öğrenmeyi engellediğini ve hayvana NO verildiğinde bunun tersine çevrildiğini göstermiştir [53]. Dahası, spasyal hafızada iyileşmeye, sıçanların hipokampusundaki NOS aktivitesindeki artışın eşlik ettiği gösterilmiştir [55]. NO'nun kan damarlarını dilate ederek beyne kan akımını arttırdığı bilinmektedir [56]. Bu etkinin NO'nun nöronal aktiviteyi indüklemesinde, dolayısıyla öğrenme hafızanın iyileşmesinde önemli olduğu kabul edilmektedir. Ancak, kan akımını etkilemeyen nNOS'un inhibitörlerinin öğrenme ve hafıza fonksiyonun bozulmasına neden olması NO öğrenme hafıza üzerine etkisinin sadece kan akımı ile açıklanamayacağına ve NO'nun nöronal etkisinin önemine dikkat çekmiştir [57]. Ayrıca NO'nun nörokoruyucu ve nörotoksik etkisi de rapor edilmektedir. eNOS ile üretilen NO'nun nörokoruyucu olduğu, nNOS veya iNOS aracılı üretilen NO'nun nörotoksik bir etkiye yol açtığı görülmüştür [28]. Bu farklı etkiler, üretilen NO miktarları ve sentezlenme zamanlaması ile açıklanabilir; eNOS tarafından düşük seviyede ve çok erken sentez, lokal vazodilatasyon etkisi ile faydalı olurken, nNOS veya iNOS tarafından yüksek seviyelerde NO üretiminin, esas olarak oksidatif stres nedeniyle nörotoksik olabileceği ileri sürülmüştür [26]. Ayrıca eNOS'unda patern ayrımı ve konsolidasyon fonksiyonu olduğu gösterilmiştir. eNOS'un kan akışını ve dolayısıyla da konsolidasyona aktif olarak dahil olan beyin bölgelerine glukoz ve oksijeni arttırmak için gerekli olduğu bildirilmiştir

BDNF ve NO öğrenme, hafıza işlevi ve sinaptik aktivitede benzer etkiye sahiptirler. NOS'un inhibe edilmesiyle, spasyal hafıza oluşumunda ve hafıza retansiyonunda esas rol oynayan BDNF'nin hipokampal düzeyleri azalmış ve spasyal hafıza bozulmuştur [48]. Olgunlaşma sırasında beyin NOS dağılımındaki değişimler, NO'nun beyin işlevsel farklılaşmasında rol oynayabileceğini düşündürmüştür. Gelişen beyinde serebral kan akımı ve NOS aktivitesinin artmasıyla sinaptogenezin doğru orantılı olduğu da gösterilmiştir [48].

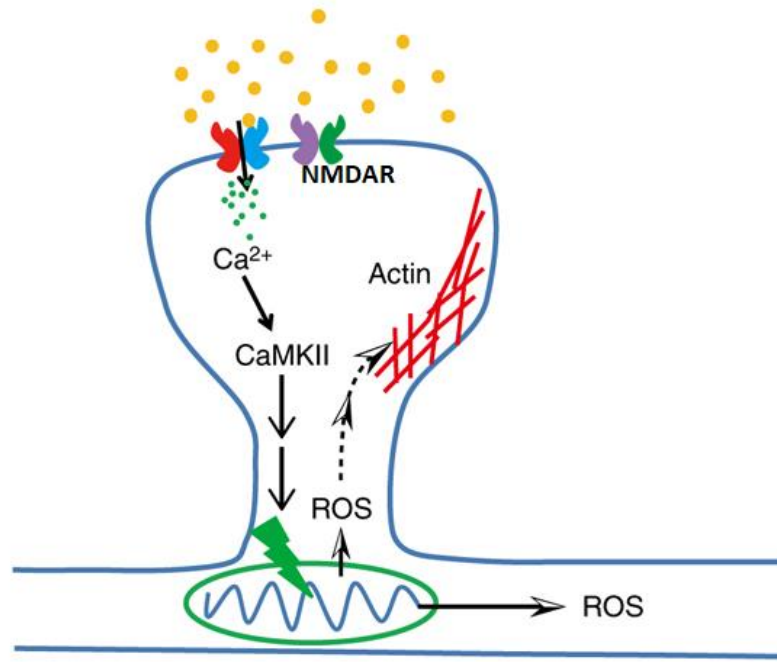
2.3.3. Oksidatif stres molekülleri

Reaktif oksijen türleri (ROS) moleküler oksijenin indirgenmesinden kaynaklanan kimyasal olarak reaktif moleküllerdir [58-59]. Son on yılda, sinir sisteminde ROS'un biyolojik aktivitesinin araştırılması özellikle ilgi görmüştür. ROS oldukça kararsız ve reaktif moleküller olduğu için, potansiyel olarak birçok hücresel süreçlere müdahale etme yeteneğine sahiptirler. ROS proteinler ve nükleik asitlerle

reaksiyona girebilir ve hücrel işlevlerini bozabilir. Tipik olarak oksidatif stres, ROS'un zararlı etkilerinin, biyolojik sistemlerin oksitleyici ajanları nötralize etme ve hücrel hasarı onarma yeteneğini aşması durumunda ortaya çıkar [59]. Fonksiyonel olarak aktif nöronların oksijen tüketimi ve ROS üretimi artmaktadır [60].

Beynin güçlü oksidatif mekanizması büyük miktarda ROS üretmesine rağmen süperoksit dismutaz, katalaz ve peroksidazlar olmak üzere çeşitli enzimlerden oluşan antioksidan sistem ile elimine edilir.

Bununla birlikte, ROS'un sadece hücrel sağlığı tehdit eden zararlı moleküller olduğu düşüncesi son yıllarda gözden geçirilmiştir. MSS'nin en dikkat çekici ve önemli özelliklerinden biri, bilginin sinaptik değişikliklerle işlenmesi ve saklanmasıdır. Sinapsların uyarılara cevap olarak kendi güçlerini değiştirebilme kapasitesi sinaptik plastisite olarak adlandırılır. İlginç olarak ROS'un sinaptik plastisite ve hafıza oluşumunun uygun şekilde uyarılması için kritik sinyal molekülleri olduğu kabul edilmektedir. Sinaptik yapısal ve fonksiyonel değişiklikleri indükleyen kinaz proteinlerinin birçoğu, aktiviteleri ROS seviyeleri sayesinde modüle edilebildiğinden, belirli bir redoks ortamı gerektirir. ROS'un hipokampusta CREB, ekstraselüler sinyalle düzenlenen kinaz (ERK), kalsiyum/kalmodulin kinaz II (CaMKII), NMDA reseptörleri, kalsiyum ve potasyum kanalları gibi sinaptik plastisite ile ilişkili sinyal kaskadları tetikleyen küçük sinyalleşme molekülleri olarak hareket ettiği gösterilmiştir [59]. LTP sürecinde yeni dendritik spinlerin oluşumunda ROS'un spinlerin sağlamlaştırılmasını sağlayan bir haberci olarak davrandığı gösterilmiştir (Şekil 2-4) [28]. Ayrıca, NOS'un sadece NO üreterek değil, aynı zamanda NADPH oksidasyonu ve süperoksit üretimi ile sinaptik plastisite ve hafızaya katkıda bulunabileceği' de rapor edilmiştir [61].



Şekil 2-4 Dendritik dikenlerin yapısal plastisitesinde reaktif oksijen türleri sinyallemesinin olası rolünün şematik özeti [28]

Ca²⁺: Kalsiyum; CaMKII: Kalsiyum kalmodulin bağımlı protein kinaz II; NMDAR: N-metil-D-aspartat reseptörü; ROS: Reaktif oksijen türleri

Fakat aynı zamanda beyindeki aşırı ROS birikimi hücrel oksidatif hasara yol açabilir. ROS'un pozitif ve negatif etkileri arasındaki sınır hala belirsizdir, çünkü hücrelerdeki oksijen metabolizması, iç içe geçen transdüksiyon hücrel yollarını kullanarak, genellikle hem fizyolojik hem de patolojik sonuçları indükler.

Lipit peroksidasyonu, genellikle serbest radikaller gibi oksidanların, karbon-karbon çift bağlarına, özellikle çoklu doymamış yağ asitleri içeren lipitlere bir işlem olarak tarif edilebilir [62]. Son kırk yıldır, lipit peroksidasyonunu rapor eden yayınlar hücre biyolojisi ve insan sağlığı açısından önemli rolünü göstermiştir. Doymamış lipitlerle oksijenin lipit peroksidasyon reaksiyonu, çok çeşitli oksidasyon ürünleri üretir. Lipit peroksidasyonunun ana ürünleri lipit hidroperoksitlerdir. Lipit peroksidasyon sırasında sekonder ürünler olarak oluşturulabilen birçok farklı aldehitler arasında, malondialdehid (MDA), propanal, heksanal ve 4-hidroksinonenal vardır. MDA uzun yıllardır lipit peroksidasyonu için bir biyobelirteç olarak yaygın olarak kullanılmaktadır [58]. Enzimatik işlemlerle MDA üretimi iyi bilinir ancak MDA'nın biyolojik fonksiyonları ve olası doza bağlı ikili rolü üzerinde az çalışılmıştır. Şimdiye kadar,

sadece birkaç makale MDA'nın haberci olarak hareket ettiğini ve gen ifadesini düzenlediğini bildirmiştir.

2.4. Öğrenme ve hafıza üzerine etkili dış faktörler

Yaşamın erken dönemlerinde maruz kalınan bir çok uyaran, fizyolojik ve davranışsal gelişimi etkilemektedir. Çevre ile etkileşim, yaşam boyunca bilişsel fonksiyonlar için gerekli nöronal yapılanmada kritik rol oynamaktadır. Birçok faktör öğrenme ve hafıza işlevi üzerine olumlu ve olumsuz etkilere sahiptir. Bu faktörler arasında en çok bilinenler stres, yaşlanma, alkol ve madde bağımlılığının negatif etkisi, kalori kısıtlaması ve zengin çevrenin pozitif etkisidir. Bu etkenler beyinde bir takım modülatörlerin düzeyini değiştirerek etkilerini göstermektedir.

2.4.1. Kronik stres

Stres yaşamımızın ayrılmaz bir parçasıdır ve neredeyse tüm hastalıklarla ilişkilendirilen ve üzerinde en çok çalışılan olgudur. Strese maruz kalmak Hipotalamo-Pitüiter-Adrenal (HPA) aksı harekete geçirir ve sırasıyla hipotalamus, anterior hipofiz ve adrenal korteksten kortikotropin serbestletici hormon, adrenokortikotropin ve glukokortikoidlerin salınımının artmasına neden olur. Glukokortikoidler, nükleer reseptörler yoluyla genleri düzenleyerek çeşitli proteinlerin ekspresyonunu etkileyerek enerji ve metabolizmada stres kaynaklı değişikliklerle başa çıkmak için organizmayı hazırlar [63].

Kronik stresin aşırı bir HPA eksenini aktivasyonuna yol açtığı bilinmektedir, bu da aşırı bir glukokortikoid üretimine sebep olur. Sonuç olarak, hipokampus, frontal korteks, amigdala, dorsal striatum, nükleus accumbens ve beyin sapı gibi çeşitli beyin bölgelerindeki nörokimyasal ve nöroanatomik değişiklikler gözlemlenebilir. Özel olarak hipokampusta yüksek bir glukokortikoid reseptör yoğunluğu bulunmuştur [64]. Kronik stres, anksiyete, depresyon, travma ve kognitif bozuklukların ortaya çıktığı pek çok hastalığın patogenezinin sorumlu tutulmaktadır [65].

Stres hipokampus bağımlı deklaratif hafıza performansı dahil olmak üzere farklı hafıza süreçlerini etkiler. Stresin hafıza üzerine hem pozitif hem de negatif etkiye sahip olabileceği kabul edilmektedir. Akut ve tolere denebilir stres hafızayı güçlendirirken, kronik ve yüksek düzeyli stresin hafıza üzerine olumsuz etkileri bildirilmiştir [66]. Ayrıca hafıza fonksiyonuna ilişkin bilgi işlemedeki tüm fazlar (bilgi edinme-kodlama, konsolidasyon, geri çağırma), stresle bozulmaya eşit ölçüde hassas değildir. Stres

hormonu olan glukokortikoidlerin (insanda kortizol, kemirgenlerde kortikosteron) hafıza konsolidasyonunu artırdığı, ancak hafızanın geri çağırılmasını bozduğu bildirilmiştir [67].

Kronik stresin, hipokampus üzerindeki etkisini nöronal organizasyon seviyesinde anlayabilmek yapılan çalışmalarda; kronik stresin hipokampusta CA1 ve CA3 bölgelerinde dendritik diken kaybına neden olduğu, ayrıca DG'de yeni nöronların oluşumunu baskıladığı, bu etkilerle tutarlı olarak, hipokampusta nöronal büyümenin ve morfolojik plastisitenin kilit bir düzenleyicisi olan BDNF düzeyini azalttığı rapor edilmiştir. Özellikle CA3 bölgesinin stresin etkilerine en savunmasız bölge olduğu gösterilmiştir [68]. Bu bağlamda, stres altındaki kemirgenlerde hipokampusa bağımlı spasyal öğrenme görevlerinde kötü performans sergiledikleri gösterilmiştir [69].

Kronik stresin bilişsel değişikliklere etkisinde yaş ve cinsiyetin önemli bir faktör olduğu kabul edilmektedir. Farklı yaşlarda strese cevap değişebilmekte ve bir yaşam döneminde yaşanan stres gelecekteki kognitif işleyişi etkileyebilmektedir. Deneysel çalışmalar daha çok erkek sıçanlarda yapılmış olduğundan cinsiyet farkı konusunda bilgi eksiktir ancak son zamanlarda yapılan çalışmada kronik immobilizasyon stresine maruz kalan erkek ve dişi sıçanlardan erkek olanlarda spasyal hafızanın daha çok bozulduğu gösterilmiştir [70]. Ayrıca erkek kemirgenlerde stresin dişilere göre tüm yaşam süresi boyunca bozucu etkileri daha fazla gözlemlenmiştir [71]. Ayrıca adolesan dönemdeki stresin erişkin dönemde kognitif fonksiyonlarda derin etkiler ortaya çıkardığı bilinmektedir [72]. Adolesan dönem, çocukluktan yetişkinliğe geçiş sırasında kritik bir gelişim dönemidir ve yetişkinliğe hazırlık aşamasında sosyal ve bilişsel davranışların olgunlaşması için önemli bir noktadır [73]. Yetişkinliğe göre adolesan dönem, stres yatkınlığı için kritik bir zaman penceresidir. Adolesan dönemde yaşanan stres genellikle yetişkinlikte mental sorunların gelişiminde artışa yol açar. Hayvan modelleri adolesan dönemde stresin yetişkinlikte depresif ve anksiyete benzeri davranışları arttırdığını göstermiştir [73]. Ancak çelişen raporlar olsa da, gelişme sırasındaki olumsuz deneyimlerin, yetişkinlik dönemindeki olumsuz ya da stresli ortamlara karşı dayanıklılığı artırdığını bildiren sonuçlar da vardır. Örneğin, adolesan sıçanlarda aralıklı uygulanan yırtıcı stresinin yetişkinlikte daha fazla direnç oluşturduğu bildirilmiştir [73].

Stresin neden olduğu etkilere, merkezi nörotransmitterler, nörohormonal faktörler, serbest radikal üretimi gibi farklı mekanizmaların neden olabileceği rapor

edilmiştir [74]. Öte yandan stresin sonuçları öngörülebilir veya öngörülemez doğasıyla ilişkili olabileceği kabul edilmektedir.

Kronik öngörülemeyen stres modeli, kemirgenlere günlük olarak farklı stres oluşturunuculardan rastgele uygulanır. Bu şema, diğer kronik stres modellerinde görülen stres adaptasyon sürecini önler. Stresin zararlı etkileri ortaya çıkar. Bu modelde, hayvanlar ayak şokları, kısıtlama stresleri, ortamın ısıtılıp soğutulması, ışık-karanlık döngüsünü tersine döndürme, hoş olmayan sesler, kafesteki değişiklikler de dahil olmak üzere geniş stres faktörlerine 2 ila 5 hafta süreyle maruz kalmaktadır [75].

Kısıtlama ve immobilizasyon stres protokolleri, laboratuvar hayvanlarında strese bağlı davranışsal, biyokimyasal ve fizyolojik değişikliklerin indüklenmesi için en çok kullanılan prosedürlerdir [76].

2.4.2. Öngörülebilir kronik stres

Tahmin edilebilir kronik hafif stres, öngörülebilirlik, hafif yoğunluk ve stres maruziyetinin uygun bir süresi ile karakterize edilir [73]. Öngörülebilir kronik hafif stresin duygudurum, öğrenme, hafıza ve hipokampal nöroenez üzerindeki etkileri yeterince bilinmemektedir. Bu konuda henüz bir iki çalışma bulunmaktadır. Tahmin edilebilir kronik hafif stres uygulaması nöral kök hücreleri uyararak ve nöroenezini artırarak yetişkin sıçanlarda ruh halini, öğrenmeyi ve hafızayı güçlendirmiştir [73].

Adolesan dönemde kronik öngörülemeyen stres, stresle başa çıkma becerisini ve bilişsel esnekliği bozar. Kronik immobilizasyon stresi anksiyete benzeri davranışı artırır. Aksine, öngörülebilir kronik hafif stresin, sabit bir zaman penceresi içinde stres maruziyetinin, hipokampustaki nöroenezini artırarak yetişkin sıçanlarda ruh halini, öğrenmeyi ve hafızayı iyileştirdiği bildirilmiştir [19, 77].

Nüfusun çoğunluğu, öngörülebilir ve doğada göreceli olarak daha hafif olan bir tür kronik stres yaşamaktadır. Öngörülebilir stresin olası faydalı etkilerinin altında yatan mekanizmaları daha iyi anlamaya yönelik çalışmalara ihtiyaç olduğunu düşünüyoruz, Bu nedenle çalışmamızda bir gruba adolesan dönemde hafif derecede kronik öngörülebilir şiddet uygulanması tercih edilmiştir. Ancak literatürde öngörülebilir stres 5 dakika süreyle immobilizasyon stresi olarak uygulanmıştır [77]. Biz çalışmamızda, immobilizasyon stres uygularken serum kortikosteron düzeyini artıran minimum süreyi (10 dakika) dikkate aldık ve sıçanlara adolesan dönemde daha önce hiç çalışılmamış olan 15 dakika süreyle kronik öngörülebilir stres uyguladık.

2.4.3. Zengin çevre

Yaşamın erken döneminde bilişsel yetilerin kazanılmasında, zengin çevrenin bir bileşeni olan oyun ve oyuncaklar çok önemlidir. Hayvan modelleri aracılığıyla öğrenme ve hafızanın iyileştirilmesi için ya da yaşlanmanın hafıza üzerindeki etkilerini en aza indirecek stratejiler yoğun olarak araştırılmaktadır. Zenginleştirilmiş ortam bu stratejilerden biridir. Zengin çevre terimi genellikle kemirgenlere uygulanan bir çevresel manipölasyonu tanımlamak için kullanılır; oyuncak, tünel ve koşu tekerleği bulunan ve sosyal, fiziksel ve duyuşsal uyarım sağlamak için tasarlanmış geniş bir ortam olarak karakterize edilir. Bu paradigmada, sıçanlar duyuşsal, görsel, bilişsel ve motor stimölasyonu kolaylaştıran koşullarda yaşamaktadır. Mekansal değişiklik, yenilik ve fiziksel aktivite gibi bilişsel uyarılar beyin plastisitesini etkiler.

Erken dönemde maruz kalınan birçok etken, yaşam boyunca fizyolojik ve davranışsal gelişimi etkilemektedir. Çevre ile etkileşim, normal beyin işlevleri için gerekli sinaptik bağlantıların kurulmasında anahtar rol oynamaktadır [78]. Araştırmalar, kemirgenlerde zenginleştirilmiş bir ortamın, zengin çevrede büyümenin, beyinde yapısal ve fonksiyonel değişiklikler meydana getirdiği öğrenme ve hafıza performansını geliştirdiğini göstermiştir [79]. Bu deneyimlere bağlı bilişsel değişimlerin altında yatan moleküler mekanizmaları daha iyi anlamak için, yapılan çalışmalarda, zengin çevrenin sinaptik plastisite, öğrenme ve hafıza oluşumu ile ilgili pek çok genin ekspresyonunu artırdığı gösterilmiştir [80-81].

Zenginleştirilmiş bir ortama maruz kalmanın, korteks ve hipokampal dentat girus ve CA1 bölgesi de dahil olmak üzere diğer beyin bölgelerinde biyokimyasal ve yapısal değişiklikleri indüklediği gösterilmiştir [82]. Ayrıca zengin çevreyi takiben nörotrofin-3, BDNF ve sinir büyüme faktörünün hipokampal mRNA'larının arttığı gösterilmiştir [83]. Bu yapısal ve biyokimyasal değişikliklerin, genç yaşlarda zenginleştirilen sıçanlar yaşlılıkta öğrenme ve hafıza görevlerinde daha iyi performans gösterdiği için zenginleştirmenin uzun vadeli etkilerini hesaba katabileceği ileri sürülmüştür [84]. Tam tersine, adolesan dönem, genç erişkin ve erişkin yaş gruplarındaki sıçanlara zengin çevre uygulaması yapılan bir çalışmada spasyal hafızada herhangi farklılık tespit edilmemiştir [85]. Öte yandan, sıçanlarda, çeşitli gelişimsel çalışmalar, erken yaşam ortamının, hipokampal hacim ve hipokampal asimetriyi etkileyebileceği de rapor edilmiştir [86]. Bir çalışmada yenidoğanların maruz kaldığı yeni objeler, hipokampal asimetrisinin sağa kaymasına neden olmuştur [87]. Bu durum

zengin çevre uygulamasının hipokampal asimetri üzerine etkili olabileceğini düşündürmüştür.

2.5. Adolesan dönem ve beyin gelişimi

Beyin gelişimi anne karnında başlar ve adolesan dönemin sonuna kadar devam eder [88]. İnsan ve hayvanlarda adolesan dönemde fiziksel gelişme ile kognitif becerilerin gelişmesi birlikte olur. Adolesan dönem sıçanlarda doğumdan sonraki 21.günden itibaren başlar ve 60 güne kadar sürer. Doğumdan sonraki 21-34. günler arası puberte/erken adolesan, 34-46 güne kadar orta adolesan 46-59. günler geç adolesan olarak üç döneme ayrılabilir. Sıçanlar 60. günden itibaren erişkin kabul edilirler [89-91].

Adolesan dönem boyunca beynin hacmi, hücre proliferasyon hızı, dendrit yoğunluğu, dendritik dallanma, reseptör ekspresyonu, sinaptogenez artar [92]. Adolesan dönemin başında, sol ve sağ hemisfer dominansı belirginleşmeye başlar, spasyal hafıza fonksiyonu gelişir, kognitif performansta cinsiyete bağlı değişiklikler görülmeye başlar [93]. Kognitif fonksiyon ve strese cevap yeteneğini kontrol eden biyolojik değişiklikler genellikle adolesan dönemde ortaya çıkar. Stres bu gelişimsel mekanizmaları bozabilir ve yaşa bağlı kognitif bozukluklar dahil kalıcı fenotipik değişikliklere neden olabilir [94].

Adolesanlar en az üç nedenden dolayı strese daha duyarlı olabilirler [95-96].

(1) Adolesanlar, yetişkinlerle karşılaştırıldığında fiziksel ve psikolojik uyarılara tepki olarak daha yüksek glukokortikoid “stres” hormonları üretirler [97].

(2) Adolesanlar glukokortikoidlerin etkilerine daha duyarlı olabilirler [98].

(3) Stres regülasyonu ve öğrenme ve hafıza ile ilgili beyin bölgeleri ergenlik döneminde gelişmekte ve olgunlaşmaktadır [99].

Adolesan dönemdeki erkek sıçanların strese daha hassas olduğu, adrenokortikotropik hormon ve kortikosteron artışının daha fazla olduğu görülmüştür [100].

Hipokampus da dahil olmak üzere öğrenme ve hafıza süreçlerinde yer alan beyin yapıları, ergenlik döneminde çok sayıda glutamaterjik hücrenin budaması ve kaybolmasını ve beyaz madde yoğunluğundaki artışları içeren olgunlaşma süreçlerinden geçmektedir [101]. Stresin bu yapıların olgunlaşmasını değiştirebileceği ve daha sonraki yaşamda işlevlerini etkileyebileceği düşünülmektedir [102].

Ergenlik dönemindeki deneyimlerin yetişkin bilişini etkileyebileceği düşünüldüğünde, ergenlik döneminde strese maruz kalmanın öğrenme ve hafıza süreçlerini nasıl etkilediğini belirlemek, gelişimsel esnekliği ve yaşamsal sonuçları şekillendirmek için gelişimsel stres potansiyelini anlamak için kilit bir hedef olmayı sürdürmektedir.

2.6. Beyin asimetrisi

Günümüzde çok sayıda veri, sadece insanda değil, aynı zamanda bazı hayvan türlerinde iki beyin hemisferinin işlevsel, anatomik ve nörokimyasal olarak asimetric olduğunu göstermektedir [63, 103]. Beyin asimetrisi hem yapı hem de işlev seviyesinde tanımlanabilir. Birincisi, sol ve sağ hemisferler, hacim, yüzey alanları nöronal yoğunluk gibi özelliklerde nöroanatomik farklılıklar göstermektedir. İkincisi, beynin iki yarımküresi için fonksiyonel farklılıklar ya da fonksiyonel lateralizasyon vardır. Örneğin, sol hemisfer sözel bilişsel işlev için baskın hemisferdir ve sağ hemisfer mekansal kognitif işlev ve ruh hali için daha baskındır [104]. Asimetri bilginin verimli işlenmesi için bir avantaj olabilir çünkü bir hemisferin belli bir işleve yönelmesi diğer hemisferin serbest bırakır ve bu hemisfer diğer işlevleri yerine getirir [14, 104]. Beynin yapısı ve fonksiyonundaki sol-sağ asimetrisinin moleküler temeli, sinirbilimde açıklanacak en önemli meselelerden biridir. Bir zamanlar insanda var olduğuna inanılan beyin sol-sağ asimetrisi aslında omurgalı hayvanlar arasında yaygın olarak bulunmaktadır [76]. Dahası, omurgasız hayvanlarda da beyin asimetrisinin varlığı gösterilmiştir [105]. Beyin asimetrisinin genetik, evrimsel, çevresel, gelişimsel, patolojik ve epigenetik temelleri vardır. Şu anda, zebrafish modeli, kuşlar ve primatlar beyin asimetrisini incelemek için model olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bu modeller arasında zebrafish, hızlı üreme döngüleri nedeniyle genetik manipülasyonlar için mükemmel şanslar sağlamıştır. Kuş modeli, görsel sistem döngüsünün asimetrisinin yanı sıra çevresel-gelişimsel etkileşimin beyin asimetrisi üzerindeki etkilerini incelemek için sıklıkla kullanılmıştır. Son olarak, primatlar beyin lateralizasyonunun evriminin incelenmesi için önemli bir modeldir ve karşılaştırmalı çalışmalar için insana en yakın kanıtları sağlamıştır. Transgenik fare modelleri de beyin asimetrisini incelemek için kullanılmıştır [105].

2.6.1. Hipokampal asimetri

Normal insan beyninde temporal ve frontal loblar karşılaştırıldığında normal kişilerde $R > L$ yani sağ > sol asimetrisi rapor edilmiştir [106]. İnsan beyin temporal lob

asimetrisinin ortaya çıkmasından bu yana, insan beyninin yapısal asimetrisi birçok çalışmada kapsamlı olarak araştırılmıştır. Bu çalışmalar, fonksiyonel beyin görüntüleme, pozitron emisyon tomografisi (PET) ve bilgisayarlı tomografi kullanmıştır [104].

Hipokampus serebral korteks ile yakından ilişkilidir ve primatlarda medyal temporal lobda, korteks yüzeyinin altında bulunur. İnsanlarda ve diğer memelilerde beyin her iki yanında bir tane olmak üzere iki tane hipokampus var. Limbik sisteme aittir ve kısa süreli hafızanın uzun süreli hafızaya konsolide edilmesinde ve spasyal navigasyonda rol oynar [4-5, 104, 107].

Farklı hayvan modelleri ile genel beyin organizasyonlarında ve ayrıca hipokampus da dahil olmak üzere belirli beyin alanlarında beyin asimetrisinin varlığı gösterilmiştir. Birçok manyetik rezonans görüntüleme çalışması, normal kişilerde sağ hipokampusun sola göre daha büyük olduğunu göstermiştir [106, 108]. Hipokampal asimetrinin keşfi, nörolojik bozukluklar veya psikiyatrik hastalıkları olan hastalardaki beyinlerin radyolojik incelemelerinden büyük ölçüde faydalanmıştır. İlginçtir, birçok durumda, asimetri, patolojik bulgular yerine sağlıklı bireylerde de bulunmuştur [104].

Hipokampal içyapı asimetrisi üzerine çalışmalar çoğunlukla hayvanlar üzerinde gerçekleştirilmiştir. Hipokampusta nöronal sayılardaki asimetri ilk olarak 2006'da bildirilmiştir. Sıçan sağ hipokampal CA1 alanı ve CA3/2 alanındaki nöron sayıları sağ hipokampustan sırasıyla %21 ve %6 daha az bulunmuştur. Bu etkiler beslenme durumundan da kaynaklanmamaktadır. İleride postmortem çalışmaların, insan bilateral hipokampus nöron sayılarındaki olası farklılıkları açığa çıkaracağı umulmaktadır [104]. İki hipokampus farklı boyutlardadır. Bu gerçek "İki hipokampus farklı işlevlere sahip mi?" sorusunu gündeme getirmektedir [107].

Son zamanlarda, bilateral hipokampusun işlevsel farklılıklar sergilediği bulunmuştur. Hipokampusun fonksiyonel asimetrisi için ilk ortaya çıkan bulgular hipokampal hasarlı hastalardan gelmektedir. Medyal temporal lob eksizyonlarına bağlı olarak, hipokampal hasar gören hastalarda, spasyal hafıza işlev bozukluğu üzerine çok sayıda çalışma meta analiz edilmiştir. Sağ hipokampus hasarlı hastaların sol hipokampal hasarı olanlara kıyasla labirent öğrenme görevinde bozulmuş performans gösterdiklerini buldular [104]. Hipokampal devrenin sol-sağ asimetrisi, referans hafızanın edinilmesi ve çalışma hafızasının tutulması için kritiktir. Farelerin hipokampusunun asimetri

kusuru, referans hafızanın kazanılmasını ve çalışma hafızasının tutulmasını bozmuştur [105].

Sıçan hipokampusundaki potansiyel sol-sağ farklılıklarını keşfetmek için derinlemesine proteomik ve genomik çalışmalar yürütülmüştür. Bilateral hipokampusun proteomunu karşılaştırmak için iki boyutlu jel elektroforezi, iki boyutlu jel görüntüleri ve TOF kütle spektrometresi analizini kullanılmıştır. Sonuçlar sağ hipokampusun sol hipokampustan daha yüksek ekspresyon seviyesine sahip 68 çeşit proteinin yanı sıra tam tersi ekspresyon düzeyine sahip proteinleri de göstermiştir [104]. Bir çalışmaya göre spasyal test öğretilmiş sıçanların sağ hipokampusunda 623 genin ekspresyonu değişirken sol hipokampusta yalnızca 7 genin ekspresyonu değişmiştir [5]. Sağ hipokampusta 299 gen indüklenirken, 324 gen baskılanmıştır. Bu genlerin yarısı sinyal ve transport, metabolizma ve sinir sistemi fonksiyonlarından sorumludur. Buna ek olarak, spasyal öğrenme ile ilişkili en farklı eksprese edilen genler daha önce sinaptik plastisite ve hafıza ile ilişkilendirilmiştir [5].

Daha önce, fare hipokampusundaki NMDAR $\epsilon 2$ alt birimlerinin dağılımının sol ve sağ piramidal nöronlardan gelen girdiler tarafından oluşturulan sinapslar arasında asimetrik olduğu da gösterilmiştir [105]. Sol hemisiferdeki CA3'ten gelen afferentler, CA1 piramidal nöronların apikal dendritlerinde küçük ve oldukça plastik sinapsları innerve ederken, sağ CA3'den kaynaklanan sinapslar ise daha büyük, daha istikrarlı sinapsları innerve eder [109].

İnsan beyni ile ilgili önceki çalışmalarda hemisiferik asimetrelerin cinsiyetler arasında farklı olduğu bulunmuştur. Örneğin, sol inferior frontal girusun (IFG) beyaz cevherleri erkeklerde yaşa bağlı olarak arttı ve sol IFG, erkeklerde aynı yaş gurubundaki kızlara göre daha büyüktür. Ayrıca, yaşlanan erkeklerde bazı beyin bölgelerindeki küçülme eğilimi kadınlardakinden farklıdır. Benzer şekilde, hipokampusta, morfolojideki cinsel dimorfizm hem hayvanlarda hem de insanlarda bulunmuştur, sadece normal fonksiyonda değil aynı zamanda nörodejenerasyon ve farklı nörolojik hastalıkların gelişiminde de farklılıklar vardır [104].

Hipokampal aktivasyonun, kadınlarda daha çok sol tarafa, erkeklerde ise sağa lateralize olduğu rapor edilmiştir [3]. Bilişsel işlemenin sinirsel temelleri çocuklarda ve erişkinlerde aynı değildir. Örneğin, semantik işlemler, yetişkinlerde sol lateralize aktivasyona dayanırken, çocuklarda bilateral beyin aktivasyonuna dayanır. Etkilenen beyin dokusunun cerrahi eksizyonu gibi tedavi seçenekleri göz önüne alındığında,

çocuklarda fonksiyon farklılığı özellikle önem kazanmaktadır. Çocuklarda dilin sinirsel temsilinin sayısız araştırması olmasına rağmen, çocukluktaki hafızanın sinirsel temelleri iyi tanımlanmamıştır [110].

Bilişsel süreçlerin sinirsel organizasyonu, özellikle hemisferik lateralizasyon, çocukluk ve ergenlik boyunca değişir. Araştırmalar, hipokampusun, en az 25 yaşına kadar değişen dinamik bir yapı olduğunu göstermiştir. Erişkinler gibi sağa hipokampal lateralizasyon gösteren çocuklar daha iyi bilişsel test performansları göstermişlerdir [110].

Bu bilgiler ışığında çalışmamızda adolesan dönemde uygulanan öngörülebilir kronik stresin ve zengin çevrenin öğrenme ve spasyal hafıza işlevine ve öğrenme-hafıza oluşumuna etkili sinyal molekülleri bağlamında hipokampal asimetriye etkileri araştırılmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Bezmialem Vakıf Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 2017/08 no'lu onayı (Ek 1) alındıktan sonra Bezmialem Vakıf Üniversitesi Araştırma Merkezi'nde Şubat 2018 ile Haziran 2018 tarihleri arasında yapıldı.

3.1. Deney grupları ve deney planı

Çalışmada 28 günlük 33 adet erkek Sprague-Dawley sıçan kullanıldı. Hayvanların plastik kafeslerde, standart pelet yem ve musluk suyu ile ad libitum olarak beslenmesi sağlandı. Hayvanlar 12:12 saat aydınlık/karanlık olacak şekilde barındırıldı. Kullanılan hayvanlar gelişim döneminde olduklarından haftalık vücut ağırlıkları takip edilerek gelişimlerinin normal olarak devam ettiği tespit edildi. Çalışmalara göre erkek bireyler spasyal navigasyonda dişi bireylere göre avantajlı olduğundan [6], uygulanacak yöntemlerin spasyal hafıza üzerindeki etkilerinin daha iyi görülmesi için erkek hayvanların kullanılması düşünüldü.

Yapılan çalışmalar gelişim sürecinde hipokampal asimetrisinin yeniden şekillendiğini göstermektedir [109]. Buna dayanarak araştırmada öngörülebilir kronik stres ve zengin çevre uygulamaları beyin gelişiminin çok hızlı olduğu adolesan dönemde uygulandı. Adolesan dönem sıçanlarda süten kesilme zamanı olan doğumdan sonraki 21. günden itibaren başlamakta ve 60. güne kadar sürmektedir [102]. Sıçanlar doğumdan sonraki 60. günden itibaren erişkin kabul edilmektedir [102]. Bu sebeple sıçanlar 21. günde teslim alındı ve 1 haftalık adaptasyon sürecinden sonra (28. gün) protokollere başlandı. Hayvanlar 3 gruba ayrıldı:

1-Kontrol grubu (n=11): Sıçanlar 28. günden itibaren 4 hafta boyunca takip edildi ancak herhangi bir protokol uygulanmadı.

2-Öngörülebilir kronik stres grubu (n=11): Sıçanlara 28. günden itibaren 4 hafta boyunca günde 15 dakika özel plastik bölmelerde immobilizasyon stresi uygulandı.

3-Zengin çevre grubu (n=11): Sıçanlar 28. günden itibaren 4 hafta boyunca günde 1 saat içinde renk ve şekil bakımından ayırt edilecek ve keşif, oyun davranışlarını pekiştirecek objeler bulunan özel, büyük kafeslerde zengin çevreye bırakıldılar.

3.2. Öngörülebilir kronik stres

Hipokampusun strese olan duyarlılığı ve kronik stresin hipokampal fonksiyon üzerine olumsuz etkisi iyi bilinmektedir. Ancak bir çalışmada kısa süreli kronik immobilizasyon stresin hipokampus ve spasyal hafıza üzerine olumlu etkileri stresin öngörülebilir olması ile açıklanmıştır [74]. Yetişkinliğe göre adolesan dönem, strese duyarlılık için kritik bir zaman penceresidir. Adolesan dönemde maruz kalınan öngörülebilir kronik stresin hipokampus asimetrisinin gelişimi üzerine etkisi araştırılmamıştır. Bu çalışmada özgün olarak hipokampal asimetri gelişimi üzerine öngörülebilir kronik stresin etkisi araştırıldı.



Şekil 3-1 İmmobilizasyon stresi uygulamak için kullanılan plastik aparatlar

İmmobilizasyon stresi sıçanların sadece kısmen kuyruklarını oynatabildikleri plastik tüplere yerleştirilmesiyle gerçekleştirildi.

Çalışmamızda uygulanan kronik stres modeli literatürde yaygın olarak kabul görmüş olan immobilizasyon stres modelidir. İmmobilizasyon stresi, yaygın olarak kullanılan, minimum hareketi sağlayan ve hiçbir acı içermeyen duygusal strese yol açan onaylanmış bir hayvan modelidir. Öngörülebilir kronik immobilizasyon stresi, adolesan dönemdeki sıçanın düzenli olarak (28 gün boyunca) gün içinde 15 dakika, hareket etmesine olanak vermeyecek boyutlarda (4 cm çapında) olan plastikten yapılmış özel bir kafeste tutulması ile oluşturuldu (Şekil 3-1). Daha önceki çalışmalarda immobilizasyon stresin 10. dakikadan sonra kanda kortikosteron (stres hormonu) artmasına neden olduğu tespit edildiğinden [22, 111], bu çalışmada uyguladığımız stresin kısa süreli ama

kortikosteron seviyesini de artırabilen düzeyde olmasını istediğimiz için strese maruz kalma süresi günde 15 dakika olarak seçildi. El temasına alıştıran hayvanların kafeslere yerleştirme sırasında ek bir stres yaşamamalarına dikkat edildi.

3.3. Zengin çevre

Zengin çevre uygulamasının hipokampal fonksiyonları olumlu yönde etkilediği ve hipokampusta yeni nöron üretimini (nörogenez) artırdığı birçok çalışma ile gösterilmiştir [112-113]. Ancak adolesan dönemde zengin çevre uygulamasının hipokampal asimetri gelişimine etkisi araştırılmamıştır. Çalışmamızda özgün olarak hipokampal asimetri oluşumunda zengin çevre uygulamasının etkisi araştırılmıştır.

Bu uygulamada sıçanlar 56x35x19 cm boyutlarındaki keşif ve öğrenme davranışlarını destekleyecek olan objeler içeren özel kafeslerde (Şekil 3-2) 28 gün boyunca günde 1 saat barındırılmak [114-115] suretiyle zengin çevreye bırakıldılar.



Şekil 3-2 Adolesan sıçanlar için zengin çevre kafesleri

Zengin çevre kafesleri öğrenmeyi teşvik edici renkli oyuncaklar, şekilli objeler içermektedir.

3.4. Morris su labirenti testi

Morris su labirenti performansı, LTP ve NMDA reseptör fonksiyonuna bağlanmıştır, bu da onu hipokampal fonksiyonların araştırılmasında anahtar teknik haline getirmektedir [28]. Bu test, ön eğitim veya yiyecek ve su kısıtlaması olmaksızın hızlı bir şekilde sonuç alma avantajına sahiptir. Bu nedenle hipokampus bağımlı öğrenme ve spasyal hafıza yeteneğinin değerlendirilmesi amacıyla Morris su labirenti testi kullanıldı. Bu test için karanlık bir odaya yerleştirilmiş 149 santimetre (cm)

çapında ve 61 cm yüksekliğinde, yuvarlak, siyah bir havuzun içi $24\pm2^{\circ}\text{C}$ sıcaklığındaki suyla 45 cm yüksekliğe kadar dolduruldu. Havuz işaretlenerek hayali olarak 4 eşit kadrana (çeyrek alan) bölündü. 10 cm^2 alana sahip siyah, kare platform kadranslardan birinin merkezine su yüzeyinin 1-2 cm altında kalacak şekilde yerleştirildi ve platformun görünür olmadığı onaylandı. Havuz birkaç uzak görsel ipucu ile çevrelendi.

Öğrenme deneyleri literatürde öğrenmenin gerçekleşmesi için yeterli olduğu gösterilmiş olan ardışık 4 gün, günde 5 deneme olacak şekilde yapıldı [116]. Sıçanlar her denemede farklı yön kombinasyonlarından, yüzleri tank duvarına dönük olarak suya bırakıldı. Platformu bulmaları için sıçanlara 60 saniye süre verildi, bu sürede platformu bulamayan sıçanlar platforma konularak etrafı tanımaları için 30 saniye bekletildi. Her sıçan için platformu bulana kadar geçen toplam süre (latans) kaydedildi. Dördüncü gün gün platforma kaçış latansının 20 saniyenin altına düşmesi öğrenmenin belirteci olarak kabul edildi. Denemeler arası bekleme süresi 30 saniye tutuldu [117].

Spasyal hafızanın değerlendirildiği 5. gün (probe test) platform kaldırılarak sıçanlar tek yönden suya bırakıldı ve 60 saniye süre ile video görüntüleri alındı. Bu zaman içerisinde sıçanların platformun bulunduğu kadranda geçirdikleri süre, kat ettikleri toplam mesafe, ortalama hızları, ayrıca havuz içinde izledikleri yol, görüntü analizi yazılımı EthoVision XT version 11.5 yardımıyla belirlendi.

3.5. Serum örneklerinin toplanması

Her sıçandan ketamin/ksilazin anestezisi altında kalpten kan alındı. Örnekler derhal 4000 devirde (rpm) 10 dakika santrifüj edildi ve serumlar ayrıldı. Serumlarda ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) yöntemi ile kortikosteron düzeyleri ölçüldü. Kortikosteron, sıçanlarda bulunan stres hormonudur (insanlarda kortizolün karşılığıdır) ve hipokampal asimetride de önemi bildirilmiştir [118].

3.6. Hipokampus ve frontal korteks örneklerinin toplanması

Her gruptan 4 sıçanın hipokampusları immunohistokimyasal analiz için kullanıldı. Bu sıçanlar anestezi edildikten sonra kalpten formalin ile perfüzyon yapıldı, sonrasında dekapite edildiler. Beyinler çıkarılıp buz üstünde sol ve sağ hipokampuslar ayrıldıktan sonra fosfat tamponunda (pH: 7,4) hazırlanmış olan %10'luk nötral formalin fiksatifine alındı. Hipokampus yarım kürelerinin alt alanlarında immünohistokimyasal yöntem ile nöronal nükleer antijen (NeuN), nNOS, eNOS dağılımlarına bakıldı.

Biyokimyasal analizler için her gruptan 7 sıçan kullanıldı. Anestezi altında dekapite edilen sıçanların beyinleri çıkarıldıktan sonra ayrılan beyin bölgeleri (sol ve sağ hipokampus) homojenize edilip ELISA yöntemiyle BDNF ve CREB düzeyleri araştırıldı. Ayrıca sol ve sağ hipokampus ve sol ve sağ frontal kortekslerde oksidatif stres markırları olan MDA, protein karbonil (PCO) ve süperoksit dismutaz (SOD) düzeyleri ELISA yöntemiyle ölçüldü. Çalışmamızın amacı spasyal hafıza oluşumunda etkili sinyal moleküllerinin sağ ve sol hipokampusta değişimlerini araştırmak ve hipokampal asimetri açısından değerlendirmektir. Ancak oksidatif stres markırlarının hafıza oluşumunda fizyolojik sinyal molekülü olarak katkı sağlayabileceği önerisi ilginç ve paradoks gibi görünen bir durum olduğundan, bu markırlara ait bulgularımızı spasyal hafıza ve hipokampal asimetri açısından daha güvenli tartışmak için spasyal hafıza ile ilgili diğer bir beyin bölgesi olan frontal korteksde de bu markırları araştırdık.

3.7. İmmunohistokimyasal analizler

Hipokampuslar, tespit edildikten 48 saat sonra, %70 alkole alındı ve alkol birkaç defa değiştirildi böylece fiksatif dokulardan çıkarıldı. Dokular daha sonra, yükselen alkol serilerinden geçirilerek ksilolde saydamlaştırıldı. Ardından dokular, 58°C'lik parafine gömüldü. Parafin bloklardan 4 mikron kalınlığında kesitler alındı (Cut-Slee 2125 mikrotomu aracılığı ile).

Kesitler, nNOS (1:150 dilüsyonunda, Invitrogen 617000), eNOS (1:100 dilüsyonunda Labvision RB9279) ve NeuN (1:400 dilüsyonunda, CellSignaling, 24347) antikorları +4 °C'de bir gece (18 saat) tutuldu. Tüm antikorlar, UltraAb Diluent (Lab Vision, TA-125-UD)'de sulandırıldı. Lamlar, PBS' de 3 kez 5'er dakika yıkandıktan sonra, 30 dakika oda sıcaklığında, keçiden elde edilmiş biyotinlenmiş anti-tavşan sekonder antikor (Thermo Scientific, TP-125-BN) ile inkübe edildi. Kesitler PBS' de yıkandıktan sonra, peroksidaz ile işaretle streptavidin (Thermo Scientific, TS-125-HR)'de oda sıcaklığında 30 dakika tutuldu. Renkli reaksiyon ürününün oluşması için, maksimum 10 dakika AEC (3-amino-9-etilkarbazol) (Thermo Scientific, TA-004-HAC) ile inkübe edildikten sonra distile su ile yıkandı. 45 saniye boyunca Mayer hematoksilende (Lab Vision, TA-125-MH) tutularak zıt boyama yapılan kesitler, 5 dakika musluk suyunda yıkandıktan sonra gliserol jelatin (Lab Vision, TA-125-UG) ile kapatıldı.

Hazırlanan preparatlar Leica ışık mikroskobu ile incelendi ve Kameram 390 CU sistemi ile fotoğrafları çekildi. Sol ve sağ hipokampus (DG, CA3, CA1) kesitlerinde pozitif boyanan hücreler boyama yoğunluğuna göre sayıldı ve derecelendirildi: 0: boya yok; 0,5: zayıf; 1: hafif; 1,5: yoğun; 2: yüksek yoğunluk. Her örnek için, H-skor hesaplandı ($H\text{-Skor} = P_i (i + 1)$, i yoğunluğun şiddetidir ve P_i boyanan hücrelerin sayısına karşılık gelir.) [119].

3.8. Biyokimyasal analizler

Çalışmaya başlamadan önce örnekler ve kitler (RAT BDNF kit: ELABSCIENCE COMPANY, CAT NO: E-EL-R1235, Houston, Texas, USA; RAT CREB kit: ELABSCIENCE COMPANY, CAT NO: E-EL-R0289, Houston, Texas, USA; RAT CORT kit: ELABSCIENCE COMPANY, CAT NO: E-EL-R0269, Houston, Texas, USA; RAT MDA Kit: ELABSCIENCE COMPANY, CAT NO: E-EL-R0066, Houston, Texas, USA; Rat PCO kit: SUNRED BIOTECHNOLOGY COMPANY, CAT NUM: 201-11-8201, Shanghai, China; Rat SOD kit: SUNRED BIOTECHNOLOGY COMPANY, CAT NUM: 201-11-0169, Shanghai, China) oda ısısına getirildi.

BDNF ve CREB için her mikrolak kuyucuğuna 100 µl standart veya örnek eklendi ardından sıvı uzaklaştırıldı. Ardından 100 µL Biotinylated Detection Antibody eklendi. Plak 37 °C de 1 saat inkübe edildi. Daha sonra aspire edildi ve 3 kez yıkandı. Ardından 100 µL HRP konjugatı eklendi ve 37 °C de 30 dakika inkübe edildi. Daha sonra mikrolak aspire edildi ve 5 kez yıkandı. 90 µL Substrat Reaktif eklendi ve plak 37 °C de 15 dakika inkübasyona bırakıldı. Tüm kuyucuklara 50 µl Stop Solusyon eklendi. Mikrolak 10 dakika içinde 450 nm absorbansta okundu.

Kortikosteron ve MDA için her mikrolak kuyucuğuna 50 µl standart veya örnek eklendi hemen ardından her kuyucuğa 50 µL Biotinylated Detection Antibody eklendi. Plak 37°C de 45 dakika inkübe edildi. Daha sonra aspire edildi ve 3 kez yıkandı. Ardından 100 µL HRP konjugatı eklendi ve 37 °C de 30 dakika inkübe edildi. Daha sonra mikrolak aspire edildi ve 5 kez yıkandı. 90 µL Substrat Reaktif eklendi ve plak 37 °C de 15 dakika inkübasyona bırakıldı. Tüm kuyucuklara 50 µl Stop Solusyon eklendi. Mikrolak 10 dakika içinde 450 nm absorbansta okundu.

PCO ve SOD için her mikrolak kuyucuğuna 50 µl standart veya 40 µl örnek eklendi. Ardından örnek eklenen kuyucuklara önce 10 µL Antibody ardından 100 µL

Streptavidin-HRP eklendi. Standart eklenen kuyucuğa ise direkt olarak Streptavidin-HRP eklendi. Ardından mikrolak 37 °C de 1 saat inkübe edildi. Yıkama solüsyonu 30 kez dilüe edildikten sonra plak 5 kez yıkandı. Tüm kuyucuklara sırasıyla 50'şer µl Chromogen Solution A ve Chromogen Solution B pipetlendi. Mikrolak, 10 dakika 37°C'de ışık almayacak şekilde inkübasyona bırakıldı. Tüm kuyucuklara 50 µl Stop Solusyon eklendi. Mikrolak 10 dakika içerisinde 450 nm absorbansta okundu.

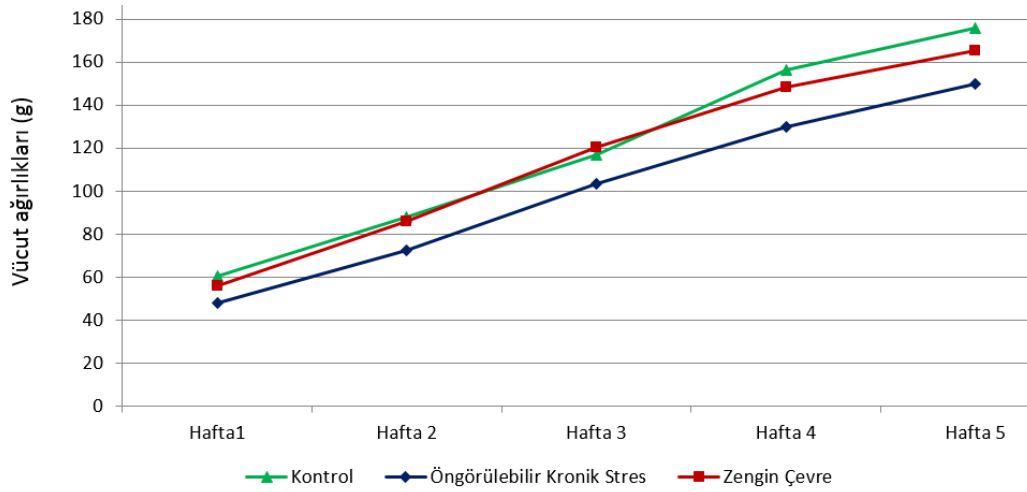
3.9. İstatistiksel analizler

İstatistiksel analiz için GraphPad Prism 5 yazılımı kullanıldı. Morris su labirenti performansları, NeuN, nNOS, eNOS, BDNF, CREB, kortikosteron, MDA, PCO ve SOD verileri gruplar arasında ve sol ve sağ beyin bölgeleri arasında One-Way ANOVA ve Bonferroni post-hoc testi kullanılarak karşılaştırıldı. $p < 0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Vücut ağırlığı değişimleri

Deney süresince vücut ağırlıkları haftalık olarak izlendiğinde grupların kendi içinde başlangıç ağırlıklarına göre ağırlık kazanımlarında gruplar arasında fark saptanmadı (Şekil 4-1). Gruplar rastgele oluşturuldu. Öngörülebilir kronik stres grubundaki sıçanların başlangıç ağırlığı diğer gruplara göre daha düşüktü. Çalışma sırasında tüm gruplarda gözlemsel olarak izlenen fiziksel görünüm ve genel sağlık durumu açısından gruplar arasında fark yoktu.



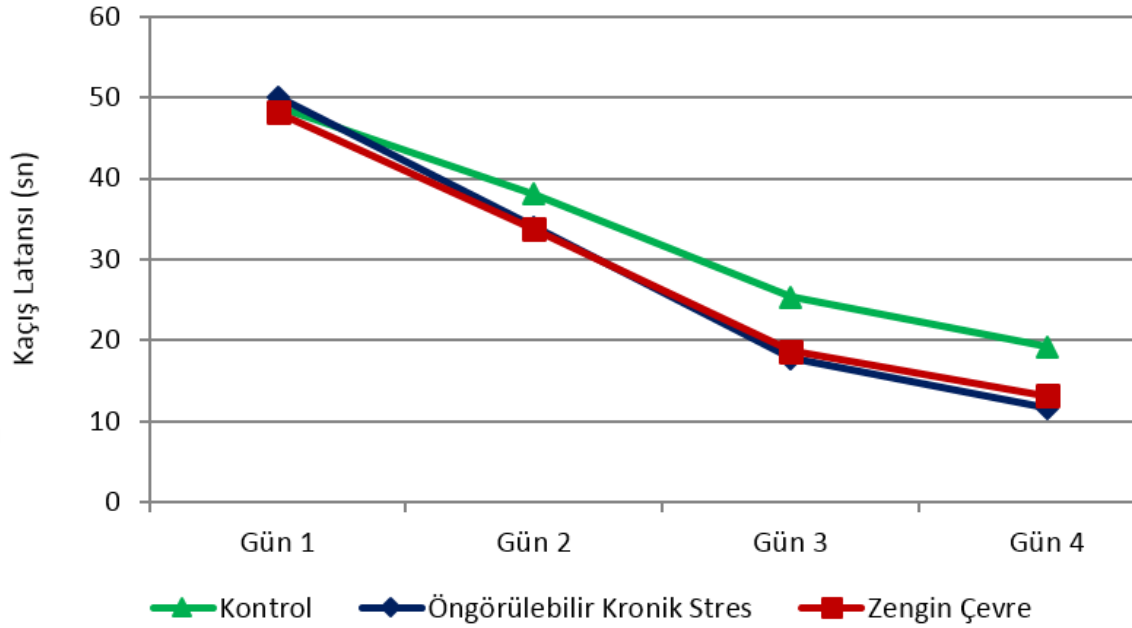
Şekil 4-1 Grupların deney süresince haftalık olarak ölçülen vücut ağırlıkları

(g: gram)

4.2. Spasyal hafıza performansı

Sıçanlar, Morris su tankındaki gizli platformun yerini öğrenebilmeleri için 4 gün boyunca her gün, günde 5 kez farklı yönlerden havuza bırakılarak yüzdürüldü. Bir günde tamamlanan 5 yüzme sonucu elde edilen verilerin ortalamaları hesaplandı. Bulunan ortalama değerler günlük bloklar olarak kullanıldı. Dört gün boyunca yapılan eğitim yüzmelerinden (trial) elde edilen sonuçlarla sıçanların öğrenme eğrileri elde edildi. Kontrol, öngörülebilir kronik stres ve zengin çevre gruplarında platformu bulma sürelerinde deneyin ikinci gününden itibaren belirgin bir azalma olmuştur. Dördüncü deneme gününde her grubun kaçış latansı 20 saniyenin altına düştü. Zengin çevre ve

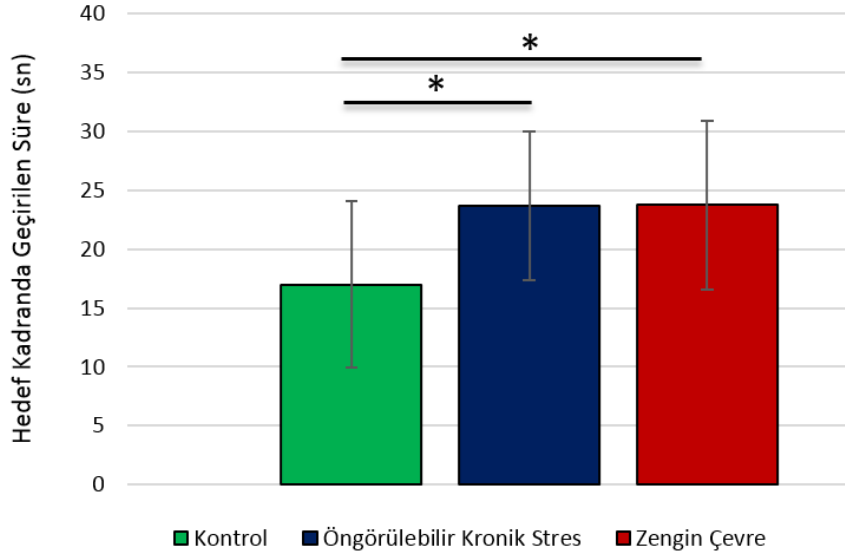
öngörülebilir stres grupları kontrol grubuna göre platformu daha kısa sürede buldular ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi (Şekil 4-2).



Şekil 4-2 Morris su labirenti testi öğrenme fazı performansları

Tüm grupların 4 gün süreyle tankın ¼ kadrana yerleştirilmiş görünmez probu bulma latansları (kaçış latansı). Her gün 5 deneme yaptırılarak ortalaması alınmıştır. 4. günün sonunda her grubun probu bulma latansları 20 saniyenin altına düşmüştür. (sn: saniye)

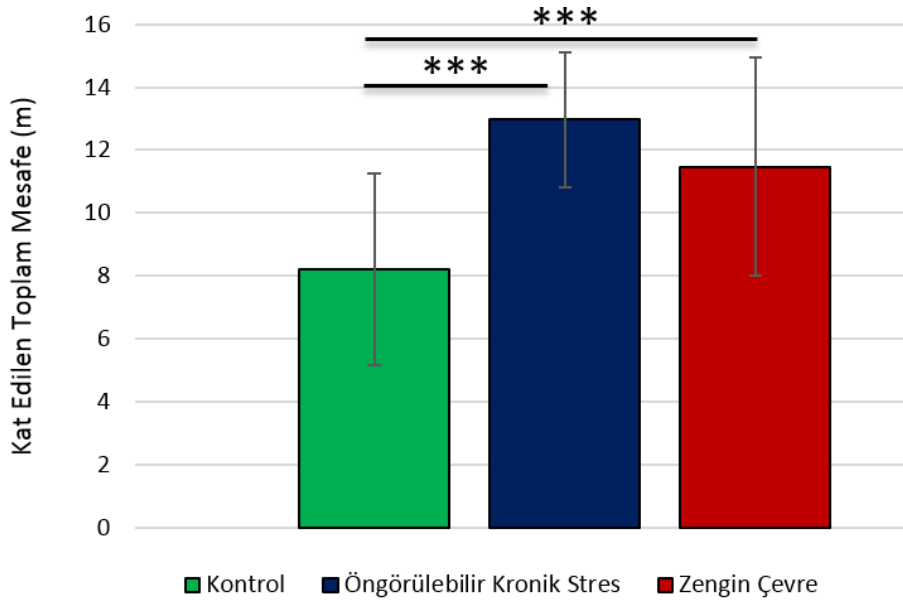
Spasyal hafızayı değerlendirmek için öğrenme testleri tamamlandıktan 24 saat sonra probun bulunduğu kadrana boş bırakılarak sıçanların probun bulunduğu kadranda (hedef kadrana) geçirdikleri süre araştırıldı. Bir başka deyişle probe testinde sıçanların, öğrenme denemeleri sırasında platformun bulunduğu bölgede platformu aramaları beklenir. Bu uzun süreli hafızanın oluştuğunun bir göstergesidir. Öğrenme eğitimleri süresince platformun bulunduğu kadrana, probe testinde hedef kadrana olarak tanımlanır. Probe testinde sıçanların hedef kadranda geçirdikleri zaman hafıza oluşumu için önemli bir göstergedir. Probe test sırasında öngörülebilir kronik stres grubu ve zengin çevre grubunun hedef kadranda geçirdiği süre kontrol grubuna göre fazlaydı ($p < 0,05$) (Şekil 4-3).



Şekil 4-3 Probe test sırasında hedef kadranda (platformun öğrenme deneyleri sırasında bulunduğu kadranda) geçirilen süre

Değerler ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde verilmiştir. * $p < 0,05$ (sn: saniye)

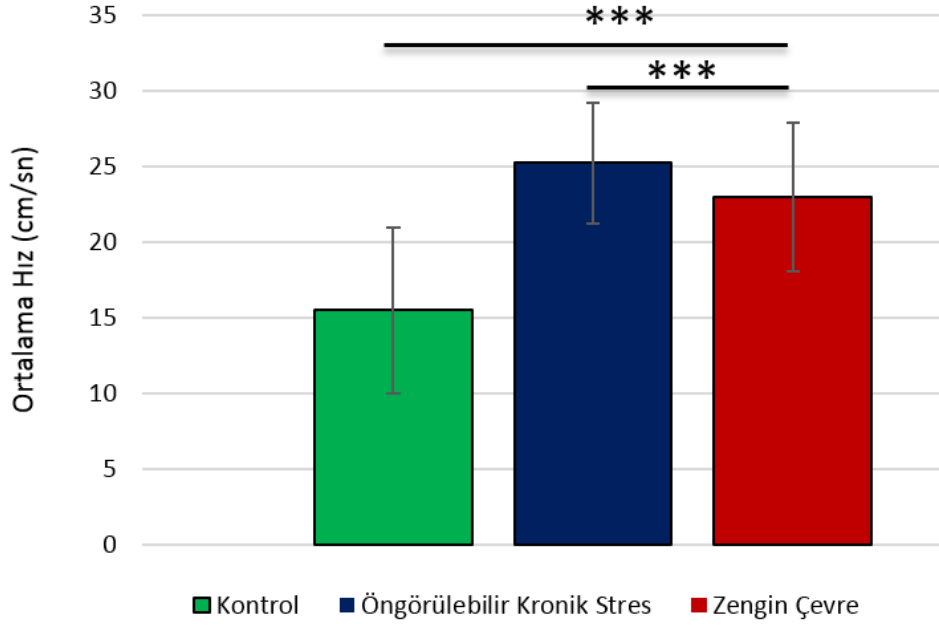
Öngörülebilir kronik stres grubu ve zengin çevre grubu probe test sırasında kontrol grubuna göre daha fazla mesafe kat etti (Öngörülebilir kronik stres grubu kontrole göre $p < 0,001$; Zengin çevre grubu kontrole göre $p < 0,05$) (Şekil 4-4).



Şekil 4-4 Probe testte toplam kat edilen mesafe

Değerler ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde verilmiştir. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ (m: metre)

Öngörülebilir kronik stres grubu ve zengin çevre grubu probe test sırasında kontrol grubuna göre daha yüksek bir ortalama hıza sahipti ($p<0,001$) (Şekil 4-5).



Şekil 4-5 Probe testte ortalama hız

Değerler ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde verilmiştir. *** $p<0,001$; (cm/sn: santimetre/saniye)

Grupların probe testte izledikleri yollar incelendiğinde kontrol grubunun diğer gruplarla kıyaslandığında havuzun her bölgesine uğradığı görüldü (Şekil 4-6).

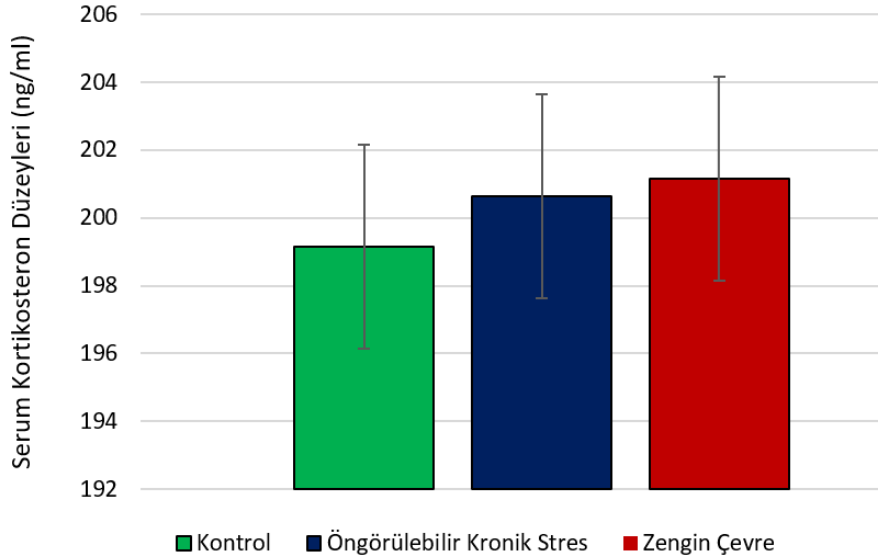


Şekil 4-6 Probe testte izlenen yola ait örnekler

Sol alttaki kadrar hedef kadrandır (platformun öğrenme deneyleri sırasında bulunduğu kadrar).

4.3. Kortikosteron düzeyleri

Deney gruplarında serum kortikosteron düzeyleri artmış görünse de bu fark kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı değildi (Şekil 4-7).

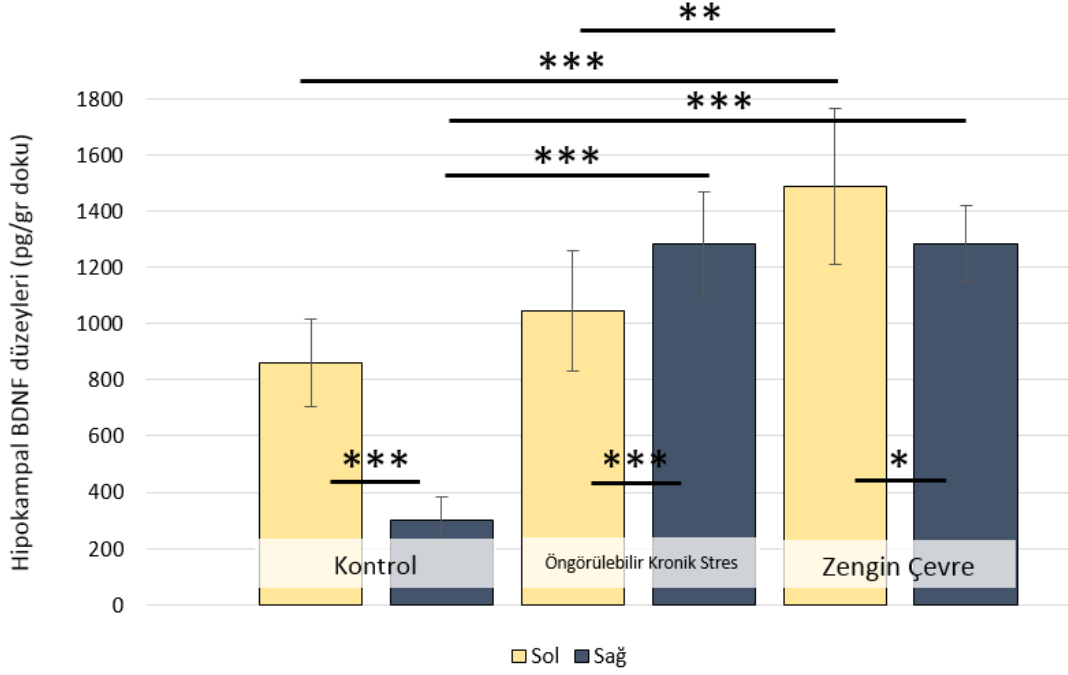


Şekil 4-7 Serum kortikosteron düzeyleri

Değerler ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde verilmiştir. (ng;nanogram; ml; mililitre)

4.4. Hipokampus BDNF düzeyleri

1. Kontrol grubunda hipokampal BDNF düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı sol > sağ asimetrisi saptandı ($p<0,001$) (Şekil 4-8).
2. Deney gruplarında hipokampusun her iki yarısında BDNF seviyesi kontrol grubunun her iki yarısına göre anlamlı olarak artmıştı ($p<0.001$). Ayrıca her iki deney grubundada hipokampal BDNF düzeylerinde asimetri vardı fakat asimetri deney grubuna göre farklıydı (Şekil 4-8).
 - Öngörülebilir stres grubunda sağ>sol asimetrisi ($p<0.001$) (Şekil 4-8).
 - Zengin çevre grubunda sol>sağ asimetri ($p<0.05$) (Şekil 4-8).

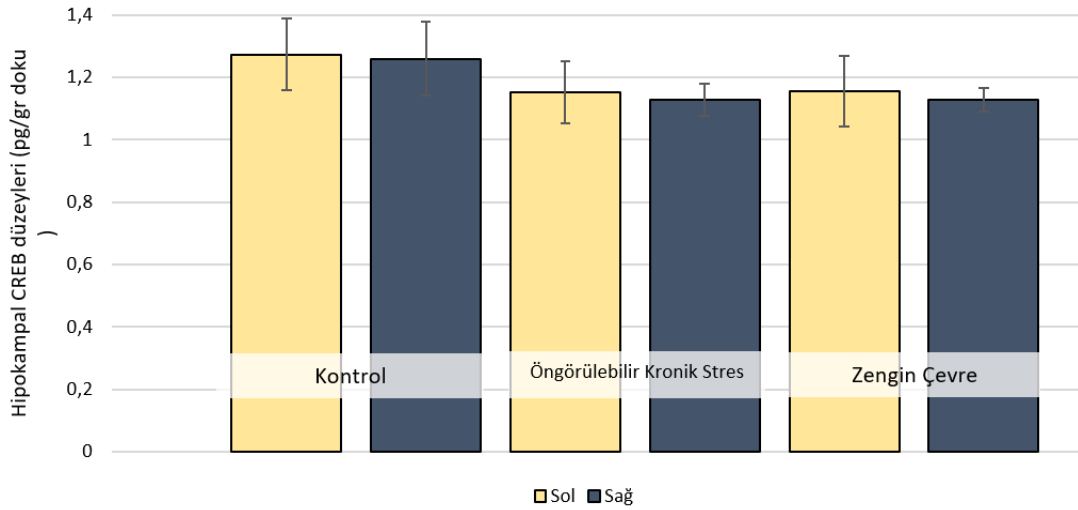


Şekil 4-8 Hipokampal BDNF düzeyleri

Değerler ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde verilmiştir. ***p<0,001; **p<0,01; *p<0,05 (BDNF: Beyin kökenli nörotrofik faktör; pg:pikogram; gr:gram)

4.5. Hipokampus CREB düzeyleri

Tüm gruplarda sol ve sağ hipokampuslarda CREB düzeyi bakımından anlamlı fark bulunmamıştır (Şekil 4-9).



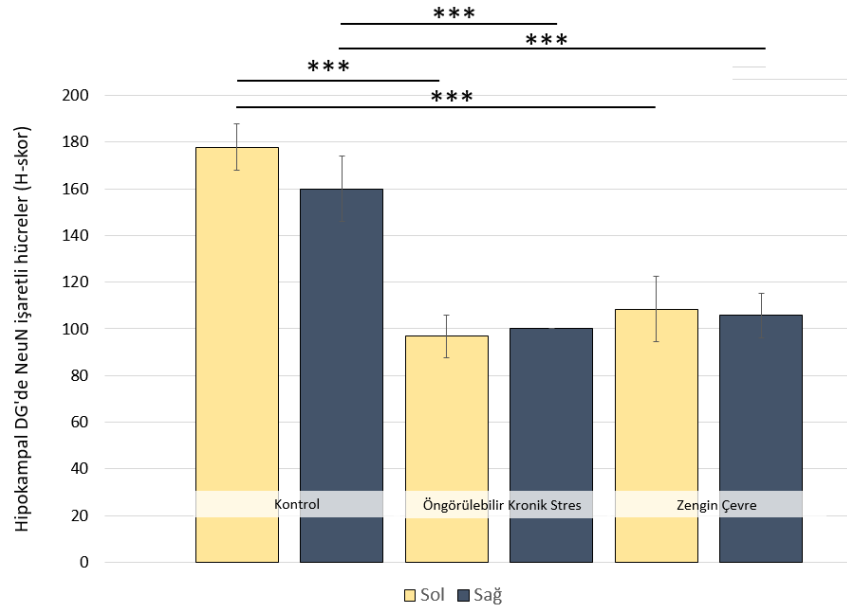
Şekil 4-9 Hipokampal CREB düzeyleri

Değerler ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde verilmiştir. (CREB: siklik adenosin monofosfat yanıt elemanı bağlayıcı protein; pg:pikogram; gr:gram)

4.6. Hipokampus alt alanlarında NeuN dağılımı

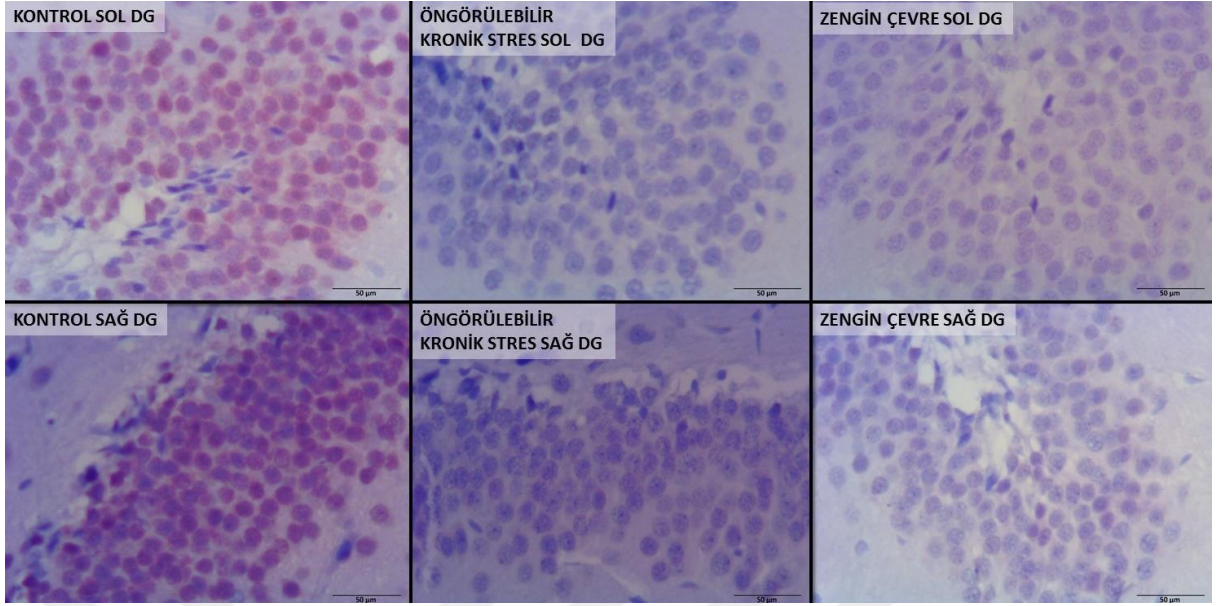
DG:

1. Öngörülebilir kronik stres ve zengin çevre gruplarının sol ve sağ DG'sinde NeuN pozitif hücre sayısı kontrol grubunun sol ve sağ DG'sine göre anlamlı olarak düşüktü ($p < 0,001$). (Şekil 4-10; Şekil 4-11).
2. Ayrıca her iki deney grubunda DG'de NeuN pozitif hücre sayısı açısından sol ve sağ farkı yoktu (Şekil 4-10; Şekil 4-11).



Şekil 4-10 Hipokampal DG'de NeuN işaretli hücrelerin sayısı ve şiddetine göre hesaplanmış H-skorlar

Değerler ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde verilmiştir. *** $p < 0,001$ (DG: dentat girus; NeuN: Nöronal nükleer antijen; H-skor = $P_i (i + 1)$, i yoğunluğun şiddetidir ve P_i boyanan hücrelerin sayısına karşılık gelir.)

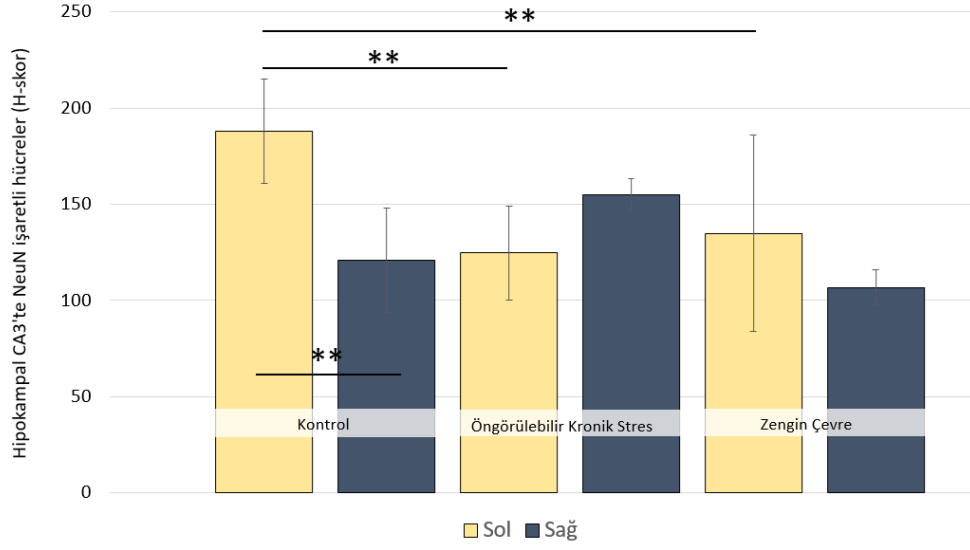


Şekil 4-11 Hipokampal DG’de NeuN işaretli hücreler

(DG: Dentat girus; NeuN: Nöronal nükleer antijen; Bar: 50µm)

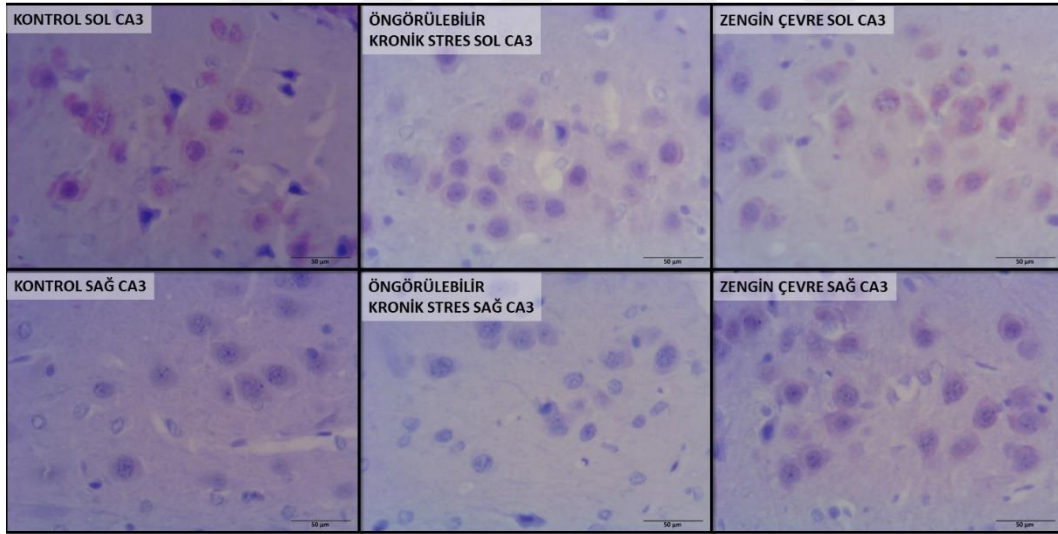
CA3:

1. Kontrol grubunda hipokampus CA3 bölgesinde istatistiksel olarak anlamlı seviyede sol>sağ asimetrisi saptandı ($p<0,01$) (Şekil 4-12; Şekil 4-13).
2. Öngörülebilir kronik stres ve zengin çevre gruplarının hipokampus CA3 bölgesinde NeuN pozitif hücre sayısı her iki grupta da sol hipokampusta kontrol grubu sol hipokampusa göre anlamlı olarak düşmüştü ($p<0,01$) (Şekil 4-12; Şekil 4-13).
3. Öngörülebilir kronik stres ve zengin çevre gruplarında CA3 bölgelerinde NeuN işaretli hücre sayısında sol ve sağ arasında anlamlı fark yoktu (Şekil 4-12; Şekil 4-13).



Şekil 4-12 Hipokampal CA3'te NeuN işaretli hücrelerin sayısı ve şiddetine göre hesaplanmış H-skorlar

Değerler ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde verilmiştir. **p<0,01 (NeuN: Nöronal nükleer antijen; H-skor = $P_i (i + 1)$, i yoğunluğun şiddetidir ve P_i boyanan hücrelerin sayısına karşılık gelir.)

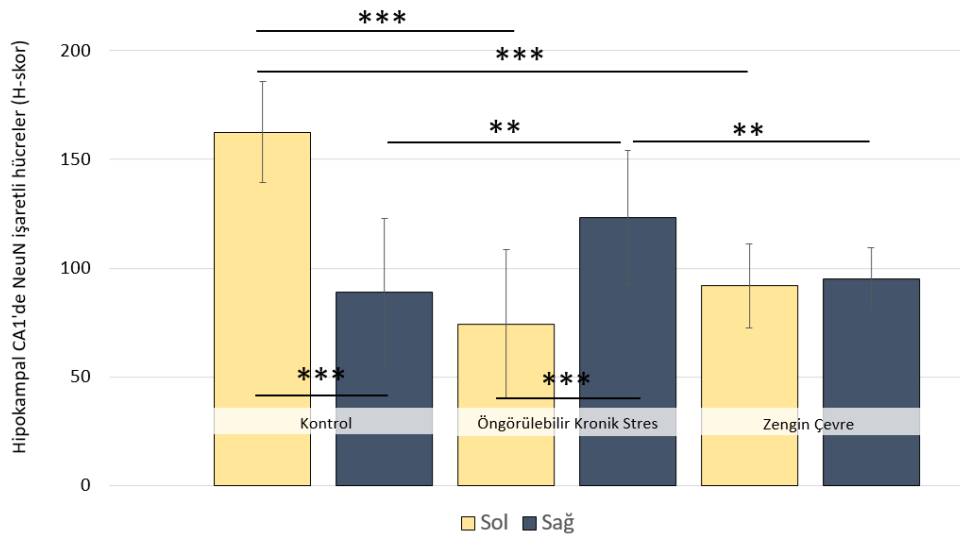


Şekil 4-13 Hipokampal CA3'te NeuN işaretli hücreler

(NeuN: Nöronal nükleer antijen; Bar: 50µm)

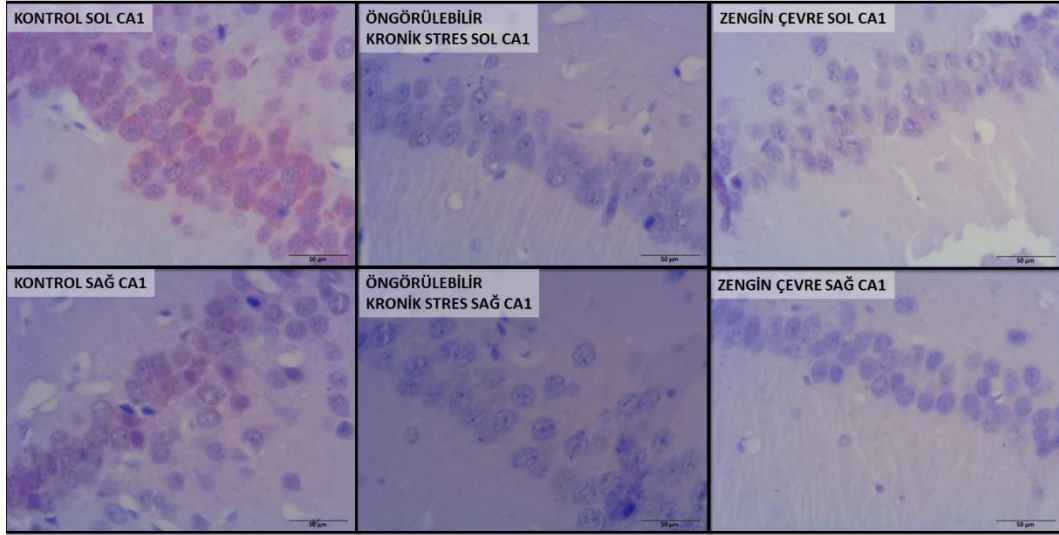
CA1:

1. Kontrol grubunda hipokampus CA1 bölgesinde istatistiksel olarak anlamlı seviyede sol>sağ asimetrisi saptandı ($p<0,001$) (Şekil 4-14; Şekil 4-15).
2. Öngörülebilir kronik stres ve zengin çevre gruplarının sol hipokampus CA1 bölgesinde NeuN pozitif hücre sayısı kontrol grubunun sol hipokampus CA1'ine göre anlamlı olarak düşmüştü ($p<0,001$) (Şekil 4-12; Şekil 4-13).
3. Öngörülebilir kronik stres grubunda sağ hipokampus CA1'de NeuN pozitif hücre sayısı hem kontrol hem de zengin çevre gruplarının sağ CA1'ine göre anlamlı olarak artmıştı ($p<0,01$) (Şekil 4-12; Şekil 4-13).
4. Öngörülebilir kronik stres grubunda CA1'de anlamlı olarak sağ>sol asimetrisi saptanırken ($p<0,001$), zengin çevre grubunda CA1'de sağ-sol farkı saptanmadı (Şekil 4-14; Şekil 4-15).
- 5.



Şekil 4-14 Hipokampal CA1'de NeuN işaretli hücrelerin sayısı ve şiddetine göre hesaplanmış H-skorlar

Değerler ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde verilmiştir. *** $p<0,001$; ** $p<0,01$ (NeuN: Nöronal nükleer antijen; H-skor = $P_i (i + 1)$, i yoğunluğun şiddetidir ve P_i boyanan hücrelerin sayısına karşılık gelir.)



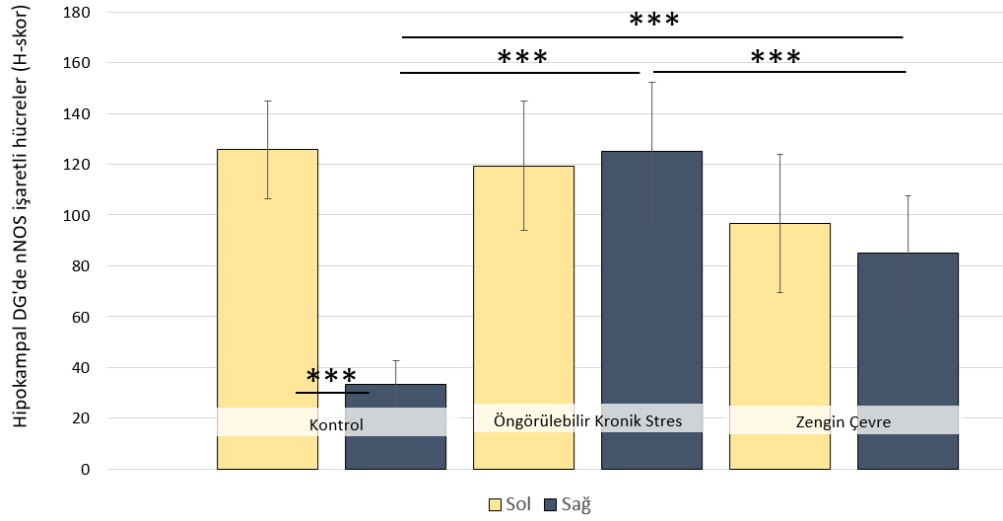
Şekil 4-15 Hipokampal CA1’de NeuN işaretli hücreler

(NeuN: Nöronal nükleer antijen; Bar: 50µm)

4.7. Hipokampus alt alanlarında nNOS ve eNOS dağılımı

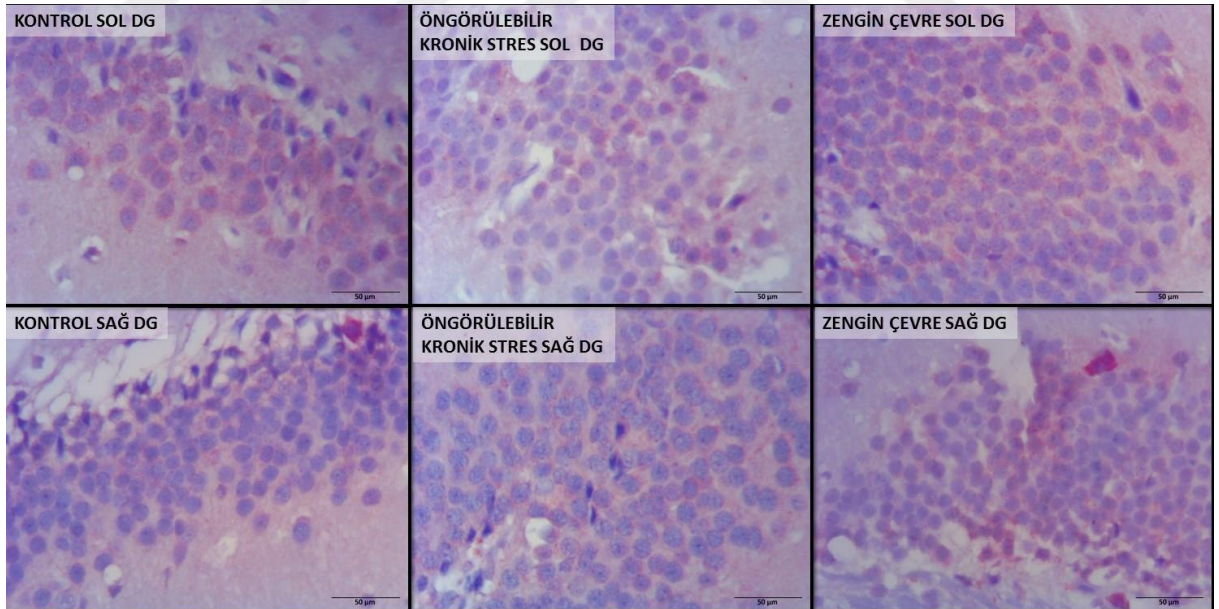
nNOS (DG):

1. Kontrol grubunda DG’de nNOS ekspresyonu anlamlı olarak sol> sağ asimetrisi gösterdi ($p<0,001$) (Şekil 4-16; Şekil 4-17).
2. Öngörülebilir kronik stres ve zengin çevre gruplarında sol DG’de kontrol sola göre anlamlı olarak değişmezken, sağ DG’de nNOS kontrol grubu sağ DG’ye göre anlamlı olarak artmıştı ($p<0,001$) (Şekil 4-16; Şekil 4-17).
3. Her iki deney grubunda hipokampus DG’de nNOS pozitif hücre sayısı kontrol grubunun aksine asimetri göstermedi (Şekil 4-16; Şekil 4-17).



Şekil 4-16 Hipokampal DG’de nNOS işaretli hücrelerin sayısı ve şiddetine göre hesaplanmış H-skorlar

Değerler ortalama ± standart sapma şeklinde verilmiştir. ***p<0,001 (DG: dentat girus; nNOS: Nöronal nitrik oksit sentaz; H-skor = $P_i (i + 1)$, i yoğunluğun şiddetidir ve P_i boyanan hücrelerin sayısına karşılık gelir.)

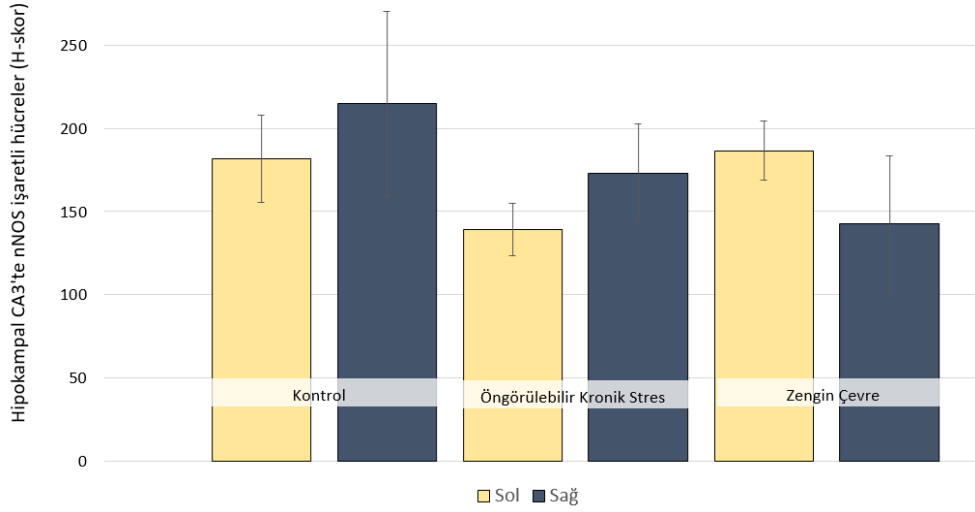


Şekil 4-17 Hipokampal DG’de nNOS işaretli hücreler

(DG: Dentat girus; nNOS: Nöronal nitrik oksit sentaz; Bar: 50µm)

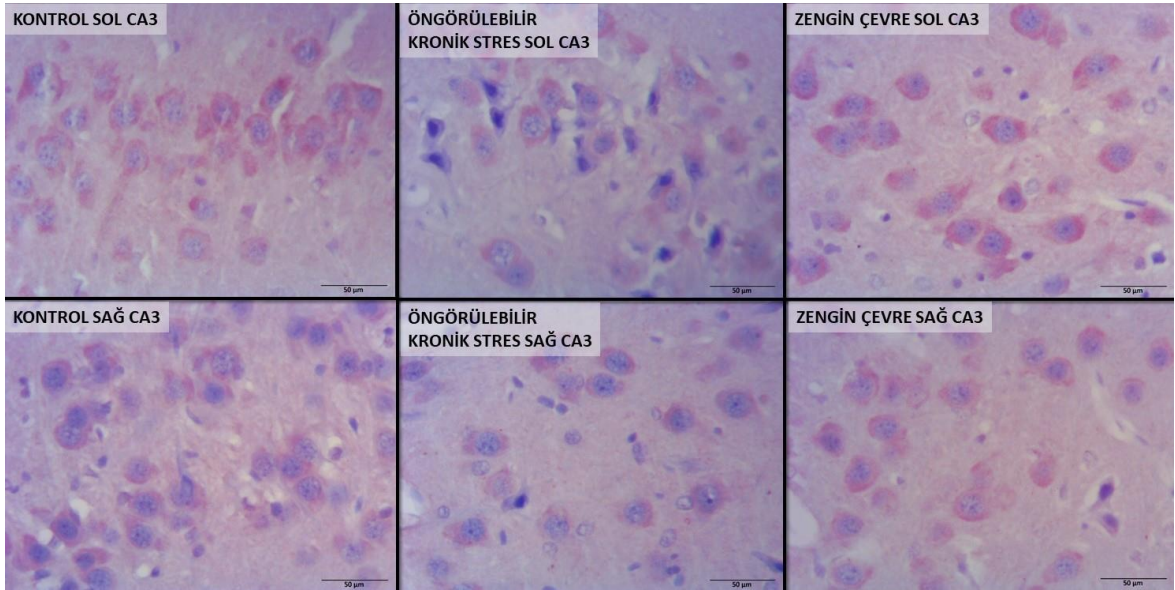
nNOS (CA3):

1. CA3 bölgelerinde nNOS dağılımına baktığımızda; deney gruplarında sağ CA3'te nNOS, kontrol sağ CA3'e göre düşmüş olsada fark istatistiksel olarak anlamlı değildi (Şekil 4-18; Şekil 4-19). Hiçbir grupta CA3'te nNOS için asimetri yoktu.



Şekil 4-18 Hipokampal CA3'te nNOS işaretli hücrelerin sayısı ve şiddetine göre hesaplanmış H-skorlar

Değerler ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde verilmiştir. (nNOS: Nöronal nitrik oksit sentaz; H-skor = $P_i (i + 1)$, i yoğunluğun şiddetidir ve P_i boyanan hücrelerin sayısına karşılık gelir.)

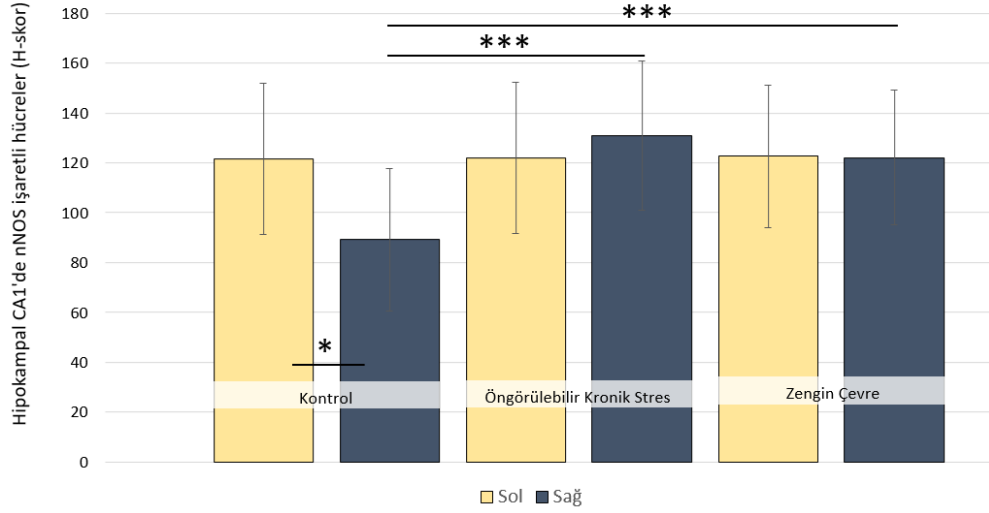


Şekil 4-19 Hipokampal CA3'te nNOS işaretli hücreler

(nNOS: Nöronal nitrik oksit sentaz; Bar: 50µm)

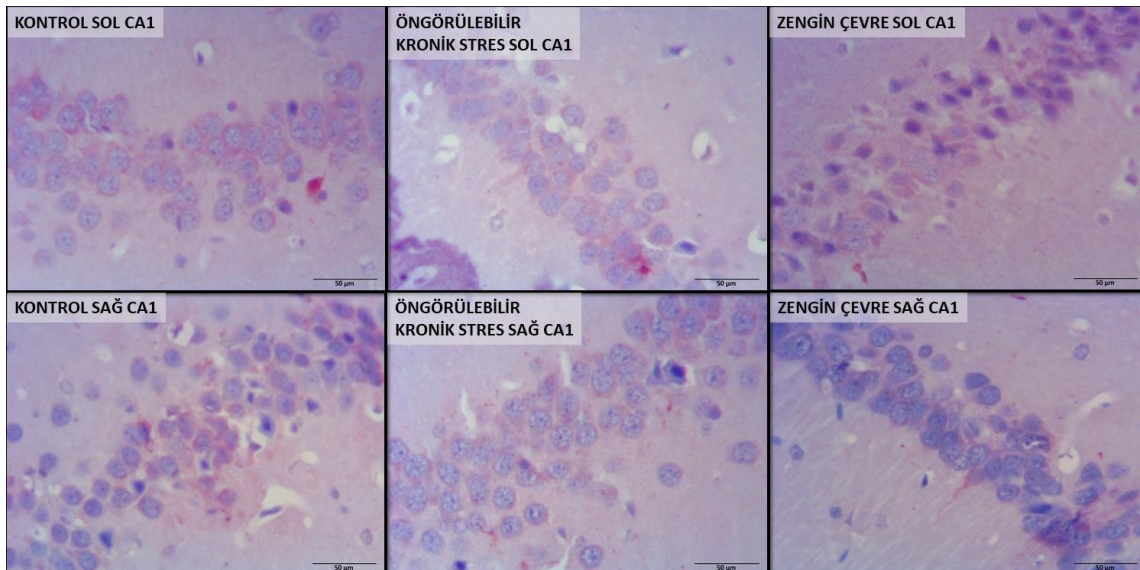
nNOS (CA1):

1. Kontrol grubunda hipokampal CA1’de nNOS ekspresyonu istatistiksel olarak anlamlı seviyede sol>sağ asimetrisi gösterdi ($p<0,05$) (Şekil 4-20; Şekil 4-21).
2. Öngörülebilir kronik stres ve zengin çevre gruplarının sol CA1’de kontrol sol CA1’e göre değişmezken, sağ CA1 bölgesinde nNOS kontrol grubunun sağ CA1 bölgesine göre anlamlı olarak artmıştı ($p<0,001$) (Şekil 4-20; Şekil 4-21).



Şekil 4-20 Hipokampal CA1’de nNOS işaretli hücrelerin sayısı ve şiddetine göre hesaplanmış H-skorlar

Değerler ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde verilmiştir. *** $p<0,001$; * $p<0,05$ (nNOS: Nöronal nitrik oksit sentaz; H-skor = $P_i (i + 1)$, i yoğunluğun şiddetidir ve P_i boyanan hücrelerin sayısına karşılık gelir.)

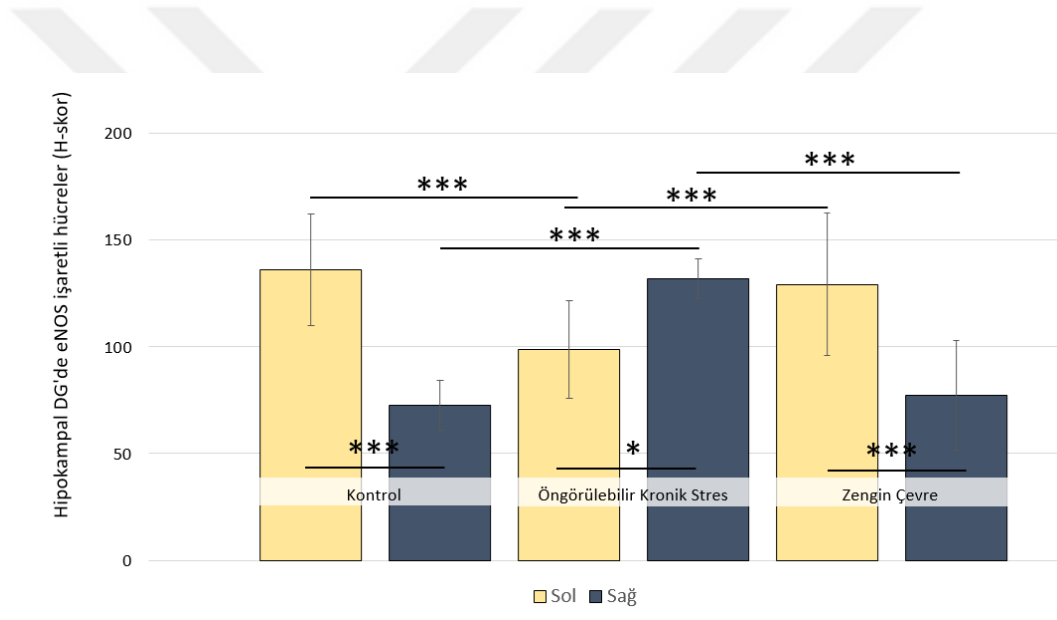


Şekil 4-21 Hipokampal CA1’de nNOS işaretli hücreler

(nNOS: Nöronal nitrik oksit sentaz; Bar: 50µm)

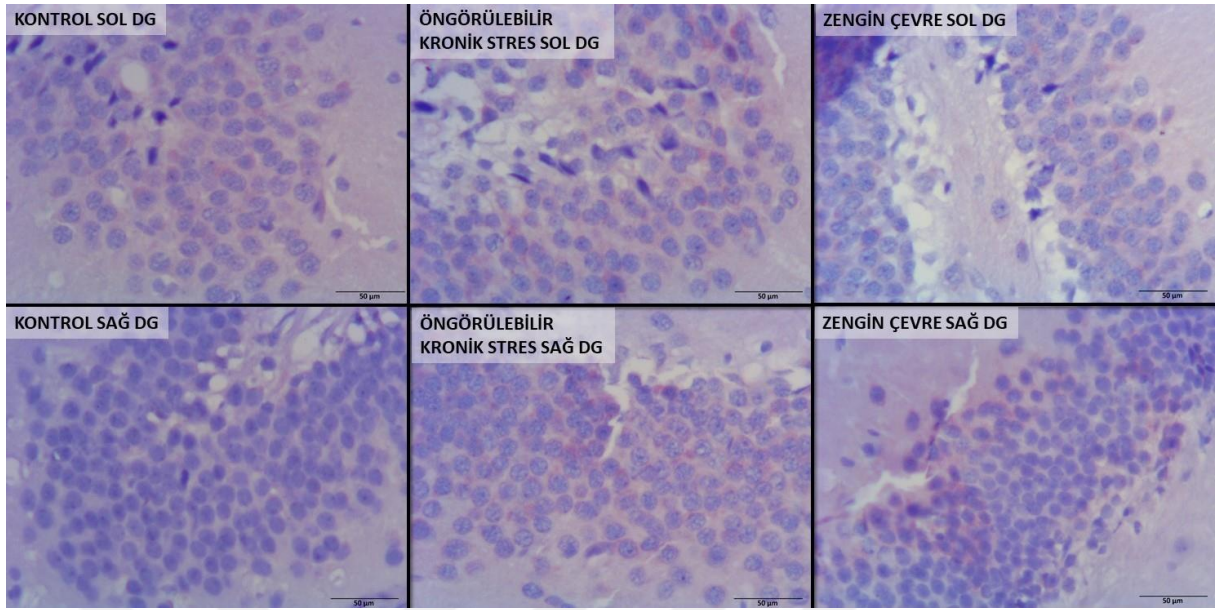
eNOS (DG):

1. Kontrol grubunda DG'de eNOS ekspresyonunda anlamlı olarak sol>sağ asimetrisi saptandı ($p<0,001$) (Şekil 4-22; Şekil 4-23).
2. Zengin çevre grubunda DG'de eNOS ekspresyonu kontrol grubu ile aynıydı. sol>sağ asimetrisi saptandı ($p<0,001$) (Şekil 4-22; Şekil 4-23).
3. Öngörülebilir kronik stres grubunda sağ DG'de eNOS ekspresyonu kontrol ve zengin çevre grubunun sağına göre anlamlı olarak artmıştı ($p<0,001$) (Şekil 4-22; Şekil 4-23).
4. Öngörülebilir kronik stres grubunda DG'de eNOS ekspresyonu anlamlı olarak sağ>sol asimetrisi gösterdi ($p<0,05$) (Şekil 4-22; Şekil 4-23).



Şekil 4-22 Hipokampal DG'de eNOS işaretli hücrelerin sayısı ve şiddetine göre hesaplanmış H-skorlar

Değerler ortalama ± standart sapma şeklinde verilmiştir.*** $p<0,001$; * $p<0,05$ (eNOS: Endotelial nitrik oksit sentaz; H-skor = $P_i (i + 1)$, i yoğunluğun şiddetidir ve P_i boyanan hücrelerin sayısına karşılık gelir.)

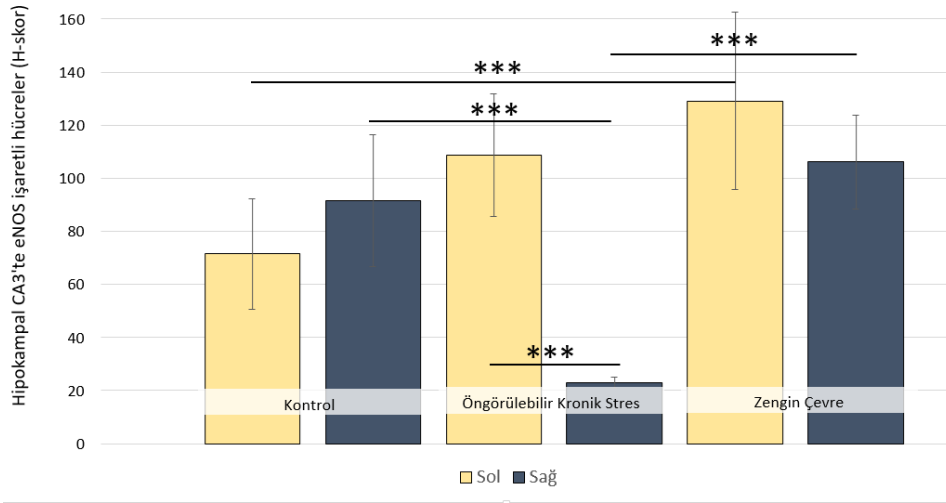


Şekil 4-23 Hipokampal DG’de eNOS işaretli hücreler

(DG: Dentat girus; eNOS: Endotelial nitrik oksit sentaz; Bar: 50µm)

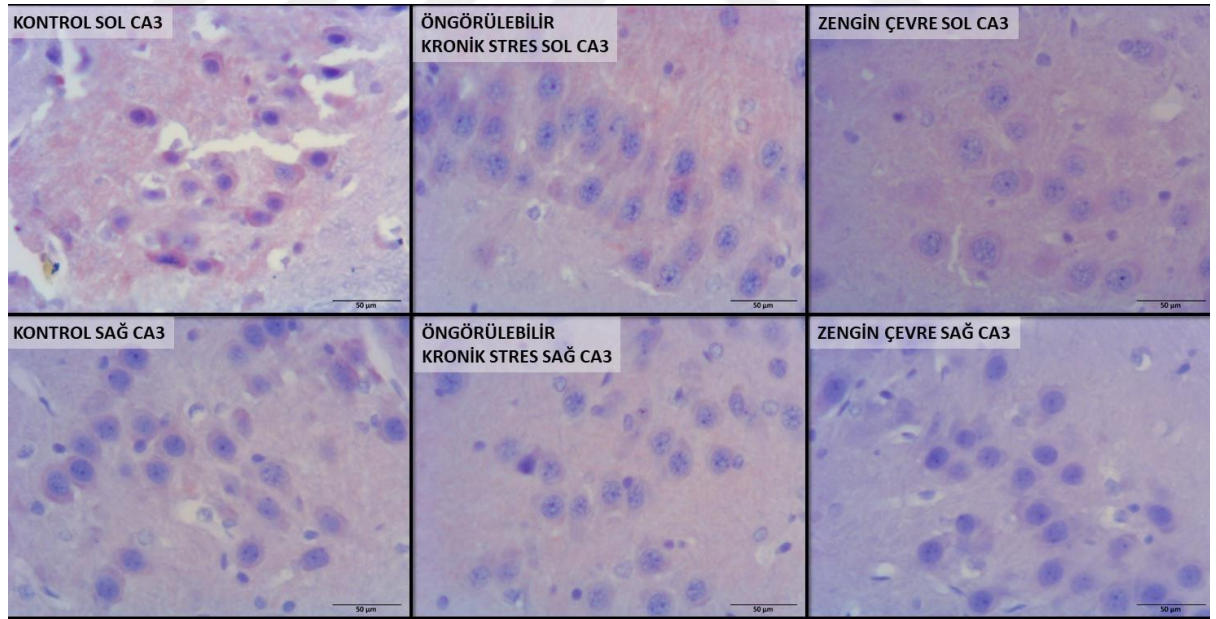
eNOS (CA3):

1. Kontrol grubunda CA3’de eNOS sağ tarafta fazla olmasına rağmen fark anlamlı değildi.
2. Öngörülebilir kronik stres ve zengin çevre grubunda CA3’de eNOS, sol tarafta kontrol sola göre anlamlı olarak arttı ($p<0,001$) (Şekil 4-24; Şekil 4-25).
3. Öngörülebilir kronik stres grubunda CA3’de eNOS sağ tarafta kontrol ve zengin çevre grubuna göre anlamlı olarak azaldı ($p<0,001$) (Şekil 4-24; Şekil 4-25).
4. Diğer gruplarda asimetri gözlenmezken, öngörülebilir kronik stres grubunda CA3’de eNOS ekspresyonu anlamlı olarak sol>sağ asimetrisi gösterdi ($p<0,001$) (Şekil 4-24; Şekil 4-25).



Şekil 4-24 Hipokampal CA3'te eNOS işaretli hücrelerin sayısı ve şiddetine göre hesaplanmış H-skorlar

Değerler ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde verilmiştir. $**p < 0,01$ (eNOS: Endotelial nitrik oksit sentaz; H-skor = $P_i(i + 1)$, i yoğunluğun şiddetidir ve P_i boyanan hücrelerin sayısına karşılık gelir.)

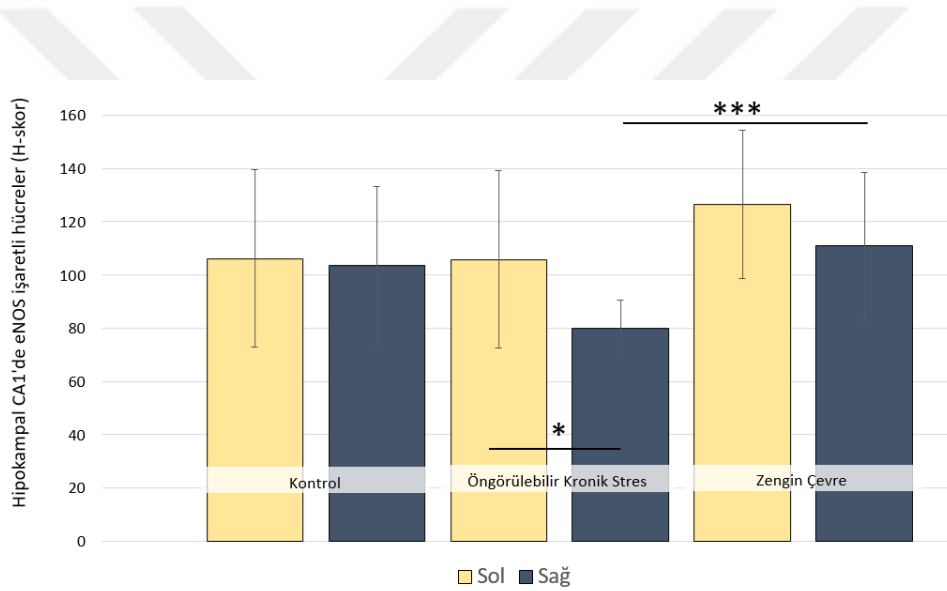


Şekil 4-25 Hipokampal CA3'te eNOS işaretli hücreler

(eNOS: Endotelial nitrik oksit sentaz; Bar: 50µm)

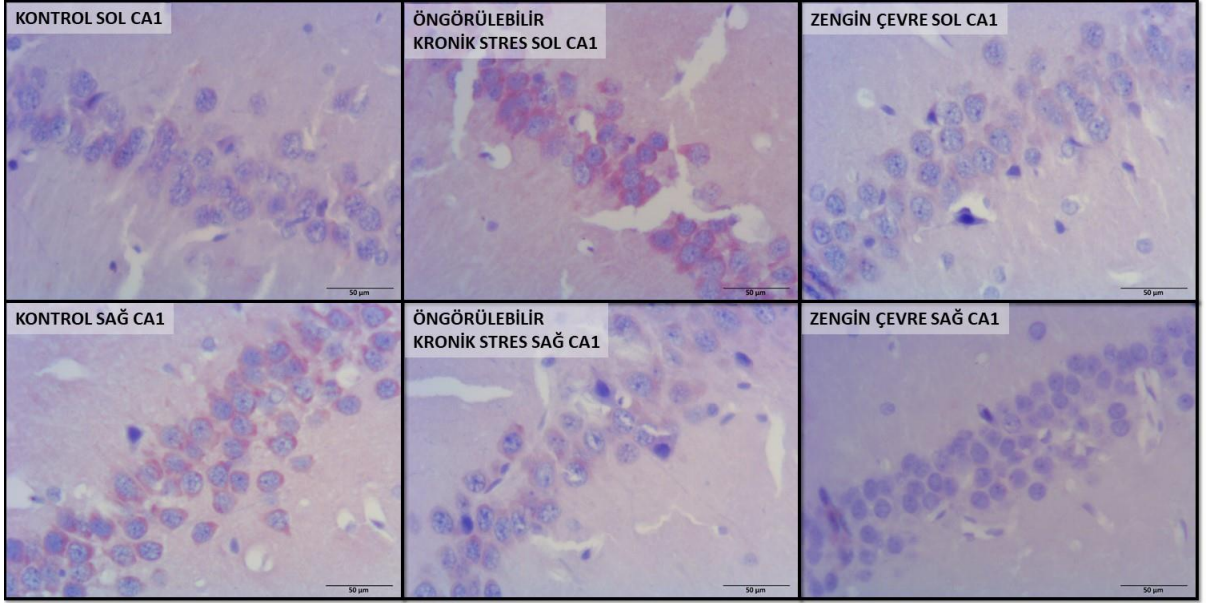
eNOS (CA1):

1. Kontrol grubunda CA1’de eNOS açısından sol-sağ farkı yoktu (Şekil 4-26; Şekil 4-27).
2. Deney gruplarında CA1’de eNOS ekspresyonu kontrol CA1’e göre anlamlı olarak değişmedi.
3. Öngörülebilir kronik stres grubunun sağ CA1 bölgesinde eNOS ekspresyonu zengin çevre grubu sağ CA1’de eNOS ekspresyonuna göre anlamlı olarak azaldı ($p<0,001$) (Şekil 4-26; Şekil 4-27).
4. Öngörülebilir kronik stres grubu CA1’de eNOS ekspresyonunda anlamlı olarak sol>sağ asimetrisi gösterdi ($p<0,05$) (Şekil 4-26; Şekil 4-27).



Şekil 4-26 Hipokampal CA1’de eNOS işaretli hücrelerin sayısı ve şiddetine göre hesaplanmış H-skorlar

Değerler ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde verilmiştir. *** $p<0,001$; * $p<0,05$ (eNOS: Endotelial nitrik oksit sentaz; H-skor = $P_i (i + 1)$, i yoğunluğun şiddetidir ve P_i boyanan hücrelerin sayısına karşılık gelir.)

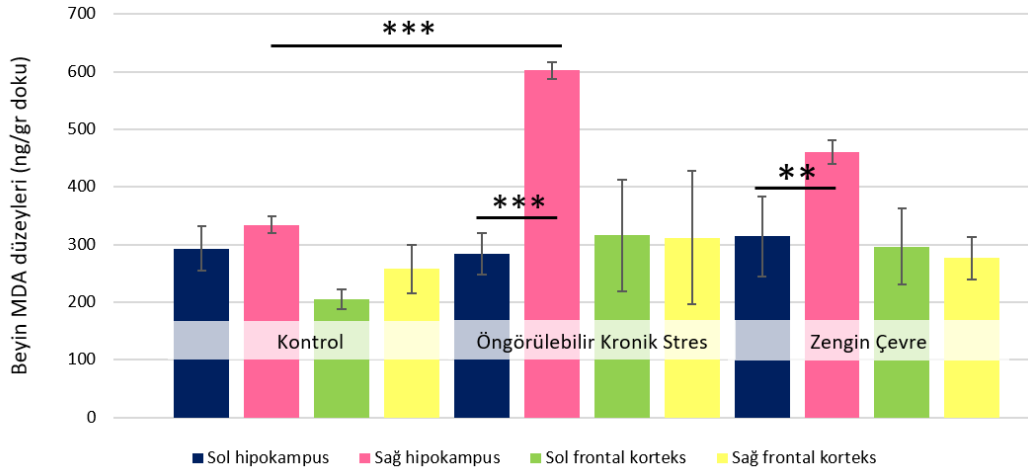


Şekil 4-27 Hipokampal CA1’de eNOS işaretli hücreler

(eNOS: Endotelial nitrik oksit sentaz; Bar: 50µm)

4.8. Hipokampus ve frontal korteks MDA düzeyleri

Öngörülebilir kronik stres ve zengin çevre gruplarının sağ hipokampusunda sol hipokampusa göre MDA düzeyleri anlamlı olarak arttı (sırasıyla $p<0,001$; $p<0,01$) (Şekil 4-28). Ayrıca kronik öngörülebilir stres grubunun sağ hipokampusunda MDA düzeyi kontrol grubunun sağ hipokampus MDA düzeyine göre anlamlı olarak artmıştı ($p<0,001$) (Şekil 4-28).

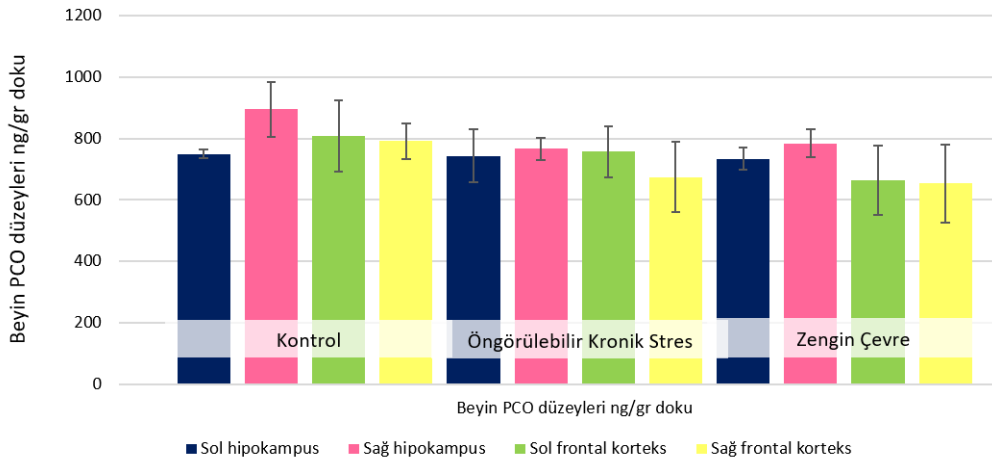


Şekil 4-28 Hipokampus ve frontal kortekste MDA düzeyleri

Değerler ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde verilmiştir. *** $p < 0,001$ (MDA: Malondialdehid; ng:nanogram; gr:gram)

4.9. Hipokampus ve frontal korteks PCO düzeyleri

Grupların sol, sağ hipokampus ve frontal korteksleri arasında PCO düzeyi bakımından anlamlı fark bulunmadı (Şekil 4-29).

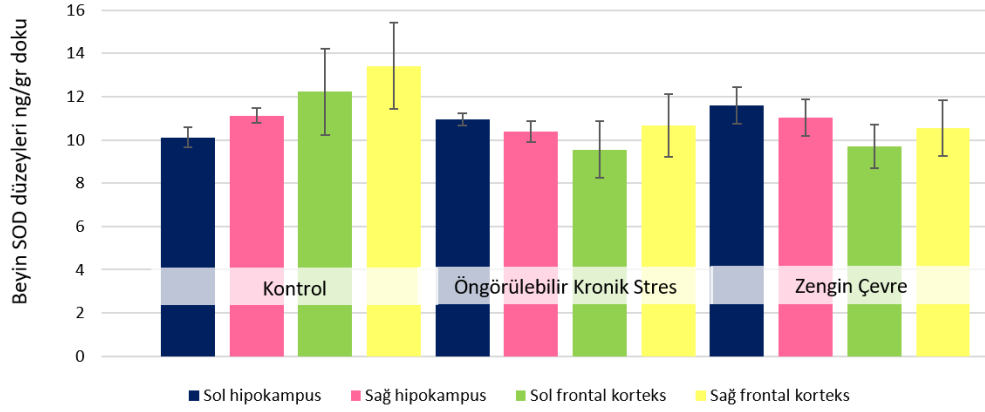


Şekil 4-29 Hipokampus ve frontal kortekste PCO düzeyleri

Değerler ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde verilmiştir. (PCO: Protein karbonil; ng:nanogram; gr:gram)

4.10. Hipokampus ve frontal korteks SOD düzeyleri

Grupların sol,sağ hipokampus ve frontal korteksleri arasında SOD düzeyi bakımından anlamlı fark bulunmadı (Şekil 4-30).



Şekil 4-30 Hipokampus ve frontal kortekste SOD düzeyleri

Değerler ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde verilmiştir. (SOD: Süperoksit dismutaz; ng:nanogram; gr:gram)

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda adolesan dönem boyunca öngörülebilir kronik stres ve zengin çevre uyguladığımız sıçanlarda Morris su tankında değerlendirdiğimiz spasyal hafıza performansında iyileşme saptadık. Her iki deney grubunda da serum kortikosteron düzeyleri kontrol grubuna göre artış gösterse de anlamlı değildi. Deney süresince takip edilen vücut ağırlıklarına bakıldığında her ne kadar öngörülebilir kronik stres grubunun daha az ağırlık kazandığı görülse de gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi.

Önemli bir bulgumuz kontrol grubunda hipokampal BDNF seviyesinin sol>sağ olacak şekilde asimetrik olmasıydı. Zengin çevre uygulamasında daha fazla olmak üzere her iki deney grubunda sol ve sağ hipokampusta BDNF seviyeleri kontrol sola ve sağa göre anlamlı olarak arttı ve gruba bağlı olarak farklı asimetri gösterdi. Hipokampal BDNF seviyeleri öngörülebilir kronik stres grubunda sağ>sol asimetrisi, zengin çevre grubunda sol>sağ asimetrisi gösterdi. CREB protein seviyesinde ise gruplar arasında ve sol ve sağ hipokampuslar arasında fark gözlenmedi.

Hipokampusun dentat girus, CA3 ve CA1 bölgelerinde nöron spesifik marker olan NeuN işaretli hücre sayısı kontrol grubunda sol ve sağ hipokampusta bölgelere göre farklılık gösterdi. DG’de sol-sağ farkı yoktu, CA1 ve CA3’te sol>sağ asimetrisi vardı. İlginç olarak öngörülebilir kronik stres ve zengin çevre gruplarında özellikle DG’de NeuN işaretli hücrelerin sayısı anlamlı olarak düşmüştü. Ancak öngörülebilir kronik stres grubunda, CA3’te sol-sağ farkı yok iken, sağ CA1’de NeuN işaretli hücre sayısı kontrol ve zengin çevre grubunun sağ CA1’ine göre anlamlı olarak arttı ve sağ>sol asimetrisi oluştu. Zengin çevre grubunda sağ CA1’de NeuN işaretli hücre sayısı kontrol grubunun sağına göre artmış olmasına rağmen CA1 ve CA3’te sol-sağ farkı yoktu. NeuN için genel olarak baktığımızda; deney gruplarında DG’de NeuN pozitif hücre kontrol grubuna göre her iki tarafta azaldı. CA1ve CA3 bölgelerinde sağ tarafta NeuN pozitif hücre sayısı kontrole göre değişmezken (hatta kronik öngörülebilir stress grubunda anlamlı olarak arttı) sol tarafta ise azaldığını saptadık.

Ayrıca öğrenme ve hafıza sürecinin nörobiyolojik temeli olan LTP’nin oluşumunda kritik aracı moleküllerden NO’nun sentezlenmesini sağlayan nNOS ve eNOS ekspresyonunun seviyesi hipokampus alt bölgelerinde her NOS türü için farklı

idi. Kontrol grubunda; DG ve CA1'de nNOS ekspresyonunda sol>sağ asimetrisi saptandı. Sağ CA3'te nNOS sola göre fazla olsada, anlamlı sol-sağ farkı yoktu. Öngörülebilir kronik stres ve zengin çevre gruplarında sol DG ve CA1'de nNOS ekspresyonu kontrol sola göre değişmezken sağ DG ve sağ CA1'de nNOS kontrol grubunun sağına göre anlamlı olarak arttı. Öngörülebilir kronik stres ve zengin çevre gruplarında da CA3'te nNOS için sol-sağ farkı yoktu ve kontrol grubuna göre anlamlı değişiklik saptanmadı.

eNOS için durum nNOS'dan farklı idi. Kontrol grubunda eNOS için sadece DG bölgesinde sol>sağ farkı vardı. CA1 ve CA3 bölgelerinde asimetri yoktu. Öngörülebilir kronik stres grubunda sağ DG'de eNOS kontrol grubunun sağına göre anlamlı olarak arttı ve sağ>sol asimetrisi saptandı. Zengin çevre grubunda DG'de eNOS ekspresyonu kontrol grubuna benzerdi ve sol>sağ asimetrisi vardı. CA3'te eNOS ekspresyonuna baktığımızda; kontrol grubunda asimetri yoktu. Öngörülebilir kronik stres grubunda sağ CA3'te eNOS diğer grupların sağına göre anlamlı olarak azaldı. Stres grubunda CA3 eNOS için anlamlı sol>sağ asimetrisi vardı. Zengin çevre grubunda sağ CA3' de eNOS kontrol grubu sağ CA3 eNOS'una göre değişmezken sol CA3'de eNOS kontrol grubunun soluna göre arttı ve sol>sağ asimetrisi saptandı fakat anlamlı değildi. CA1'de eNOS ekspresyonuna baktığımızda; kontrol grubunda sağ-sol asimetrisi yoktu. öngörülebilir kronik stres grubunda anlamlı sol>sağ asimetrisi vardı. Zengin çevre grubu CA1'de eNOS için sağ-sol asimetrisi yoktu ve kontrol grubuna göre sol tarafta artış olsada anlamlı değişiklik saptanmadı. Bu grupta sağ CA1'de eNOS stres grubu sağ CA1 eNOS'una göre anlamlı olarak yüksekti. NOS'lar için genel olarak baktığımızda deney gruplarında her iki NOS için hipokampus alt bölgelerinde farklı değişimler gözlemlendi: nNOS için; sağ DG ve sağ CA1'de artış, eNOS için; DG'de BDNF değişimlerine paralel değişim ve CA3'de sol tarafta artış saptandı.

Çalışmamızın diğer ilginç bulgusu hipokampus ve frontal kortekste saptadığımız oksidatif stres markırlarına aitti. Her iki deney grubunda sol hipokampusta kontrol sola göre değişiklik olmazken, sağ hipokampusta lipid peroksidasyon markırı olan MDA kontrol grubu sağına göre artmıştı. Ancak yine hipokampusta her iki tarafta protein oksidasyon ürünü olan PCO'da ve antioksidan enzim olan SOD'da kontrol grubuna göre farklılık yoktu. İlginç olarak deney gruplarında sağ ve sol frontal kortekste MDA düzeyi kontrole göre değişmemişti. Frontal kortekste PCO ve SOD düzeyleri de kontrol grubuna göre değişmemişti.

Hipokampusun yön bulma-spasyal hafızada kritik önemi olduğu, hatta uyanıklık, dikkat, stres içeren emosyonel durumlar ve davranışlara katkısı da bilinmektedir [120]. Hipokampusun adaptif cevapların oluşmasına da katkısı vardır. Stres durumunda adrenal korteksten salgılanan kortizol beyinde, özellikle de hipokampustaki reseptörlere bağlanır. Hipokampustaki reseptörler yeterli miktarda kortizol ile bağlandığında, hipotalamus üzerinde negatif feedback etki yaparak, kortikotropin salgılatıcı hormon salınımını inhibe eder. Bu yolla hipokampus, kortizolü belli seviyede tutarak, stres reaksiyonunu durdurulabilir. Öte yandan hipokampusun strese karşı çok hassas olduğu da bilinmektedir [121-123].

Günlük yaşamda çok sayıda insan farklı düzeylerde kronik strese maruz kalmaktadır. Bununla birlikte, bireylerin sadece bir kısmında kronik stres hastalıkları görülür. Bu da strese bağlı depresyon, anksiyete, kognitif bozukluklar ve nöropsikolojik hastalıklarının gelişiminde stresin türü, şiddeti ve süresinin rol oynadığını düşündürmektedir. Diğer bir deyişle, stresin sonuçları öngörülebilir veya öngörülemez oluşu ile ilişkili olabilir [124]. Öngörülemeyen kronik stres depresif ve anksiyete benzeri davranışa yol açmaktadır [92]. Buna karşılık öngörülebilir stresin olumlu etkileri olduğu bildirilmiştir. Öngörülebilirlik, hafif yoğunlukta ve uygun sürede tahmin edilen bir strese maruz kalmak olarak belirtilmiştir [19]. Adolesan dönemde öngörülebilir kronik hafif stresin (28 gün boyunca her gün 5 dakikalık immoblizasyon stresi) hipokampusta nöral kök hücreleri uyardığı ve nörogenezi arttırdığı yetişkin sıçanlarda öğrenmeyi ve hafızayı güçlendirdiği gösterilmiştir [19]. Ancak, öngörülebilir kronik hafif stresin öğrenme, hafıza üzerine etkileri yeterince bilinmemektedir. Stresin öngörülebilirliğinin koruyucu etkisi olduğunu rapor eden çalışmalar yanında zıt etkiyi de rapor eden çalışmalar vardır. Nüfusun çoğunluğu, yaşamında tahmin edilebilir ve görece daha hafif olan kronik strese maruz kaldıkları için, öngörülebilir stresin hipokampus ve hipokamus bağımlı fonksiyonlara etkisini araştırmak önemlidir.

Adolesan dönem çocukluktan yetişkinliğe geçiş sürecinde kritik bir gelişim dönemidir ve yetişkinliğe hazırlık aşamasında sosyal ve bilişsel davranışların olgunlaşması için önemli bir süreçtir. Olgunlaşma ve bağımsızlık için gerekli becerilerin kazanılmasını teşvik eden yüksek risk alma, keşfetme, yenilik arayışı, sosyal etkileşim, yüksek aktivite ve oyun davranışları gibi karakteristik adolesan davranışları ile karakterizedir [102]. Kemirgenlerde, ergenlik ile ilişkili yaşların genellikle doğum sonrası 21-59 günler arası olduğu kabul edilmektedir [125]. Özellikle adolesan dönemde

yaşanan stresin etkisi beyin gelişimi devam ettiği için erişkindeki etkiye göre daha farklı olabilir ve genellikle öngörülemeyen stresin etkileri erişkin döneme olumsuz yansıyabilir [126-127]. Diğer yandan adolesan dönemde öngörülebilir stres uygulanmasının yetişkinlikte stresin neden olduğu depresyon ve anksiyeteye karşı direnç kazandırdığı da gösterilmiştir [126].

Ayrıca yaşamın hemen hemen her döneminde zenginleştirilmiş çevre uygulanmasının hipokampal fonksiyonlar üzerine etkilerini araştıran çalışmalarda nöroenezde artış, dendritik büyüme, nörotropin ekspresyonunda artış, LTP oluşumunda güçlenme ve spasyal hafızada iyileşme rapor edilmiştir [127-131]. Zengin çevre uygulamasının genellikle spasyal hafıza bağlamında hipokampal yapı ve fonksiyonlar üzerine olumlu etkileri rapor edilmiş olsa da çelişen sonuçlar da mevcuttur. Farklı yaş gruplarında (21 günlük, 3 aylık ve 7 aylık sıçanlarda) 50 gün süreyle zengin çevre uygulamasının Morris su tankı testinde spasyal hafıza kazanımını etkilemediği gösterilmiştir [86]. Araştırmacılar bu sonucu literatürde rapor edilmiş olan alışılmamış yeni çevreye maruz kalmanın neden olduğu anksiyeteye bağlı olabileceğini düşünmüşlerdir [132]. Yeni nesneler ekleyerek elde edilen süper zenginleştirme, fareler arasında stres ve saldırganlığı artırır, statik ve tekrarlayan nesneler, yeniliğe davranışsal tepkileri azaltabilir [133]. Ayrıca bu sonucun kullanılan zengin çevre araçlarından, örneğin fiziksel aktiviteyi arttıracak koşu tekerleğinin yeterli olmayışından kaynaklanabileceğini de düşünmüşlerdir çünkü fiziksel aktivitenin spasyal hafıza üzerine olumlu etkileri bilinmektedir [134-136].

Adolesan dönemde kemirgenlerin strese bağlı kilo kaybına daha duyarlı olduğunu gösteren çalışmaların aksine, ergenlik döneminde öngörülebilir kronik stresin vücut ağırlığı artışı üzerinde hiçbir etkisi olmadığı da gösterilmiştir [137]. Literatürü destekler şekilde biz de öngörülebilir kronik stres grubundaki sıçanlarda kontrol ve zengin çevre grubuna göre vücut ağırlığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma saptamadık.

Hafıza oluşum sürecinde hipokampus alt birimlerinin farklı sorumlulukları olduğu kabul edilmektedir. Farklı hipokampal alt bölgelerin ortamdaki değişikliklere aynı şekilde tepki vermediği de rapor edilmiştir [138]. CA3 bölgesi Schaffer kollateral lifleri aracılığı ile CA1 bölgesiyle bağlantılıdır. Hipokampusun çıkış bölgesi olan CA1'den çıktılar subikuluma, EK ve frontal kortekse uzanır. CA1, büyük kısmı CA3'ten, çok az kısmı EK'den olmak üzere iki bölgeden bilgi alır. CA1 bölgesi kortikal

bilgiler ile CA3 ve EK'den gelen bilgiler arasında uyumsuzluk olup olmadığını değerlendirir, yani hata dedektörü gibi çalışır. Öte yandan CA3'teki tekrarlayan ağın, ilişkili belleğin saklanması ve "desen tamamlama" ile geri çağırılması için çok önemli olduğu kabul edilir, oysa DG benzer anıların ayrılmasında (desen ayırma) rol oynar. Duysal bilginin CA3'te kodlamadan önce DG hücreleri tarafından desen ayrımı yapılarak ortogonal olarak CA3'e projekte olduğu düşünülmektedir [32]. Bu hipotezler ampirik olarak test edilmiştir.

NMDA reseptörlerinin aktivitesi ile hipokampal LTP ve öğrenme/hafıza arasındaki bağlantıyı araştıran çalışmalarda, spasyal öğrenme için hipokampal NMDA reseptör aktivitesi ve NMDA reseptör bağımlı plastisitenin çok önemli olduğunu gösterilmiştir. Spasyal hafıza oluşumunda bilginin kazanılması, konsolidasyonu ve geri çağırılması konusunda yapılan çalışmalarda CA1 piramidal hücrelerindeki NMDA reseptörlerinin spasyal referans hafızanın elde edilmesi için çok önemli olduğu, CA3 NMDA reseptörlerinin ise hafızanın hızlı bir şekilde kazanılması ve modelin tamamlanmasının ardından ilişkisel hafızaya geri alınması için önemli olduğu rapor edilmiştir [139-140]. Bir çalışmada CA1-NR1 (NMDA alt reseptörü) eksik farelerde, Morris su labirentinde probe testte ciddi şekilde bozulma olduğunu ancak probe görünür olduğunda normal olduğunu göstermişlerdir [139]. Hipokampusun CA3 bölgesi karşı CA3 piramidal hücrelerinin ~% 2'sinden sinaptik bağlantılar alan piramidal hücreler ile kendi içinde güçlü bir şekilde tekrarlayan ağa sahiptir [43]. CA3'te tekrarlayan kollaterallerin sinapslarında NMDA reseptör-bağımlı LTP gösterilmiştir. CA3 NMDA reseptörleri yeni bilginin hızlı bir şekilde kodlaması için çok önemlidir [140].

Öte yandan yapılan araştırmalarda, anıların başlangıçta hipokampusa bağımlı olduğunu ve zamanla hipokampustan bağımsız hale geldiği rapor edilmiştir. Yani özellikle spasyal hafıza için daha sonra kortikal bölgelerde depolanmak üzere hipokampus geçici bir depo olabilir [141-143]. Nitekim insanlar ve hayvanlar üzerindeki onlarca yıllık araştırmalar, hipokampus ve frontal korteksin spasyal bilginin kodlanması ve geri çağırılması için gerekli olduğunu ortaya koymuştur [144]. Konsolide edilmiş spasyal hafızanın frontal kortekse gereksinim duyduğu ve medyal frontal korteksteki MAPK/ERK yolunun lokal aktivasyonu, son anıların birleştirilmesi ve hatırlanması için gerekli olduğu rapor edilmiştir [145]. Beyin gelişiminin en hızlı olduğu adolesan dönemde özellikle CA1 ve CA3'teki hücre sayıları belirgin biçimde artmaktadır ve bunun da adolesan dönemde spasyal öğrenme ve hafızanın gelişimine

katkı sağladığı kabul edilmektedir [146-147]. Bu dönemde özellikle hipokampus, dış faktörlere karşı çok hassastır. Adolesan dönemde maruz kalınan stres, diyet, zengin çevre gibi dış faktörler beyin gelişimini etkileyerek özellikle hipokampal fonksiyonlarda değişime neden olabilmektedir [15]. Çalışmamızda adolesan sıçanlarda öngörülebilir kronik stres modeli olarak, dört hafta boyunca günde 15 dakika süreyle immobilizasyon stresi uyguladık. Adolesan sıçanlarda çalıştığımız için stresin ılımlı ancak serum kortikosteron düzeylerini de artırabilen düzeyde olmasını istedik. Daha önce yapılmış bir çalışmada kronik öngörülebilir stres modelinde günde 5 dakika süreyle immobilizasyon stresi uygulanmıştır, hipokampus ve fonksiyonları üzerine olumlu sonuçlar elde etmişlerdir [19]. Ancak bu süre kortikosteron düzeylerini artırabilen bir süre değildir. Immobilizasyon stresi 10. dakikadan sonra kortikosteron düzeylerini artırmaktadır [112]. Dolayısıyla günde 5 dakika uygulanan stresin kortikosteron düzeylerinde artışa neden olamayacağı için Parihar ve arkadaşlarının [19] strese rağmen spasyal hafıza üzerine olumlu raporlarının daha ileri çalışmalar gerektirdiğini düşündük. Biz günde 15 dakika immobilizasyon stresi uyguladık çünkü bu sürenin serum kortikosteron düzeyini artırabilecek hafif şiddette öngörülebilir kronik stres modeli olabileceğini hipotez ettik. Uyguladığımız bu süre öngörülebilir stres modeli olarak daha önce çalışılmamıştır ve çalışmamız bu nedenle özgündür.

Bu çalışmada uyguladığımız stres spasyal hafızayı iyileştirmiştir. Bizim uyguladığımız sürede immobilizasyon stresi çalışılmamıştır. Ancak bulgumuz daha önce günde 5 dakika süreyle immobilizasyon stresi uygulanan çalışmanın bulguları (nörogenezde ve spasyal hafızadaki iyileşme) ile uyumaktadır [19]. Araştırmacılar stres, hafif ve öngörülebilir olduğunda beyin fonksiyonu üzerinde birçok yararlı etki sağlayabileceğini ileri sürmüşlerdir. Yaşanan stresin öngörülebilir olması ile HPA aksının uyarılması kortikosteron düzeylerinde orta derecede artışa neden olur, beyin ve vücut için yararlı yanıtların ortaya çıkışını sağlar. Bunlar kalp atım hızı ve kan basıncının artması, glikoz ve oksijenin kaslara ve beyine akışının artmasını içeren doğal reaksiyonlardır. Öte yandan, yaşam değişimleri, yönetilemeyen iş yükü veya zor çevre ile başa çıkamamadan kaynaklanan negatif stres türleri (öngörülemeyen stres) kortikosteron seviyelerini önemli ölçüde artırabilir ve majör depresyon, anksiyete ve bilişsel bozuklukların gelişimine neden olabilir [66]. Önceki çalışmalar, stres ve bilişsel işlevler arasında “ters U” ilişkisi rapor etmişlerdir. Böylece kortikosteron düzeylerinde orta derecede artışlar (hafif stres durumunda), olumlu bilişsel etkilere yol açar,

kortikosteron seviyelerinde daha büyük artışlar (ağır stres durumunda) bilişsel süreç üzerinde zararlı etkilere yol açar [148]. Çalışmamızda uyguladığımız stres ve ilginç olarak zengin çevre uygulaması serum kortikosteron düzeyinde anlamlı olmayan hafif artışa neden olmuştur. Bu beklenmeyen bir sonuç gibi görünse de literatürde yeni nesneler ekleyerek elde edilen süper zenginleştirmenin, fareler arasında stres ve anksiyeteyi artırabileceği rapor edilmiştir [134-135]. Çalışmamızda günde 15 dakika süreyle immobilizasyon stresi uygulaması ile serum kortikosteron seviyelerinin anlamlı olarak artmamış olmasını daha önce de ifade ettiğimiz gibi şöyle açıklayabiliriz. Hipokampusta glikokortikoid reseptörleri yoğun olarak bulunmaktadır. Bu reseptörler, yeterli miktarda kortizol ile bağlandığında, hipotalamus üzerinde negatif feedback etkisi yaparak, CRF salınımını inhibe edebilir. Bu yolla hipokampus, kortizolu belli seviyede tutar [122]. Kortikosterondaki hafif artışların beyinde NMDA ve AMPA reseptörlerinin ekspresyonunu artırarak glutamaterjik nörotransmisyonu arttırdığı gösterilmiştir. Bu da spasyal hafıza için gerekli sinyal yollarını tetiklemektedir. Çalışmamızda adolesan dönemde 28 gün öngörülebilir stres uygulanmasının hipokampal devrelerde eksitator nörotransmisyonu artırdığını düşünüyoruz. Öngörülebilir stres grubumuzda spasyal hafızada iyileşme saptamış olmamız literatürde hafif stresin bilişsel fonksiyonlara olumlu etkisini rapor eden çalışmalarla uyusmaktadır [148].

Çalışmamızda adolesan dönem boyunca zengin çevre uygulaması da spasyal hafızayı iyileştirmiştir. Bu bulgumuzu destekleyen bir çalışmada 27 günlük sıçanlara 12 gün süreyle zengin çevre uygulanması Morris su tankı ile değerlendirilen spasyal hafızayı iyileştirmiştir [135]. Bir başka çalışmada zengin çevre uygulamasının yüzme hızını artırdığını, ancak Morris su tankında spasyal hafıza iyileşmesinin yüzme hızından bağımsız olduğunu rapor etmişlerdir [135]. Benzer şekilde biz de zengin çevre uyguladığımız grupta yüzme hızının arttığını ve spasyal hafızada iyileşmeyi saptadık.

Öğrenme ve hafızanın temelini oluşturan LTP oluşumu ya da sinaptik plastisite oluşumunda önemli medyatörlerden biri BDNF'dir. BDNF mRNA ve protein ekspresyonu hipokampus ve frontal kortekste yoğun olmak üzere beynin birçok bölgesinde tespit edilmiştir [33]. BDNF'nin gen ifadesinin düzenlenmesinde, nöronal sağkalım ve sinaptik plastisite ile ilişkili genleri düzenleyen transkripsiyon faktörlerinden biri olan CREB'in etkisi vardır [39]. CREB fosforillendiğinde transkripsiyonel olarak aktifleşir ve nöronal aktiviteye, hormonlara ve büyüme faktörleri gibi uyaranlara karşı cevap oluşturur [149]. BDNF'nin sentezindeki yetersizlik nörodejeneratif hastalıkların

patogenezinden sorumlu tutulabilmektedir. Nöronal aktivite ya da öğrenme ve hafıza süreci BDNF ekspresyonunda artışla pozitif korelasyon gösterir. Sıçanlarda hippokampus BDNF tedavisinin spasyal hafızayı desteklediği rapor edilmiştir [150]. Ayrıca spasyal öğrenme ve hafıza sürecinde nörogenezin önemi kanıtlanmıştır [15]. Zengin çevre uygulamasının spasyal hafızayı iyileştirmesi ve nörogenezi artırmasında BDNF'nin gerekli olduğu da rapor edilmiştir [151]. Ayrıca son yıllarda ilginç olarak ROS'un da sinaptik plastisite oluşumunda fizyolojik katkısı olduğu bildirilmiştir [61, 152]. Presinaptik nöronların uyarılması postsinaptik nörona kalsiyum girişine neden olan AMPA, NMDA reseptörlerinin aktivasyonuna ve sonuçta cAMP ve cGMP /NO üretimi gibi küçük haberci moleküllerin üretimine neden olur. Bu haberci moleküller CaMKII, PKA, PKC ve ERK gibi çeşitli protein kinaz sinyal yollarının aktiflenmesini tetikler. Bu da uzun süreli LTP ve uzun süreli hafıza oluşumu için gerekli sinaptik güç, sinapsların sayısının artırılması olarak bilinen sinaptik plastisite yani sinaps morfolojisinin değişiminde gerekli olan birçok transkripsiyon dalgasını başlatan CREB'in fosforilasyonunu sağlar. NO gibi sinyal yolları CREB aracılı gen transkripsiyonuna ek olarak direkt olarak da LTP indüklenmesinde ve korunmasından sorumludur [152]. Ayrıca ROS'ların da CaMKII, PKA, PKC ve ERK olmak üzere haberci moleküllerin aktiflenmesi ve CREB'in fosforilmesini sağlayarak LTP oluşumunda ve korunmasında esas moleküller olduğu kabul edilmektedir. NMDA reseptörünün aktivasyonu NADPH oksidaz ile süperoksit üretimini tetikler. Bu da LTP oluşumunun korunması için önemli olan PKC oksidasyonuna, çinko serbestlenmesi ve otonom PKC aktivasyonuna neden olur [153].

Çalışmamızda adolesan dönemde sıçanlara öngörülebilir kronik stres ve zengin çevre uygulanması spasyal hafızayı iyileştirirken hipokampusta BDNF seviyelerinin de arttığını saptadık. Bu bulgular zengin çevre için beklenen bir sonuç olmasına rağmen öngörülebilir kronik stres için bir paradoks gibi görünebilir. Ancak stres düzeyinin düşük ve öngörülebilir olduğu durumda (kortikosteron düzeylerinin çok fazla artmadığı durumlarda) hafızayı desteklediğini ve bunun nedenlerini de daha önce geniş bir şekilde açıkladık ve tartıştık. Ayrıca asimetrik olarak çalışılmamış olsa da bulgumuzu destekleyen bir çalışmada adolesan dönemde uygulanan stresin hipokampus BDNF düzeyini artırdığı, oysa erişkin dönemde uygulanmanın BDNF'yi düşürdüğü gösterilmiştir [154]. Bu durum erken dönemde yaşanan stresin koruyucu veya zararlı bir sonuç oluşturup oluşturmadığında stresin zamanlaması, süresi ve ciddiyetinin önemli

faktörler olabileceğini düşündürmüştür. Yine başka bir raporda şiddetli stres nörotrofik faktörlerin düzeylerini azaltırken, hafif stres veya düşük kortikosteron dozlarının verilmesinin, BDNF gibi nörotrofik faktörlerin seviyelerinde artışlara neden olduğu gösterilmiştir [154-155]. Bu bulgu da öngörülebilir kronik stres grubumuzda hipokampal BDNF seviyesindeki artışla uyusmaktadır. Ancak öngörülebilir kronik stresin faydalı etkilerinin altında yatan mekanizmaları daha iyi anlamak için, olası faktörlere yönelik çalışmalar genişletilmelidir.

Zengin çevre uyguladığımız grupta hem spasyal hafızadaki iyileşmeyi hem de hipokampusta BDNF artışını gösteren bulgularımız literatürle uyusmaktadır [82-84, 87]. Ancak çalışmamızı özgün kılan en önemli unsur öngörülebilir kronik stres ve zengin çevrenin spasyal hafızadan sorumlu medyatörler üzerine etkisini hipokampus sol ve sağ yarısında ayrı ayrı yani asimetri açısından araştırmamızdır. Bildiğimiz kadarıyla adolesan dönemde öngörülebilir kronik stres ve zengin çevre uygulamasının BDNF ve araştırdığımız diğer parametreler bağlamında hipokampal asimetriyi araştıran çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamızda kontrol grubunda hipokampus BDNF düzeylerinde sol>sağ asimetrisi vardı. Hem öngörülebilir kronik stres grubu hem de zengin çevre grubunda sağ ve sol hipokampusta BDNF seviyesi kontrol grubuna göre anlamlı olarak artmıştı. Ancak ilginç olarak öngörülebilir kronik stres grubunda hipokampal BDNF seviyesi sağ>sol asimetrisi gösterirken, zengin çevre grubunda ise hipokampusta BDNF seviyesi sol>sağ olarak asimetri gösterdi. Hipokampusta BDNF ekspresyonundaki asimetric bulgumuzu daha sonra diğer parametrelerimizle birlikte tartışacağız. Diğer yandan beyindeki tüm hücrelerde eksprese edilen bir nükleer transkripsiyon faktörü olan CREB'in uzun süreli hafıza için kritik modölatör olduğu kabul edilmektedir. Kalsiyum veya siklik adenosin monofosfat (cAMP) konsantrasyonundaki artışlar, CREB'nin fosforilasyonunu ve aktivasyonunu tetikleyebilir. Bu transkripsiyon faktörü, hafızayı da içeren geniş bir yelpazedeki biyolojik fonksiyonları düzenleyen hücre içi sinyal olaylarının bileşenidir [156-159]. Çalışmamızda her iki deney grubunda da (öngörülebilir kronik stres ve zengin çevre grubu) BDNF'nin ekspresyonunu düzenleyen ve öğrenme/hafıza oluşumunda önemli transkripsiyon faktörü olan CREB proteinin hipokampus seviyelerinde değişim gözlenmedi. Bu bulgu, stres grubu için normal gibi görünebilir. Çünkü kronik stresin CREB düzeyinde düşüşe neden olabileceği rapor edilmiştir [159]. Ancak stres grubunda spasyal hafızanın iyileşmesi, hipokampal BDNF'nin artması ile hipokampusta CREB'in artmaması paradoks gibi

görülmektedir. Öte yandan zengin çevrenin, özellikle erken dönemde spasyal hafızayı iyileştirirken CREB düzeyinde artışa neden olduğu rapor edilmiştir [159-160]. Bu literatürle çelişir şekilde zengin çevre uyguladığımız grupta hipokampusta CREB’de artma olmazken spasyal hafıza iyileşti ve hipokampusta BDNF arttı. Bunun nedenini şöyle açıklayabiliriz. CREB’in aktive olması için fosforillenmesi gerekmektedir. CREB proteini çeşitli kinazlar tarafından fosforillenerek aktive edilir ve DNA sekanslarına bağlanır ve öğrenme-hafızaya ilişkin genlerin transkripsiyonunu sağlar [159-160]. CREB’in transkripsiyonel aktivitesi, protein kinazların ve fosfatazların zıt etkileri ile belirlenen fosforilasyon durumuna bağlıdır. Voltaj ve ligand-bağımlı kanallar aracılığıyla hücre içi kalsiyum seviyelerinde artış, G-protein-bağı reseptörlerin aktivasyonu yoluyla cAMP, siklik guanozin monofosfat (cGMP), NO ve arasıdonik asit gibi küçük haberci moleküllerin üretimine yol açar. Büyüme faktörleri ayrıca cAMP seviyelerini arttırmak için reseptör tirozin kinazları aktive edebilir. Bütün bu yollar CREB fosforilasyon seviyelerini etkiler. Nöronal aktivitenin uyardığı protein kinaz, mitojen ile aktive edilmiş protein kinaz ve kalsiyum kalmodulin-bağımlı protein kinaz IV’in Ser133’te CREB’i fosforillediği gösterilmiştir. LTP oluşumu için fosforillenmiş CREB gereklidir. Örneğin, NMDA reseptörlerinin aktivasyonu, extrasinaptik nöronlarda CREB defosforilasyonuna yol açarken, sinaptik bölgelerde CREB fosforilasyonuna ve CREB’e bağımlı gen ekspresyonuna yol açmaktadır [159]. Bu süreçte oluşan yeni proteinler öğrenme ve uzun süreli hafıza oluşumunun temeli olan LTP ve sinaptik plastisite (glutamat reseptör ekspresyonunun artması, sinaptik morfolojinin değişimi, sinapsların sayısının ve etkinliğinin artması) oluşumu için çok önemlidir. Çalışmalar CREB’in fosforilasyonunun, BDNF ifadesi ile ilişkili olduğunu rapor etmiştir. BDNF, transkripsiyon düzenleyici bölge olan Ser-133’te CREB fosforilasyonuna sebep olur ve CREB’in aktiflenmesi diğer proteinlerle etkileşerek gen transkripsiyonunu tetikler [160-161]. Dolayısıyla LTP sürecinde fosforile CREB miktarı artmaktadır [162] ve çalışmamızda fosforile CREB değil CREB proteinini ölçtüğümüz için CREB protein seviyesini değişmemiş bulmamız sürpriz değildir. Nitekim bizi destekleyen bir çalışmada hipokampal nöronlar yüksek frekansla uyarılarak LTP indüklenmiştir. LTP oluşumu ve LTP’nin uzun süre korunması sırasında CREB fosforilasyonun arttığı ve LTP’nin korunmasında fosforile CREB’in kritik rol oynadığı, ancak hipokampal nöronların yüksek frekansla uyarılmasından sonra CREB protein seviyesinin anlamlı olarak değişmediği saptanmıştır [162]. Deney gruplarımızda

hipokampusta BDNF seviyesinde artış bulmamız, BDNF'nin CREB proteinin fosforillemesine neden olabileceğini ve bu nedenle CREB proteininde artış saptayamadığımızıda düşündürdü. Diğer yandan, spasyal hafızada CREB'in rolü hala tartışmalıdır. Daha önce ifade ettiğimiz gibi çok sayıda çalışma, spasyal hafıza oluşumunun hipokampusta artmış CREB fosforilasyonu ile ilişkili olduğunu göstermiştir [162]. Tersine farelerde spasyal hafıza bozuklukları, zengin çevre gibi CREB-bağımlı aktivasyonu kronik olarak arttıran koşullar tarafından düzeltilmemiştir. CREB aracılı plastisite ile spasyal hafıza ilişkisi ters U fonksiyonu ile açıklanmıştır. Morris su labirentindeki optimal öğrenmenin, CREB yolunun uygun düzenlenmesini gerektirdiğini önermişlerdir [163-165]. Dolayısıyla spasyal hafıza-CREB ilişkisinin daha ileri araştırmaları gerektirdiğini düşünüyoruz.

Öte yandan öğrenme ve hafıza için önemli diğer haberci molekül NO'dur. NO, LTP oluşumuna katkı sağlayan en önemli moleküllerden biridir [168]. Çalışmamızda hipokampus dentat girus, CA3 ve CA1 alt bölgelerinde sol ve sağ ayrı olarak nNOS ve eNOS ekspresyonunu araştırdık. NO, glutamaterjik NMDA reseptör yolunda retrograd bir haberci olarak davranır. Presinaptik terminalde, çözünür guanilil siklaz (sGC), postsinaptik hücrelerden salınan NO tarafından indüklenir. Daha sonra ikincil haberci cGMP sGC tarafından oluşturulur ve artan cGMP seviyesi presinaptik terminalden glutamat salınmasını hızlandırır. Sonuç olarak, bu presinaptik mekanizmalar, erken LTP evresine katkıda bulunur. Dolayısıyla NO, hipokampal LTP, öğrenme ve hafıza oluşturma süreçlerinde önemli bir role sahiptir [166]. NO üretimini sağlayan NOS inhibisyonu spasyal öğrenmede bozulmaya neden olmuştur ve hafıza performansını azaltmıştır [166]. NOS'un eNOS ve nNOS türleri hipokampusta bulunurlar ve bilişsel işlevlerde rol oynarlar [166]. Hipokampusta nNOS'a göre eNOS'un daha fazla bulunduğu, hipokampal dentat girus ve CA1 piramidal hücrelerde LTP oluşumunda gerekli NO'nun eNOS tarafından üretildiği bildirilmiştir [167]. Ayrıca BDNF'ye yanıt olarak üretilen NO'nun da eNOS kaynaklı olduğu rapor edilmiştir [168]. Çalışmamızda hipokampus alt alanlarında nNOS ve eNOS ekspresyonuna baktığımızda, nNOS için kontrol grubu DG'sinde anlamlı sol>sağ asimetrisi vardı. Öngörülebilir stres grubunda sol DG'de nNOS kontrol grubu ile aynı ancak hem stres hem de zengin çevre grubunda sağ DG'de nNOS kontrol grubunun sağına göre anlamlı olarak artmıştı, her iki deney grubunda da DG'de nNOS için asimetri yoktu. CA3'te nNOS açısından gruplar arasında anlamlı fark yoktu. CA1'de nNOS için kontrol grubunda sol>sağ asimetrisi vardı.

Ancak hem öngörülebilir kronik stres hem de zengin çevre grubunda sol CA1'de nNOS kontrol ile aynı iken sağ CA1'de nNOS kontrol grubunun sağına göre anlamlı olarak artmıştı. Yani her iki deney grubunda CA1'de nNOS için asimetri yoktu. Hipokampus alt bölgelerinin öğrenme ve hafıza oluşumunda farklı görevleri olduğunu daha önce ifade etmiştik. Dentat girus ve CA3 bilginin kazanımı ve kodlanması, CA1 ise uzun süreli hafıza oluşumunda ve geri çağırma sorumlu olabileceği rapor edilmiştir [32]. Bulgularımızı buna göre değerlendirdiğimizde öngörülebilir kronik stres grubunda sağ DG ve sağ CA1'de nNOS'un artmış olması nNOS'un öğrenme ve hafıza fonksiyonunda bilginin kazanımı ve geri çağırılmasına katkıda bulunduğunu, ancak nNOS'un bu işlevini daha çok sağ hipokampus üzerinden sağladığını düşündük. Ancak kontrol grubunda saptanan asimetrinin ortadan kalkmış olması da spasyal hafıza oluşumunda sol-sağ hipokampusun hafıza oluşumunda birlikte entegrasyonunun söz konusu olabileceğini düşündürmüştür. Nitekim iki hipokampal lobun aktiviteleri nasıl işledikleri hala açık değildir. Bununla ilgili bir çalışmada, interhipokampal bağlantıların sol ve sağ loblar boyunca akan bilginin farklı yönlerini entegre ettiği, sol ve sağ hipokampusun birlikte işlevi rapor edilmiştir [169]. Ayrıca bir çalışmada sanal bir kasabada navigasyonla ilgili erişim görevleri sırasında PET kullanımıyla, Maguire ve arkadaşları başarılı ve başarısız denemeler sırasında bilateral hipokampal aktivasyon bulmuşlardır. Bununla birlikte, navigasyonun doğruluğu sağdaki artmış kan akımı ile ilişkililiydi [169].

Oysa eNOS için durum daha farklı idi. Kontrol grubunda DG'de eNOS sol>sağ asimetrisine sahipti, diğer iki bölgede sol-sağ farkı yoktu. Ancak öngörülebilir kronik stres grubunda DG'de eNOS için sağ>sol asimetrisi varken, CA3 ve CA1'de sağda eNOS azaldı ve sol>sağ farkı oluştu. Zengin çevre grubunda DG'de eNOS kontrol ile aynıydı. Zengin çevre grubunda sol CA3 ve CA1'de eNOS kontrol sola göre arttı ancak asimetri yoktu. Öngörülebilir stres grubunda DG'de eNOS'un sağ>sol asimetrisi göstermesi bilginin kazanılması yani patern ayırımına eNOS'un sağ hipokampusta katkıda bulunabileceğini, CA1'de ve CA3'te eNOS için sol>sağ asimetrisi bilginin kodlanması ve geri çağırılmasında sol hipokampusta eNOS sorumluluğunu düşündürdü. Bulgularımız öngörülebilir kronik stres ve zengin çevre gruplarında spasyal hafıza fonksiyonunun iyileşmesinde NOS'ların katkılarının NOS'un türüne göre değişebileceğini gösterdi. nNOS için kontrol grubunda var olan asimetrinin ortadan kalkması, nNOS işlevinde sol-sağ hipokampus entegrasyonunu düşündürdü. Oysa

eNOS için kontrol grubunda asimetri saptanmazken, stres grubunda eNOS için asimetri oluşması bilginin kazanılması sırasında sağ hipokampusun ama kodlama ve geri çağırma sol hipokampusun sorumluluğunu düşündürdü. Diğer taraftan BDNF'ye yanıt olarak NO üretimini gösteren çalışmalarda, BDNF reseptörü TrkB'nin immunoreaktivitesi ile birlikte nNOS saptanmazken eNOS saptanmıştır. Bu da BDNF üretiminde eNOS kaynaklı NO'nun sorumluluğunu düşündürmüştür. Ayrıca LTP'yi uyaran NO'nun hipokampal piramidal hücrelerdeki eNOS tarafından üretildiği rapor edilmiştir [171]. eNOS ile ilgili bulgumuzu BDNF bulgumuzla birlikte tartışacak olursak; hipokampal BDNF sonuçlarımız öngörülebilir kronik stres grubunda sağ>sol, zengin çevre grubunda sol>sağ asimetrisi gösterdi. Stres grubumuzda DG'de eNOS'un sağ >sol asimetrisi göstermesi, bu grupta BDNF'nin sağ>sol asimetrisi ile uyuşmakta ve DG'de spasyal bilginin desen ayrımı yapılması sırasında eNOS'un ve eNOS tarafından üretilen NO ile uyarılan BDNF sorumluluğunu düşündürmektedir. Ayrıca bu işlevin öngörülebilir kronik stres grubunda sağ hipokampus aracılı olduğunu düşündürdü. Zengin çevre grubunda ise bu durum stres grubunun tam tersi idi. Zengin çevre grubunda DG'de eNOS sol>sağ, hipokampusta BDNF sol>sağ asimetrisi vardı. Bu da zengin çevrede DG'de patern ayrımının eNOS-BDNF ilişkisi üzerinden sol DG tarafından yapıldığını düşündürdü. Benzer çalışma olmaması nedeniyle bu bulgularımız ilk ve özgündür, ayrıca bulgularımız eNOS ve BDNF arasındaki pozitif etkileşimi desteklemektedir.

Çalışmamızı ilginç ve özgün kılan oksidatif stres markırlarına ait bulgularımız ilktir. Öngörülebilir kronik stres grubu ve zengin çevre grubunda spasyal hafızanın iyileşmiş olmasına rağmen her iki grupta da sağ hipokampusta lipid peroksidasyonu ürünü olan MDA'nın kontrol grubu sağ hipokampusa göre artmış olması ilginçti ve beklenmeyen bir sonuçu. Ancak protein oksidasyonu göstergesi olan PCO düzeyleri ve antioksidatif enzim olan SOD düzeylerinde kontrole göre farklılık yoktu. Beyin, oksijen tüketiminin yüksek olması nedeniyle ROS üretiminin fazla olduğu metabolik olarak aktif bir organdır. Büyük miktarda ROS, normal olarak antioksidanlar ağı tarafından kontrol altında tutulur. ROS'lar tipik olarak nörotoksik moleküller olarak kategorize edilir, enzim ve yapısal proteinler gibi esansiyel makromoleküllerin oksidasyonu yoluyla zararlı etkileri gösterebilirler. En önemlisi, aşırı ROS bilişsel işlevde düşük performans ile ilişkilidir. Bununla birlikte, çok yüksek konsantrasyonlarda olmadığında ROS'lar, sinaptik plastisite için gerekli olan fonksiyonel değişikliklere ve dolayısıyla

normal bilişsel işlevleri destekler [153]. Bir çalışmada LTP sırasında üretilen ROS'un sinapslardaki yapısal değişikliklerin sağlamlığı ve kalıcılığı için gerekli olduğu gösterilmiştir [61]. Son yıllarda bu yönde raporlar çok fazladır ve biz de çalışmamızda özellikle zengin çevre için hiç beklemediğimiz şekilde MDA'da artış saptadık. İlginç olarak MDA'nın sinyal habercisi ve gen ifadesini düzenleyici olabileceği de rapor edilmiştir. MDA'nın pankreas adacıklarında glikozla uyarılan insülin sekresyonunu düzenleyen haberci molekül olduğu bildirilmiştir [170]. Orta derecede yüksek MDA seviyeleri (5-10 mikrolitre) adacıklarda glikozla uyarılan insülin sekresyonunun anahtar molekülleri olan Adenozin trifosfat/Adenozin difosfat oranını ve sitosolik kalsiyum seviyesini, gen ekspresyonunu ve protein aktivasyonu etkilemiştir [170]. Dolayısıyla çalışmamızda zengin çevre ve öngörülebilir kronik stres grubunda spasyal hafızanın iyileşmesi ve hipokampusta BDNF'nin artması gibi olumlu etkilerle çelişir gibi görünen ve ilginç olarak sadece sağ hipokampusta artan MDA'nın, muhtemelen şu etkilerle sinyal molekülü olarak görev yapmış olabileceğini düşündük. CREB'in fosforillenmesine, LTP oluşumuna, sinaptik plastisitenin özelliği olan yeni dendritik spinlerin sağlam olmasına katkı sağlamış olabilir. Her iki deney grubumuzda hipokampal MDA seviyeleri sağ hipokampusta daha fazla artarak sağ>sol asimetrisi gösterdi. Deney gruplarımızda iyileşmiş hafıza ile birlikte düşündüğümüzde, bu bulgu hafıza oluşumunda sağ hipokampusun işlevine katkıda bulunan sinyal yollarında MDA'nın aracılığını düşündürdü. Çalışmamızda hipokampusta artan MDA'nın spasyal hafıza oluşumunda katkı sağlayan sinyal molekülü olarak görev yaptığını kanıtlayan bulgumuz şudur. Çalışmamızda spasyal hafızada görev alan diğer beyin bölgesi frontal kortekste de oksidatif stres markırlarını değerlendirdik. İlginç olarak sol-sağ frontal kortekste MDA düzeyleri kontrol grubuna göre farklı değildi. Hipokampusta protein oksidasyonunun olmayışı (MDA oksidatif markır olarak çalışsaydı proteinlerle etkileşerek protein oksidasyonuna neden olabilirdi), SOD düzeylerinde düşme olmaması ve frontal kortekste MDA'nın artmamış olması bize MDA'nın öğrenme ve hafıza fonksiyonunun nörobiyolojik temeli olan hipokampusta LTP'nin oluşumunda sinyal molekülü olarak çalıştığını ve bu görevinde lateralizasyonu düşündürdü. Bu özgün bulgumuza dayanarak MDA'nın öğrenme hafıza oluşumunda katkısının daha ileri araştırılması gereğini söyleyebiliriz. Çünkü nörodejeneratif hastalıkların patogenezinin birincil olarak sorumlu tutulan ROS'u, terapötik yalaşımlarda hedef alan çalışmalarda, ROS'un fizyolojik fonksiyonlarının göz ardı edilmemesi gerektiği ve çalışmamızda ilk

olarak gösterdiğimiz gibi bu ROS'un oluşumunda hipokampal asimetri olmasının, asimetri değişimleri ile ilişkilendirilen nöropsikiyatrik hastalıklarda dikkate alınması gerekliliğini düşündürdü. Ayrıca Tetrahidrobioprotein (BH4) eNOS aktivitesi için gerekli bir kofaktördür ve oksidatif stresle inhibe olabilmektedir [171]. Dolayısıyla öngörülebilir kronik stres grubunun sağ CA3 ve CA1 bölgelerinde eNOS aktivitesindeki düşüşün bir nedeni de sağ hipokampusta artmış olan MDA nedeniyle olabilir. Bu nedenle oksidatif markırların hipokampus alt bölgelerinde daha ileri araştırılması gerektiğini düşünmekteyiz.

Çalışmamızda yapısal asimetriyi araştırmak için hipokampus alt alanlarında nöronları işaretleyen NeuN ile immunohistokimyasal olarak nöron sayısını da değerlendirdik. Kontrol grubunda hipokampus alt bölgelerinde NeuN pozitif hücre sayısında anlamlı olarak sol>sağ asimetrisi saptandı. Bu bulgu kontrol sıçanlarında hipokampusta nöron sayısı açısından asimetriyi göstermektedir. Deney gruplarında spasyal hafıza iyileşmesine rağmen DG'de NeuN pozitif hücre sayısının kontrole göre azalmış olması beklenmeyen bir bulgu idi.

NeuN proteini, memelilerin merkezi sinir sistemindeki nöronların çoğunun çekirdek ve çok az olarak da perinükleer sitoplazmasında lokalizedir ve postmitotik nöronlar için immunhistokimyasal bir belirteç olarak kullanılmaktadır [172-173]. Dolayısıyla NeuN immunoreaktivitesinin azalmış olması nöron hasarını düşündürmektedir. Bu da çalışmamızda saptadığımız spasyal hafızadaki iyileşme ile ters düşen bir durumdur. Çünkü hipokampal DG öğrenme, hafıza için çok önemli rol oynayan beyin bölgesidir. Hipokampal DG nöronları, subgranüler bölgedeki nöral progenitör hücrelerden sürekli olarak üretilir [32]. Dolayısıyla çalışmamızda deney gruplarımızda kontrol gruba göre DG'de NeuN immunoreaktivitesinin azalmasını nöron hasarı ile açıklayamayız. Literatürde NeuN- negatif durumunun her zaman nöron hasarına işaret etmeyeceği rapor edilmiştir. NeuN immunoreaktivitesinde azalmanın NeuN proteininin antijenisitesinin kaybolmasından kaynaklanabileceği rapor edilmiştir [174]. Nitekim bir çalışmada serebral iskemiden sonra fare beyindeki NeuN immünoreaktivitesini ve NeuN protein düzeylerini kaybeden nöronların morfolojik özellikleri araştırılmış, nükleer NeuN boyama azalmıştır. Bununla birlikte, aynı bölümlerin Hoechst 33258 ile boyanması, çekirdeklerin sağlam bir membran ile korunduğunu ve nöronların hala bütünlüklerini koruduğunu ortaya koymuştur. Ayrıca, araştırmacılar Western blot boyama ile NeuN protein seviyelerinin azalmadığını

göstermişlerdir, bu da azalmış NeuN antijenitesinin immünoreaktivite kaybına neden olduğunu düşündürmüştür. Sonuç olarak, NeuN immünoreaktivitesi metabolik değişikliklerle kolaylıkla azaldığından, NeuN boyanmasındaki azalmanın nöronal kaybının bir göstergesi olarak düşünülmemesi gerektiği rapor edilmiştir [175].

Son yıllarda epigenetik mekanizmalar öğrenme ve hafızada merkezi bir süreç olarak ortaya çıkmıştır. Öğrenme ve hafıza oluşumunda, nöronun fiziksel yapısındaki yeniden yapılanma süreci epigenetik mekanizmalarla açıklanmaya çalışılmaktadır. Uzun süreli hafıza oluşumunda gen transkripsiyonu ve protein sentezinin önemli olduğunu bilinmektedir. Ancak sentezlenen proteinlerin kısa sürede yıkımı nedeniyle öğrenilen bilgilerin uzun süre depolanmasını sağlayan moleküler mekanizmalar açık değildir. Hücresel düzeyde, hafıza çok iyi bir şekilde koordine edilmiş transkripsiyon ve translasyon programına, ayrıca beynin yapısal ve fonksiyonel değişikliklerine ihtiyaç duyar. Hafıza çevrenin genomumuz üzerinde transkripsiyonel etkisi ile sonuçlanır. Dolayısıyla epigenetiğin kognitif fonksiyonların kritik bir düzenleyicisi olabileceği düşünülmektedir. Epigenetik mekanizmalar kalıcı nöral ve davranışsal modifikasyonların oluşturulmasında önemli rol oynayabileceği düşünülmektedir [176-178]. Son yıllarda kanıtlar, uzun süreli hafıza oluşumu ve devamı için gerekli olan gen ifadesinde aktiviteye bağlı değişiklikler DNA metilasyonu, histon modifikasyonları dahil olmak üzere epigenetik mekanizmalarla ilişkili olduğunu göstermiştir. DNA metilasyonu sıklıkla gen susturulmasını indükleyen inhibe edici bir değişiklik olarak kabul edilir. Ancak son zamanlarda DNA metilasyonunun, nöral aktiviteyle deneyime bağlı bir şekilde düzenlendiğine dair kapsamlı kanıtlar ortaya çıkmaktadır [178]. Nörobilimdeki son çalışmalar DNA'nın metilasyonunun hem hafıza oluşumunu hem de oluşan hafızanın sürekliliğini sağladığı rapor edilmiştir. DNA metilasyonu uzun süreli hafıza için gerekli olan transkripsiyonel düzenlemeye katılmaktadır [178-179]. Ayrıca DNA metilasyonu hipokampal DG'de gerçekleşen ve spasyal öğrenme, hafıza oluşumunda kritik önemi olan nöral kök hücrelerin kendini yenilemesinde, yönelim tayininde ve yeni nöronların nihai olgunlaşmasında, yani nörogenizde anahtar oyuncu olduğu ortaya çıkmıştır [180]. Bu da, dolaylı olarak DNA metilasyonunun hafızayı desteklediğini açıklar.

DNA metilasyonu DNA metiltransferazlar tarafından metil gruplarının eklenmesini ifade eder. Eklenmiş olan metil gruplarının dışarı doğru çıkıntı yapması DNA protein etkileşimlerini etkileyebilmektedir. Hücre farklılaşmaları sırasında ortaya

çıkan gen ifadesindeki değişiklikler DNA'nın farklı epigenetik durumlarda bulunan farklı kromatin yapılarına paketlenmesiyle ortaya çıkmaktadır. DNA metilasyonu kromatin yapısını etkiler ve heterokromatin olarak ifade edilen DNA'nın yoğun paketlenmiş durumudur.

Diğer yandan, NeuN çekirdek içinde düşük kromatin yoğunluğuna sahip bölgelerde bulunur, aksine yoğun şekilde paketlenmiş DNA içeren alanlarda neredeyse hiç görülmez [181]. Yapılan çalışmalar NeuN konsantrasyonunun DNA paketlenme yoğunluğuyla ters orantılı olduğunu göstermektedir. Muhtemelen yoğun paketlenmiş ya da heterokromatin DNA (metillenmiş DNA), NeuN bağlanmasını engellemektedir, dolayısıyla NeuN boyanma gerçekleşmemektedir. Bu bilgiler ışığında çalışmamızda öngörülebilir kronik stres ve zengin çevre gruplarında spasyal hafızada iyileşmeye rağmen sol ve sağ DG'de NeuN yoğunluğunun düşük olmasını dolaylı olarak nörogenezde artışla açıklayabiliriz. Çünkü nörogenez sırasında DNA metilasyonunun arttığı, dolayısıyla yoğun kromatin yapısı nedeniyle NeuN'nin DNA'ya bağlanmasının engelleneceğini düşündük. Böylece NeuN pozitif hücre sayısı azalmış olabilir. Ayrıca her iki deney gruplarımızda sol CA3 ve CA1'de NeuN yoğunluğunun azalması hafıza kodlanması sırasında oluşan hücresel değişiklikler ya da bu değişiklikleri sağlayan epigenetik değişikliklerin sürekliliğin sağlanmasında gerekli olan DNA metilasyonunun sol CA3 ve sol CA1'de gerçekleştiğini ve dolayısıyla sol tarafta NeuN pozitif hücre sayısının azaldığını düşündürdü. Ayrıca bu bulgu bilginin işlenmesi/desen ayırımında sol ve sağ DG'nin sorumluluğu, ancak kodlamada ve konsolidasyonda sol hipokampusun sorumluluğu olabilir. Öngörülebilir kronik stres grubu ve zengin çevre grubunda spasyal hafıza iyileşmesine rağmen NeuN pozitif hücre sayısının hipokampus alt bölgelerinde asimetric olarak azalmış olmasının bir nedeni olarak ortaya attığımız bu spekülasyon yeni hipotezlere ve çalışmalara temel oluşturabilir.

Hipokampusun yapısı ve fonksiyonu (özellikle spasyal hafıza) ile ilgili asimetri uzun zamandır bilinmektedir [8]. Spesifik olarak, sol hipokampusun epizodik, bağlamsal ve otobiyografik hafızadan [182] sağ hipokampus spasyal hafıza-yön bulma dan sorumlu olduğu kabul edilmektedir [183]. Sağlıklı gruplarda hipokampusun volumetrik analizi, cinsiyet, yaş ve yaşam tarzına bağlı olarak çelişkili sonuçlar vermiştir. Sağ>sol ve sol> sağ olduğunu rapor eden çalışmalar neredeyse eşit sayıdadır [184]. Laboratuvarlar arası farklılıkları en aza indirmek için segmentasyon protokolü kullanan 40 sağlıklı gönüllü ile yapılan yüksek çözünürlüklü manyetik rezonans

görüntüleme tekniği ile, sağ hipokampus (3324 mm^3)'un soldan (3208 mm^3) daha büyük olduğu gösterilmiştir [184]. Benzer şekilde Horvath ve ark. 2002'de [185] ve Pedraza ve ark. 2004'te [186] sağ hipokampusun soldan büyük olduğunu rapor etmişlerdir. Ayrıca 32 tam dönem ve 184 erken doğan bebekte sağ>sol hipokampal asimetri olduğu gösterilmiştir [187]. Morris su labirentinde eğitilen sıçanlar, sağ dorsal hipokampusta sola göre anlamlı bir şekilde daha yüksek oranda gen ekspresyonu değişikliği göstermişlerdir [5].

Sağ hemisferin dil dominansı olduğu bilinmektedir [188]. Ancak sol hipokampusun sözel hafızada önemli rolü olduğuna inanılmaktadır [189]. Ancak bir başka çalışma sağ hipokampusun çıkarılması sözel hafızayı engellemiş, sol hipokampusun çıkarılması ise hafızayı engellememiştir [189]. Şimdiye kadar hafıza fonksiyonunun lateralitesi yeterince açık değildir. Ancak, Ogawa ve ark hafıza fonksiyonunun lateralitesinin anatomik lateralite ile değil, dil dominansı ile ilintili olabileceği önermişlerdir [190]. Kemirgen hipokampusunda sinaptik asimetri rapor edilmiştir [191] ancak hipokampusun her iki yarısı arasındaki bağlantılar nedeniyle yeterince dikkate alınmamıştır. Çalışmamızda NeuN işaretli hücre sayısı açısından kontrol grubunda sol>sağ asimetrisi vardı. Bunun yanında araştırdığımız diğer markırlar için de kontrol grubunda sol>sağ asimetrisi mevcuttu. Ancak spasyal hafızanın iyileştiği deney gruplarında araştırdığımız markırlar açısından bazı istisnalar olsa da sağ baskın hipokampal asimetri olduğunu söyleyebiliriz. İlginç olan uyarana (öngörülebilir kronik stres ya da zengin çevre) bağlı olarak farklı asimetri saptamamızdı. Örneğin BDNF stres grubunda sağda artarken, zengin çevre grubunda solda arttı. Her iki grup için DG'de eNOS ekspresyonundaki asimetri de BDNF ile paraleldi. DG hipokampusun yeni nöron üretilen ve nitrejenik nöronların çok yoğun olduğu nörojenik niştir. DG spasyal bilginin kazanılması sırasında etkin görev alır desen ayırımı yaptıktan sonra kodlanmak üzere CA3'e gönderir. Dolayısıyla DG'nin bu görevi eNOS-BDNF bağlantılı olarak uyarana bağlı şekilde asimetri gösterir. Bulgularımız, spasyal hafıza oluşumunda hipokampus işlevini araştıran çalışmalara asimetri bağlamında özgün katkı sağlayacaktır.

Bu çalışma açıkça göstermiştir ki hipokampus tek ve homojen bir yapı olarak ele alınmamalıdır. Sol ve sağ hipokampusun anatomik ve işlevsel farklılıkları olabileceği gibi hipokampal alt alanlar da ayrı ayrı ele alınmalıdır. Çalışmamızda BDNF'yi hipokampusun alt bölgelerinde bakmamış olmamız eksiklikler ancak indirekt olarak hipokampusta saptadığımız BDNF'nin daha çok DG kaynaklı olabileceğini

söyleyebiliriz. Her iki deney grubunda BDNF ve eNOS ekspresyonunun asimetrisinin paralel olması bu düşüncemizi desteklemektedir. Dolayısıyla gelecek çalışmalarda BDNF protein düzeyi de hipokampal alt alanlarda ayrı ayrı değerlendirilebilir. Nitekim hayvanlara müzik dinletilen bir çalışmada DG ve CA3'de BDNF düzeyi değişirken, CA1'de bir değişim gözlenmemiştir [192]. Başka bir çalışmada hipokampal DG'deki BDNF'nin, spasyal hafızada patern ayrımı sürecinde anıların kodlanması sırasında kritik bir rol oynadığı gösterilmiştir [193].

Çalışmamızda ayrıca, daha önce de belirttiğimiz gibi, fosforile CREB düzeyi araştırılmamıştır. Eğer fosforile CREB düzeyi araştırılırsa daha net çıkarımlar yapılabilir. Bunların yanı sıra NeuN immünohistokimyasal boyamalarda yukarıda öne sürdüğümüz nedenlerle yeterli bir görüntü sağlayamadığımızı söyleyebiliriz. Sonraki çalışmalarda olgun ve olgunlaşmamış nöronların görüntülenebilmesi için farklı antikolar ya da farklı yöntemler kullanılabilir. Çalışmamız erkek sıçanlar üzerinde gerçekleştirilmiş olup, özellikle sol-sağ lateralizasyonu bakımından farklılık göstermesi olası olan dişi sıçanlarla da öngörülebilir kronik stres ve zengin çevrenin hipokampal asimetriye etkisi araştırılabilir.

Özetle, sinir bilimin üzerinde en fazla çalışılan beyin bölgesi hipokampustur. Öğrenme ve hafıza için kritik beyin bölgesi olan hipokampus ile ilgili hayvan çalışmalarının çoğunluğunda hemisferik farklılıklar dikkate alınmamaktadır. Oysa son zamanlarda çalışmalar kemirgen hipokampusunun da insan hipokampusuna benzer şekilde yapısal ve fonksiyonel asimetrisini ortaya koymuştur. Ayrıca, nöropsikiyatrik hastalıklarının patogenezinin hipokampal asimetri değişimlerinde sorumlu tutulabilmektedir. Bu nedenle insan ve hayvanlarda hipokampal asimetri çalışmalarının geliştirilmesi, hipokampal fonksiyona sağ ve sol yarının katkısının daha ileri araştırılması kognitif fonksiyonların mekanizmasının daha iyi anlaşılması, kognitif fonksiyonların bozulması ile seyreden nörodejeneratif, nöropsikiyatrik hastalıkların patogenezinin daha iyi anlaşılması, daha doğru cerrahi ve medikal tedavi yaklaşımlarını sağlayacaktır. Çalışmamızda adolesan erkek sıçanlara iki ayrı grupta hipokampal fonksiyonlara olumlu etkisi olduğu bilinen kronik zengin çevre ve daha çok olumsuz sonuçları olduğu bilinen ancak süresi ve tipine bağlı olarak olumlu olabileceği de rapor edilmiş olan öngörülebilir kronik immobilizasyon stresi uyguladık. Sol ve sağ hipokampus işlevlerinin asimmetrik olabileceğini gösteren ve hipokampal alt alanların farklı rollere sahip olduğu bilgisini destekleyen çalışmamızın bulguları ilk ve özgündür.

Adolesan dönemde öngörülebilir kronik stres ve kronik zengin çevre uygulamasının spasyal hafıza için kritik ve olası sinyal molekülleri açısından hipokampal asimetriye etkisini gösteren ilk çalışma olması nedeniyle özgündür. Çalışmamızda hem öngörülebilir kronik stresin hem de zengin çevre uygulamasının spasyal hafızayı iyileştirmesine paralel olarak her iki grupta hipokampusta BDNF artışının farklı asimetri göstermesi, MDA için sağ hipokampusta artış olması, hipokampus DG, CA3 ve CA1 alt bölgelerinde nNOS ve eNOS ekspresyonunun her bölge için farklı asimetri göstermiş olması bize; 1) uyarının tipine göre hipokampusta BDNF ekspresyonundaki artışın farklı asimetri gösterdiğini 2) nNOS ve eNOS'un hipokampal alt bölgelerde farklı asimetri ile spasyal hafıza oluşumuna katkı sağladığını 3) ilginç olarak deney gruplarımızda spasyal hafızada iyileşmeye paralel olarak lipid peroksidasyon ürünü olan MDA'nın sağ hipokampusta artarak spasyal hafıza oluşumu için fizyolojik sinyal molekülü olarak görev yapabileceğini, dolayısıyla lipid peroksidasyon ürünlerinin düşük konsantrasyonlarda artışının LTP oluşumuna olası katkı sağlayan ürünlerden biri olduğunu düşündürdü. MDA'nın sağ hipokampusta artmış olması lipid peroksidasyon ürünlerinin özellikle sağ hipokampus fonksiyonuna katkı sağlayarak hipokampal asimetride rol oynayabileceğini düşündürdü. Bu özgün bulgularımız hipokampal fonksiyonların nörobiyolojik mekanizmasını asimetrik bağlamda araştırarak çalışmalar için yeni bakış açısı ve yeni hipotezlerin ortaya atılmasını sağlayacaktır.

ETİK KURUL KARARI



T.C.
BEZMÎÂLEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
KARAR METNİ

SAYI: 2017/230

24.10.2017

KONU: Sn. Prof. Dr. Gülay ÜZÜM

Sayın, Prof. Dr. Gülay ÜZÜM

“Sıçanlarda adolesan dönemde kronik stres ve zengin çevre uygulanmasının hipokampal asimetri üzerine etkisi” başlıklı projenize ait dilekçeniz 24.10.2017 tarihinde yapılan Yerel Etik Kurul toplantısında değerlendirilmiş ve gerekçeniz göz önünde bulundurularak proje başlığınızın “Sıçanlarda Adolesan Dönemde Öngörülebilir Kronik Stres Ve Zengin Çevre Uygulanmasının Spasyal Hafıza ve Hipokampal Asimetri Üzerine Etkisi” olarak değiştirilmesi talebiniz onanmıştır.

Doç. Dr. Fahri AKBAŞ
Etik Kurul Başkanı

Prof. Dr. Ahmet BELCE
Üye

Prof. Dr. Ertan AYŞAN
Üye

Prof. Dr. İsmail MERAL
Üye

Yrd. Doç. Dr. Fatemeh BAHADORİ
Üye

Yrd. Doç. Dr. Ömer UYSAL
Üye

Vet. Hek. Mert ÇELİKTEN
Üye

Harun SARIKAMIŞ
Üye

Şerife GÖNCÜ
Üye

- Etik kurulumuzdan onam alan her proje için, çalışma başlamadan üç ay önce çalışılacak hayvan rezervinin uygunluğunu (tür, yaş, cinsiyet) belirlemek amacıyla Deney Hayvanları Laboratuvarına başvurulmalıdır.

KAYNAKLAR

1. Glick SD, Ross DA. Lateralization of function in the rat brain: Basic mechanisms may be operative in humans. *TrendsNeurosci.* 1981; **4**: 196-199.
2. Neveu PJ. Lateralization and stres responses in mice: interindividual differences in the association of brain, neuroendocrine, and immune responses. *BehavGenet.* 1996; **26**(4):373-7.
3. Ranganath C, Johnson MK, D'Esposito M. Prefrontal activity associated with working memory and episodic long-term memory. *Neuropsychologia.* 2003;41(3):378-89.
4. Frings L, Wagner K, Unterrainer J, Spreer J, Halsband U, Schulze-Bonhage A. Gender-related differences in lateralization of hippocampal activation and cognitive strategy. *Neuroreport.* 2006; **17**(4):417-21.
5. Klur S, Muller C, Pereira de Vasconcelos A, Ballard T, Lopez J, Galani R, Certa U, Cassel JC. Hippocampal-dependent spatial memory functions might be lateralized in rats: An approach combining gene expression profiling and reversible inactivation. *Hippocampus.* 2009; **19**(9):800-16.
6. Persson J, Herlitz A, Engman J, Morell A, Sjölie D, Wikström J, Söderlund H. Remembering our origin: gender differences in spatial memory are reflected in gender differences in hippocampal lateralization. *Behav Brain Res.* 2013; **256**:219-28.
7. Shinohara Y, Hosoya A, Hirase H. Experience enhances gamma oscillations and interhemispheric asymmetry in the hippocampus. *NatCommun.* 2013; **4**:1652.
8. Hou G, Yang X, Yuan TF. Hippocampal asymmetry: differences in structures and functions. *NeurochemRes.* 2013; **38**(3):453-60.
9. Lee I, Kesner RP. Differential contributions of dorsal hippocampal subregions to memory acquisition and retrieval in contextual fear-conditioning. *Hippocampus.* 2004; **14**(3):301-10.
10. Tang AC, Zou B, Reeb BC, Connor JA. An epigenetic induction of a right-shift in hippocampal asymmetry: selectivity for short- and long-term potentiation but not post-tetanic potentiation. *Hippocampus.* 2008; **18**(1):5-10.
11. Aimone JB, Deng W, Gage FH. Adult neurogenesis: integrating theories and separating functions. *Trends CognSci.* 2010; **14**(7):325-37.
12. Escalante-Mead PR, Minshew NJ, Sweeney JA. Abnormal brain lateralization in high-functioning autism. *J Autism Dev Disord.* 2003; **33**(5):539-43.
13. Klar AJ. Genetic models for handedness, brain lateralization, schizophrenia, and manic-depression. *SchizophrRes.* 1999; **39**(3):207-18.
14. Rogers LJ, Zucca P, Vallortigara G. Advantages of having a lateralized brain. *ProcBiolSci.* 2004; **271** Suppl 6:S420-2.
15. Kaptan Z, Akgün-Dar K, Kapucu A, Dedeakayoğulları H, Batu Ş, Üzümlü G. Long term consequences on spatial learning-memory of low-calorie diet during adolescence in female rats; hippocampal and prefrontal cortex BDNF level, expression of NeuN and cell proliferation in dentate gyrus. *Brain Res.* 2015; **1618**:194-204.
16. Chen Y, Mao Y, Zhou D, Hu X, Wang J, Ma Y. Environmental enrichment and chronic restraint stress in ICR mice: effects on prepulse inhibition of startle and Y-maze spatial recognition memory. *Behav Brain Res.* 2010; **212**(1):49-55.
17. Ueyama T, Kawai Y, Nemoto K, Sekimoto M, Toné S, Senba E. Immobilization stress reduced the expression of neurotrophins and their receptors in the rat brain. *Neurosci Res.* 1997; **28**(2):103-10.
18. Schaaf MJ, De Kloet ER, Vreugdenhil E. Corticosterone effects on BDNF expression in the hippocampus. Implications for memory formation. *Stress.* 2000; **3**(3):201-8.
19. Parihar VK, Hattiangady B, Kuruba R, Shuai B, Shetty AK. Predictable chronic mild stress improves mood, hippocampal neurogenesis and memory. *Mol Psychiatry.* 2011; **16**(2):171-83.
20. Loi M, Mossink JC, Meerhoff GF, Den Blaauwen JL, Lucassen PJ, Joëls M. Effects of early-life stress on cognitive function and hippocampal structure in female rodents. *Neuroscience.* 2017; **342**:101-119.
21. Liu P, Smith PF, Appleton I, Darlington CL, Bilkey DK. Regional variations and age-related changes in nitric oxide synthase and arginase in the sub-regions of the hippocampus. *Neuroscience.* 2003; **119**(3):679-87.
22. Banoujaafar H, Monnier A, Pernet N, Quirié A, Garnier P, Prigent-Tessier A, Marie C. Brain BDNF levels are dependent on cerebrovascular endothelium-derived nitric oxide. *Eur J Neurosci.* 2016 ;**44**(5):2226-35.

23. Thompson RF. The neurobiology of learning and memory. *Science*. 1986; **233**(4767):941-7.
24. Ziyilan YZ, Öğrenme ve Bellek, İçinde Yiğit R, editör, *Kontrol Sistemleri, Sindirim ve Boşaltım Fizyolojisi*. Nobel Tıp Kitabevleri, 2001: 293-298.
25. Kandel ER. The molecular biology of memory: cAMP, PKA, CRE, CREB-1, CREB-2, and CPEB. *Mol Brain*. 2012; **5**:14.
26. Kolb B, Whishaw IQ. *Introduction to Brain and Behavior 2nd ed*. US: Worth Publishers; 2005.
27. Hall, JE. *Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology*. 12th ed. Philadelphia: Elseiver; 2011.
28. Fu ZX, Tan X, Fang H, Lau PM, Wang X, Cheng H, Bi GQ. Dendritic mitoflash as a putative signal for stabilizing long-term synaptic plasticity. *Nat Commun*. 2017;**8**(1):31.
29. Vorhees CV, Williams MT. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nat Protoc*. 2006;**1**(2):848-58.
30. Diana RA, Yonelinas AP, Ranganath C. Imaging recollection and familiarity in the medial temporal lobe: a three-component model. *Trends Cogn Sci*. 2007; **11**(9):379-86
31. Kessels RP, Postma A, Wijnalda EM, de Haan EH. Frontal-lobe involvement in spatial memory: evidence from PET, fMRI, and lesion studies. *Neuropsychol Rev*. 2000; **10**(2):101-13.
32. İzci Y, Erbaş YC. Hipokampus: Yapısı ve Fonksiyonları. *Türk Nöroşir Derg* 2015, **25**(3):287-295.
33. Kaptan Z, Üzüm G. The Role of Adult Hippocampal Neurogenesis in Learning and Memory Function. *Turk J Neurol*. 2016; **22**(4):149-155
34. Liu PZ, Nusslock R. Exercise-Mediated Neurogenesis in the Hippocampus via BDNF. *Frontiers in Neuroscience*. 2018;**12**:52.
35. Cunha C, Brambilla R, Thomas KL. A simple role for BDNF in learning and memory? *Front Mol Neurosci*. 2010;**3**:1.
36. Gulyaeva NV. Interplay between Brain BDNF and Glutamatergic Systems: A Brief State of the Evidence and Association with the Pathogenesis of Depression. *Biochemistry (Mosc)*. 2017;**82**(3):301-307.
37. Mattson MP. Glutamate and neurotrophic factors in neuronal plasticity and disease. *Ann N Y Acad Sci*. 2008;**1144**:97-112.
38. Ninan I, Bath KG, Dagar K, Perez-Castro R, Plummer MR, Lee FS, Chao MV. The BDNF Val66Met polymorphism impairs NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in the hippocampus. *J Neurosci*. 2010;**30**(26):8866-70.
39. Jourdi H, Iwakura Y, Narisawa-Saito M, Ibaraki K, Xiong H, Watanabe M, Hayashi Y, Takei N, Nawa H. Brain-derived neurotrophic factor signal enhances and maintains the expression of AMPA receptor-associated PDZ proteins in developing cortical neurons. *Dev Biol*. 2003;**263**(2):216-30.
40. Mizuno M, Yamada K, He J, Nakajima A, Nabeshima T. Involvement of BDNF receptor TrkB in spatial memory formation. *Learn Mem*. 2003;**10**(2):108-15.
41. Mizuno M, Yamada K, Olariu A, Nawa H, Nabeshima T. Involvement of brain-derived neurotrophic factor in spatial memory formation and maintenance in a radial arm maze test in rats. *J Neurosci*. 2000;**20**(18):7116-21.
42. Tao X, Finkbeiner S, Arnold DB, Shaywitz AJ, Greenberg ME. Ca²⁺ influx regulates BDNF transcription by a CREB family transcription factor-dependent mechanism. *Neuron*. 1998;**20**(4):709-26.
43. Hawkins RD, Son H, Arancio O. Nitric oxide as a retrograde messenger during long-term potentiation in hippocampus. *Prog Brain Res*. 1998;**118**:155-72.
44. Hopper RA, Garthwaite J. Tonic and phasic nitric oxide signals in hippocampal long-term potentiation. *J Neurosci*. 2006;**26**(45):11513-21.
45. Lessmann V, Stroh-Kaffei S, Steinbrecher V, Edelmann E, Brigadski T, Kilb W, Luhmann HJ. The expression mechanism of the residual LTP in the CA1 region of BDNF k.o. mice is insensitive to NO synthase inhibition. *Brain Res*. 2011;**1391**:14-23.
46. Kolarow R, Kuhlmann CR, Munsch T, Zehendner C, Brigadski T, Luhmann HJ, Lessmann V. BDNF-induced nitric oxide signals in cultured rat hippocampal neurons: time course, mechanism of generation, and effect on neurotrophin secretion. *Front Cell Neurosci*. 2014;**8**:323.
47. Canossa M, Giordano E, Cappello S, Guarnieri C, Ferri S. Nitric oxide down-regulates brain-derived neurotrophic factor secretion in cultured hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;**99**(5):3282-7.
48. Förstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J*. 2012;**33**(7):829-37.

49. Cheng A, Wang S, Cai J, Rao MS, Mattson MP. Nitric oxide acts in a positive feedback loop with BDNF to regulate neural progenitor cell proliferation and differentiation in the mammalian brain. *Dev Biol.* 2003;**258**(2):319-33.
50. Schuman EM, Madison DV. A requirement for the intercellular messenger nitric oxide in long-term potentiation. *Science.* 1991;**254**(5037):1503-6.
51. Wilson RI, Yanovsky J, Gödecke A, Stevens DR, Schrader J, Haas HL. Endothelial nitric oxide synthase and LTP. *Nature.* 1997;**386**(6623):338.
52. Son H, Hawkins RD, Martin K, Kiebler M, Huang PL, Fishman MC, Kandel ER. Long-term potentiation is reduced in mice that are doubly mutant in endothelial and neuronal nitric oxide synthase. *Cell.* 1996;**87**(6):1015-23.
53. O'Dell TJ, Huang PL, Dawson TM, Dinerman JL, Snyder SH, Kandel ER, Fishman MC. Endothelial NOS and the blockade of LTP by NOS inhibitors in mice lacking neuronal NOS. *Science.* 1994;**265**(5171):542-6.
54. Maher A, Abdel Rahman MF, Gad MZ. The Role of Nitric Oxide from Neurological Disease to Cancer. *Adv Exp Med Biol.* 2017;**1007**:71-88.
55. Edwards TM, Rickard NS. New perspectives on the mechanisms through which nitric oxide may affect learning and memory processes. *Neurosci Biobehav Rev.* 2007;**31**(3):413-25.
56. Paul V, Ekambaram P. Involvement of nitric oxide in learning & memory processes. *Indian J Med Res.* 2011;**133**:471-8.
57. Garthwaite J, Boulton CL. Nitric oxide signaling in the central nervous system. *Annu Rev Physiol.* 1995;**57**:683-706.
58. Prickaerts J, Steinbusch HW, Smits JF, de Vente J. Possible role of nitric oxide-cyclic GMP pathway in object recognition memory: effects of 7-nitroindazole and zaprinast. *Eur J Pharmacol.* 1997;**337**(2-3):125-36.
59. Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev.* 2014;**2014**:360438.
60. Beckhauser TF, Francis-Oliveira J, De Pasquale R. Reactive Oxygen Species: Physiological and Physiopathological Effects on Synaptic Plasticity. *J Exp Neurosci.* 2016;**10**(Suppl 1):23-48.
61. Halliwell B. Reactive oxygen species and the central nervous system. *J Neurochem.* 1992;**59**(5):1609-23.
62. Wang W, Wang S, Nishanian EV, Del Pilar Cintron A, Wesley RA, Danner RL. Signaling by eNOS through a superoxide-dependent p42/44 mitogen-activated protein kinase pathway. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2001;**281**(2):C544-54.
63. Estrada C, Murillo-Carretero M. Nitric oxide and adult neurogenesis in health and disease. *Neuroscientist.* 2005;**11**(4):294-307.
64. Thakur T, Anand R, Ray A, Gulati K. Differential effects of chronic predictable and unpredictable stress on neurobehavioral and biochemical responses in rats. *Therapeutic Targets for Neurological Diseases.* 2015;**2**.
65. Moreira PS, Almeida PR, Leite-Almeida H, Sousa N, Costa P. Impact of Chronic Stress Protocols in Learning and Memory in Rodents: Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One.* 2016;**11**(9):e0163245.
66. Bhagya VR, Srikumar BN, Veena J, Shankaranarayana Rao BS. Short-term exposure to enriched environment rescues chronic stress-induced impaired hippocampal synaptic plasticity, anxiety, and memory deficits. *J Neurosci Res.* 2017;**95**(8):1602-1610.
67. Meaney MJ, Aitken DH, van Berkel C, Bhatnagar S, Sapolsky RM. Effect of neonatal handling on age-related impairments associated with the hippocampus. *Science.* 1988;**239**(4841 Pt 1):766-8.
68. Wingenfled K, Wolf OT. Stress, memory, and the hippocampus. *Front Neurol Neurosci.* 2014;**34**:109-20.
69. Magariños AM, McEwen BS. Stress-induced atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3 neurons: involvement of glucocorticoid secretion and excitatory amino acid receptors. *Neuroscience.* 1995;**69**:89.
70. Lakshminarasimhan H, Chattarji S. Stress leads to contrasting effects on the levels of brain derived neurotrophic factor in the hippocampus and amygdala. *PLoS One.* 2012;**7**(1):e30481.
71. Bowman RE, Beck KD, Luine VN. Chronic stress effects on memory: sex differences in performance and monoaminergic activity. *Horm Behav.* 2003;**43**(1):48-59.
72. Bowman RE. Stress-induced changes in spatial memory are sexually differentiated and vary across the lifespan. *J Neuroendocrinol.* 2005;**17**(8):526-35.
73. Sánchez MM, Ladd CO, Plotsky PM. Early adverse experience as a developmental risk factor for later psychopathology: evidence from rodent and primate models. *Dev Psychopathol.* 2001;**13**(3):419-49.

74. Suo L, Zhao L, Si J, Liu J, Zhu W, Chai B, Zhang Y, Feng J, Ding Z, Luo Y, Shi H, Shi J, Lu L. Predictable chronic mild stress in adolescence increases resilience in adulthood. *Neuropsychopharmacology*. 2013;**38**(8):1387-400.
75. Das A, Kapoor K, Sayeepriyadarshini AT, Dikshit M, Palit G, Nath C. Immobilization stress-induced changes in brain acetylcholinesterase activity and cognitive function in mice. *Pharmacol Res*. 2000;**42**(3):213-7.
76. Mineur YS, Belzung C, Crusio WE. Effects of unpredictable chronic mild stress on anxiety and depression-like behavior in mice. *Behav Brain Res*. 2006;**175**(1):43-50.
77. Kvetnansky R, Mikulaj L. Adrenal and urinary catecholamines in rats during adaptation to repeated immobilization stress. *Endocrinology*. 1970;**87**(4):738-43.
78. Deng JH, Yan W, Han Y, Chen C, Meng SQ, Sun CY, Xu LZ, Xue YX, Gao XJ, Chen N, Zhang FL, Wang YM, Shi J, Lu L. Predictable Chronic Mild Stress during Adolescence Promotes Fear Memory Extinction in Adulthood. *Sci Rep*. 2017;**7**(1):7857.
79. Iwata E, Kikusui T, Takeuchi Y, Mori Y. Fostering and environmental enrichment ameliorate anxious behavior induced by early weaning in Balb/c mice. *Physiol Behav*. 2007;**91**(2-3):318-24.
80. Li L, Tang BL. Environmental enrichment and neurodegenerative diseases. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;**334**: 293-297.
81. Lichti CF, Fan X, English RD, Zhang Y, Li D, Kong F, Sinha M, Andersen CR, Spratt H, Luxon BA, Green TA. Environmental enrichment alters protein expression as well as the proteomic response to cocaine in rat nucleus accumbens. *Front Behav Neurosci*. 2014;**8**:246.
82. Rampon C, Jiang CH, Dong H, Tang YP, Lockhart DJ, Schultz PG, Tsien JZ, Hu Y. Effects of environmental enrichment on gene expression in the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;**97**(23):12880-4.
83. Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature*. 1997;**386**(6624):493-5.
84. Clemenson GD, Deng W, Gage FH. Environmental enrichment and neurogenesis: from mice to humans. *Current Opinion in Behavioral Sciences*. 2015;**4**:56-62.
85. Escorihuela RM, Fernández-Teruel A, Tobeña A, Vivas NM, Marmol F, Badia A, Dierssen M. Early environmental stimulation produces long-lasting changes on beta-adrenoceptor transduction system. *Neurobiol Learn Mem*. 1995;**64**(1):49-57.
86. Druzian AF, Melo JA, Souza AS. The influence of enriched environment on spatial memory in Swiss mice of different ages. *Arq Neuropsiquiatr*. 2015;**73**(8):692-7.
87. Ickes BR, Pham TM, Sanders LA, Albeck DS, Mohammed AH, Granholm AC. Long-term environmental enrichment leads to regional increases in neurotrophin levels in rat brain. *Exp Neurol*. 2000;**164**(1):45-52.
88. Verstynen T, Tierney R, Urbanski T, Tang A. Neonatal novelty exposure modulates hippocampal volumetric asymmetry in the rat. *Neuroreport*. 2001;**12**(14):3019-22.
89. Rice D, Barone S Jr. Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. *Environ Health Perspect*. 2000;**108** Suppl 3:511-33.
90. Södersten P. Receptive behavior in developing female rats. *Horm Behav*. 1975;**6**(4):307-17.
91. Södersten P, Damassa DA, Smith ER. Sexual behavior in developing male rats. *Horm Behav*. 1977;**8**(3):320-41.
92. Tirelli E, Laviola G, Adriani W. Ontogenesis of behavioral sensitization and conditioned place preference induced by psychostimulants in laboratory rodents. *Neurosci Biobehav Rev*. 2003;**27**(1-2):163-78.
93. Amaral DG, Witter MP. The hippocampal formation: the rat nervous system. *Academic Press, P. G. San Diego* 1995;443-493
94. Leuner B, Waddell J, Gould E, Shors TJ. Temporal discontinuity is neither necessary nor sufficient for learning-induced effects on adult neurogenesis. *J Neurosci*. 2006;**26**(52):13437-42.
95. Sterlemann V, Rammes G, Wolf M, Liebl C, Ganea K, Müller MB, Schmidt MV. Chronic social stress during adolescence induces cognitive impairment in aged mice. *Hippocampus*. 2010;**20**(4):540-9.
96. Romeo RD. The Teenage Brain: The Stress Response and the Adolescent Brain. *Curr Dir Psychol Sci*. 2013;**22**(2):140-145.
97. Romeo RD. Perspectives on stress resilience and adolescent neurobehavioral function. *Neurobiol Stress*. 2014;**1**:128-33.
98. Lee PR, Brady D, Koenig JJ. Corticosterone alters N-methyl-D-aspartate receptor subunit mRNA expression before puberty. *Brain Res Mol Brain Res*. 2003;**115**(1):55-62.

99. Dahl RE. Adolescent brain development: a period of vulnerabilities and opportunities. Keynote address. *Ann N Y Acad Sci.* 2004;**1021**:1-22.
100. Gomez F, Houshyar H, Dallman MF. Marked regulatory shifts in gonadal, adrenal, and metabolic system responses to repeated restraint stress occur within a 3-week period in pubertal male rats. *Endocrinology.* 2002;**143**(8):2852-62.
101. Scherf KS, Sweeney JA, Luna B. Brain basis of developmental change in visuospatial working memory. *J Cogn Neurosci.* 2006;**18**(7):1045-58.
102. Spear LP. The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. *Neurosci Biobehav Rev.* 2000;**24**(4):417-63.
103. Belcheva I, Belcheva S, Petkov VV, Petkov VD. Hippocampal asymmetry in the behavioral responses to the 5-HT_{1A} receptor agonist 8-OH-DPAT. *Brain Res.* 1994;**640**(1-2):223-8.
104. Samara A, Vougas K, Papadopoulou A, Anastasiadou E, Baloyanni N, Paronis E, Chrousos GP, Tsangaris GT. Proteomics reveal rat hippocampal lateral asymmetry. *Hippocampus.* 2011;**21**(1):108-19.
105. Goto K, Kurashima R, Gokan H, Inoue N, Ito I, Watanabe S. Left-right asymmetry defect in the hippocampal circuitry impairs spatial learning and working memory in iv mice. *PLoS One.* 2010;**5**(11):e15468.
106. Barnes J, Scahill RI, Schott JM, Frost C, Rossor MN, Fox NC. Does Alzheimer's disease affect hippocampal asymmetry? Evidence from a cross-sectional and longitudinal volumetric MRI study. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 2005;**19**(5-6):338-44.
107. Diamond MC, Murphy GM Jr, Akiyama K, Johnson RE. Morphologic hippocampal asymmetry in male and female rats. *Exp Neurol.* 1982;**76**(3):553-65.
108. Geroldi C, Laakso MP, DeCarli C, Beltramello A, Bianchetti A, Soininen H, Trabucchi M, Frisoni GB. Apolipoprotein E genotype and hippocampal asymmetry in Alzheimer's disease: a volumetric MRI study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2000;**68**(1):93-6.
109. El-Gaby M, Shipton OA, Paulsen O. Synaptic Plasticity and Memory: New Insights from Hippocampal Left-Right Asymmetries. *Neuroscientist.* 2015;**21**(5):490-502.
110. Hopf L, Quraan MA, Cheung MJ, Taylor MJ, Ryan JD, Moses SN. Hippocampal lateralization and memory in children and adults. *J Int Neuropsychol Soc.* 2013;**19**(10):1042-52.
111. Ladd CO, Huot RL, Thiruvikraman KV, Nemeroff CB, Plotsky PM. Long-term adaptations in glucocorticoid receptor and mineralocorticoid receptor mRNA and negative feedback on the hypothalamo-pituitary-adrenal axis following neonatal maternal separation. *Biol Psychiatry.* 2004;**55**(4):367-75.
112. Loi M, Mossink JC, Meerhoff GF, Den Blaauwen JL, Lucassen PJ, Joëls M. Effects of early-life stress on cognitive function and hippocampal structure in female rodents. *Neuroscience.* 2017;**342**:101-119.
113. Olson AK, Eadie BD, Ernst C, Christie BR. Environmental enrichment and voluntary exercise massively increase neurogenesis in the adult hippocampus via dissociable pathways. *Hippocampus.* 2006;**16**(3):250-60.
114. Speisman RB, Kumar A, Rani A, Pastoriza JM, Severance JE, Foster TC, Ormerod BK. Environmental enrichment restores neurogenesis and rapid acquisition in aged rats. *Neurobiol Aging.* 2013;**34**(1):263-74.
115. Varty GB, Paulus MP, Braff DL, Geyer MA. Environmental enrichment and isolation rearing in the rat: effects on locomotor behavior and startle response plasticity. *Biol Psychiatry.* 2000;**47**(10):864-73.
116. Inostroza M, Cid E, Brotons-Mas J, Gal B, Aivar P, Uzcategui YG, Sandi C, Menendez de la Prida L. Hippocampal-dependent spatial memory in the water maze is preserved in an experimental model of temporal lobe epilepsy in rats. *PLoS One.* 2011;**6**(7):e22372.
117. Mendez IA, Montgomery KS, LaSarge CL, Simon NW, Bizon JL, Setlow B. Long-term effects of prior cocaine exposure on Morris water maze performance. *Neurobiol Learn Mem.* 2008;**89**(2):185-91.
118. Ocklenburg S, Korte SM, Peterburs J, Wolf OT, Güntürkün O. Stress and laterality - The comparative perspective. *Physiol Behav.* 2016;**164**(Pt A):321-9.
119. Dar KA, Kapucu A, Acar S, Üzümlü G. Evaluation of Antiepileptogenic Effect of Atorvastatin on Development of Pentylentetrazole Induced Kindling in Rats: The Responsibility of Inducible Nitric Oxide Synthase and Metalloproteinase 2. *Turkiye Klinikleri J Med Sci.* 2013;**33**:995-1006.
120. Isaacson RL. Unsolved mysteries: the hippocampus. *Behav Cogn Neurosci Rev.* 2002;**1**(2):87-107.
121. Han WY, Du P, Fu SY, Wang F, Song M, Wu CF, Yang JY. Oxytocin via its receptor affects restraint stress-induced methamphetamine CPP reinstatement in mice: Involvement of the medial prefrontal cortex and dorsal hippocampus glutamatergic system. *Pharmacol Biochem Behav.* 2014;**119**:80-7.

122. Huang CC, Yang CH, Hsu KS. Do stress and long-term potentiation share the same molecular mechanisms? *Mol Neurobiol.* 2005;**32**(3):223-35.
123. Anisman H, Matheson K. Stress, depression, and anhedonia: caveats concerning animal models. *Neurosci Biobehav Rev.* 2005;**29**(4-5):525-46.
124. Zhu WL, Shi HS, Wang SJ, Wu P, Ding ZB, Lu L. Hippocampal CA3 calcineurin activity participates in depressive-like behavior in rats. *J Neurochem.* 2011;**117**(6):1075-86.
125. Heim C, Nemeroff CB. The role of childhood trauma in the neurobiology of mood and anxiety disorders: preclinical and clinical studies. *Biol Psychiatry.* 2001;**49**(12):1023-39.
126. Pohl J, Olmstead MC, Wynne-Edwards KE, Harkness K, Menard JL. Repeated exposure to stress across the childhood-adolescent period alters rats' anxiety-and depression-like behaviors in adulthood: The importance of stressor type and gender. *Behav Neurosci.* 2007;**121**(3):462-74.
127. Duffy SN, Craddock KJ, Abel T, Nguyen PV. Environmental enrichment modifies the PKA-dependence of hippocampal LTP and improves hippocampus-dependent memory. *Learn Mem.* 2001;**8**(1):26-34.
128. Nilsson M, Perfilieva E, Johansson U, Orwar O, Eriksson PS. Enriched environment increases neurogenesis in the adult rat dentate gyrus and improves spatial memory. *J Neurobiol.* 1999;**15**;39(4):569-78.
129. Rampon C, Tang YP, Goodhouse J, Shimizu E, Kyn M, Tsien JZ. Enrichment induces structural changes and recovery from nonspatial memory deficits in CA1 NMDAR1-knockout mice. *Nat Neurosci.* 2000;**3**(3):238-44.
130. Tang YP, Wang H, Feng R, Kyn M, Tsien JZ. Differential effects of enrichment on learning and memory function in NR2B transgenic mice. *Neuropharmacology.* 2001;**41**(6):779-90.
131. Williams BM, Luo Y, Ward C, Redd K, Gibson R, Kuczaj SA, McCoy JG. Environmental enrichment: effects on spatial memory and hippocampal CREB immunoreactivity. *Physiol Behav.* 2001;**73**(4):649-58.
132. Ennaceur A, Michalikova S, van Rensburg R, Chazot PL. Models of anxiety: responses of mice to novelty and open spaces in a 3D maze. *Behav Brain Res.* 2006;**174**(1):9-38.
133. Hutchinson E, Avery A, Vandewoude S. Environmental enrichment for laboratory rodents. *ILAR J.* 2005;**46**(2):148-61.
134. Diniz DG, Foro CA, Rego CM, Gloria DA, de Oliveira FR, Paes JM, de Sousa AA, Tokuhashi TP, Trindade LS, Turiel MC, Vasconcelos EG, Torres JB, Cunningham C, Perry VH, Vasconcelos PF, Diniz CW. Environmental impoverishment and aging alter object recognition, spatial learning, and dentate gyrus astrocytes. *Eur J Neurosci.* 2010;**32**(3):509-19.
135. Gresack JE, Kerr KM, Frick KM. Life-long environmental enrichment differentially affects the mnemonic response to estrogen in young, middle-aged, and aged female mice. *Neurobiol Learn Mem.* 2007;**88**(4):393-408.
136. Harburger LL, Nzerem CK, Frick KM. Single enrichment variables differentially reduce age-related memory decline in female mice. *Behav Neurosci.* 2007;**121**(4):679-88.
137. Chiba S, Numakawa T, Ninomiya M, Richards MC, Wakabayashi C, Kunugi H. Chronic restraint stress causes anxiety- and depression-like behaviors, downregulates glucocorticoid receptor expression, and attenuates glutamate release induced by brain-derived neurotrophic factor in the prefrontal cortex. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2012;**39**(1):112-9.
138. Guzowski JF, Knierim JJ, Moser EI. Ensemble dynamics of hippocampal regions CA3 and CA1. *Neuron.* 2004;**44**(4):581-4.
139. Nakazawa K, McHugh TJ, Wilson MA, Tonegawa S. NMDA receptors, place cells and hippocampal spatial memory. *Nat Rev Neurosci.* 2004;**5**(5):361-72.
140. Nakazawa K, Quirk MC, Chitwood RA, Watanabe M, Yeckel MF, Sun LD, Kato A, Carr CA, Johnston D, Wilson MA, Tonegawa S. Requirement for hippocampal CA3 NMDA receptors in associative memory recall. *Science.* 2002;**297**(5579):211-8.
141. Recce M, Harris KD. Memory for places: a navigational model in support of Marr's theory of hippocampal function. *Hippocampus.* 1996;**6**(6):735-48.
142. Diana RA, Yonelinas AP, Ranganath C. Medial temporal lobe activity during source retrieval reflects information type, not memory strength. *J Cogn Neurosci.* 2010;**22**(8):1808-18.
143. Kennedy PJ, Shapiro ML. Retrieving memories via internal context requires the hippocampus. *J Neurosci.* 2004;**24**(31):6979-85.
144. Preston AR, Eichenbaum H. Interplay of hippocampus and prefrontal cortex in memory. *Curr Biol.* 2013;**23**(17):R764-73.

145. Leon WC, Bruno MA, Allard S, Nader K, Cuello AC. Engagement of the PFC in consolidation and recall of recent spatial memory. *Learn Mem.* 2010;**17**(6):297-305.
146. Suzuki M, Hagino H, Nohara S, Zhou SY, Kawasaki Y, Takahashi T, Matsui M, Seto H, Ono T, Kurachi M. Male-specific volume expansion of the human hippocampus during adolescence. *Cereb Cortex.* 2005;**15**(2):187-93.
147. Tien RD, Felsberg GJ, Crain B. Normal anatomy of the hippocampus and adjacent temporal lobe: high-resolution fast spin-echo MR images in volunteers correlated with cadaveric histologic sections. *AJR Am J Roentgenol.* 1992;**159**(6):1309-13.
148. Baldi E, Bucherelli C. The inverted "u-shaped" dose-effect relationships in learning and memory: modulation of arousal and consolidation. *Nonlinearity Biol Toxicol Med.* 2005;**3**(1):9-21.
149. Nichols M, Weih F, Schmid W, DeVack C, Kowenz-Leutz E, Luckow B, Boshart M, Schütz G. Phosphorylation of CREB affects its binding to high and low affinity sites: implications for cAMP induced gene transcription. *EMBO J.* 1992;**11**(9):3337-46.
150. Ozawa T, Yamada K, Ishitani Y. Hippocampal BDNF treatment facilitates consolidation of spatial memory in spontaneous place recognition in rats. *Behav Brain Res.* 2014;**263**:210-6.
151. Rossi C, Angelucci A, Costantin L, Braschi C, Mazzantini M, Babbini F, Fabbri ME, Tessarollo L, Maffei L, Berardi N, Caleo M. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is required for the enhancement of hippocampal neurogenesis following environmental enrichment. *Eur J Neurosci.* 2006;**24**(7):1850-6.
152. Massaad CA, Klann E. Reactive oxygen species in the regulation of synaptic plasticity and memory. *Antioxid Redox Signal.* 2011;**14**(10):2013-54.
153. Ozgen N, Guo J, Gertsberg Z, Danilo P Jr, Rosen MR, Steinberg SF. Reactive oxygen species decrease cAMP response element binding protein expression in cardiomyocytes via a protein kinase D1-dependent mechanism that does not require Ser133 phosphorylation. *Mol Pharmacol.* 2009;**76**(4):896-902.
154. Suri D, Veenit V, Sarkar A, Thiagarajan D, Kumar A, Nestler EJ, Galande S, Vaidya VA. Early stress evokes age-dependent biphasic changes in hippocampal neurogenesis, BDNF expression, and cognition. *Biol Psychiatry.* 2013;**73**(7):658-66.
155. Dagnino-Subiabre A, Zepeda-Carreño R, Díaz-Véliz G, Mora S, Aboitiz F. Chronic stress induces upregulation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA and integrin alpha5 expression in the rat pineal gland. *Brain Res.* 2006;**1086**(1):27-34.
156. Silva AJ, Kogan JH, Frankland PW, Kida S. CREB and memory. *Annu Rev Neurosci.* 1998;**21**:127-48.
157. Grønli J, Bramham C, Murison R, Kanhema T, Fiske E, Bjorvatn B, Ursin R, Portas CM. Chronic mild stress inhibits BDNF protein expression and CREB activation in the dentate gyrus but not in the hippocampus proper. *Pharmacol Biochem Behav.* 2006;**85**(4):842-9.
158. Sardari M, Rezayof A, Khodagholi F. Hippocampal signaling pathways are involved in stress-induced impairment of memory formation in rats. *Brain Res.* 2015;**1625**:54-63.
159. Crown ED, Ye Z, Johnson KM, Xu GY, McAdoo DJ, Hulsebosch CE. Increases in the activated forms of ERK 1/2, p38 MAPK, and CREB are correlated with the expression of at-level mechanical allodynia following spinal cord injury. *Exp Neurol.* 2006;**199**(2):397-407.
160. Northcutt RG. Body and Brain. A Trophic Theory of Neural Connections. *Science.* 1989;**244**(4907):993.
161. Ghiani CA, Beltran-Parrazal L, Sforza DM, Malvar JS, Seksenyan A, Cole R, Smith DJ, Charles A, Ferchmin PA, de Vellis J. Genetic program of neuronal differentiation and growth induced by specific activation of NMDA receptors. *Neurochem Res.* 2007;**32**(2):363-76.
162. Ginty DD, Bonni A, Greenberg ME. Nerve growth factor activates a Ras-dependent protein kinase that stimulates c-fos transcription via phosphorylation of CREB. *Cell.* 1994;**77**(5):713-25.
163. Hu Y, Liu MY, Liu P, Dong X, Boran AD. Neuroprotective effects of 3,6'-disinapoyl sucrose through increased BDNF levels and CREB phosphorylation via the CaMKII and ERK1/2 pathway. *J Mol Neurosci.* 2014;**53**(4):600-7.
164. Miyamoto E. Molecular mechanism of neuronal plasticity: induction and maintenance of long-term potentiation in the hippocampus. *J Pharmacol Sci.* 2006;**100**(5):433-42.
165. Viosca J, Malleret G, Bourthouladze R, Benito E, Vronskava S, Kandel ER, Barco A. Chronic enhancement of CREB activity in the hippocampus interferes with the retrieval of spatial information. *Learn Mem.* 2009;**16**(3):198-209.
166. Dinerman JL, Dawson TM, Schell MJ, Snowman A, Snyder SH. Endothelial nitric oxide synthase localized to hippocampal pyramidal cells: implications for synaptic plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;**91**(10):4214-8.

167. Dağdeviren M, Doğan YH, Kamt L. Effects of restraint stress and nitric oxide synthase inhibition on learning and strategy preference in young adult male rats. *Balkan Med J.* 2012;**29**(4):376-80.
168. Caviedes A, Varas-Godoy M, Lafourcade C, Sandoval S, Bravo-Alegria J, Kaehne T, Massmann A, Figueroa JP, Nualart F, Wyneken U. Endothelial Nitric Oxide Synthase Is Present in Dendritic Spines of Neurons in Primary Cultures. *Front Cell Neurosci.* 2017;**11**:180.
169. Benito N, Martín-Vázquez G, Makarova J, Makarov VA, Herreras O. The right hippocampus leads the bilateral integration of gamma-parsed lateralized information. *Elife.* 2016;**5**:pii: e16658.
170. Wang X, Lei XG, Wang J. Malondialdehyde regulates glucose-stimulated insulin secretion in murine islets via TCF7L2-dependent Wnt signaling pathway. *Mol Cell Endocrinol.* 2014;**382**(1):8-16.
171. Austin SA, Santhanam AV, d'Uscio LV, Katusic ZS. Regional Heterogeneity of Cerebral Microvessels and Brain Susceptibility to Oxidative Stress. *PLoS One.* 2015;**10**(12):e0144062.
172. Mullen RJ, Buck CR, Smith AM. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development.* 1992;**116**(1):201-11.
173. Blaya MO, Bramlett HM, Naidoo J, Pieper AA, Dietrich WD. Neuroprotective efficacy of a proneurogenic compound after traumatic brain injury. *J Neurotrauma.* 2014;**31**(5):476-86.
174. Gusel'nikova VV, Korzhevskiy DE. NeuN As a Neuronal Nuclear Antigen and Neuron Differentiation Marker. *Acta Naturae.* 2015;**7**(2):42-7.
175. Unal-Cevik I, Kiliç M, Gürsoy-Ozdemir Y, Gurer G, Dalkara T. Loss of NeuN immunoreactivity after cerebral ischemia does not indicate neuronal cell loss: a cautionary note. *Brain Res.* 2004;**1015**(1-2):169-74.
176. Lester BM, Tronick E, Nestler E, Abel T, Kosofsky B, Kuzawa CW, Marsit CJ, Maze I, Meaney MJ, Monteggia LM, Reul JM, Skuse DH, Sweatt JD, Wood MA. Behavioral epigenetics. *Ann N Y Acad Sci.* 2011;**1226**:14-33.
177. Kim S, Kaang BK. Epigenetic regulation and chromatin remodeling in learning and memory. *Exp Mol Med.* 2017;**49**(1):e281.
178. Zovkic IB, Guzman-Karlsson MC, Sweatt JD. Epigenetic regulation of memory formation and maintenance. *Learn Mem.* 2013;**20**(2):61-74.
179. Hsieh J, Zhao X. Genetics and Epigenetics in Adult Neurogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2016;**8**(6).
180. Roth ED, Roth TL, Money KM, SenGupta S, Eason DE, Sweatt JD. DNA methylation regulates neurophysiological spatial representation in memory formation. *Neuroepigenetics.* 2015;**2**:1-8.
181. Lind D, Franken S, Kappler J, Jankowski J, Schilling K. Characterization of the neuronal marker NeuN as a multiply phosphorylated antigen with discrete subcellular localization. *J Neurosci Res.* 2005;**79**(3):295-302.
182. Spiers HJ, Burgess N, Hartley T, Vargha-Khadem F, O'Keefe J. Bilateral hippocampal pathology impairs topographical and episodic memory but not visual pattern matching. *Hippocampus.* 2001;**11**(6):715-25.
183. Jack CR Jr, Trenerry MR, Cascino GD, Sharbrough FW, So EL, O'Brien PC. Bilaterally symmetric hippocampi and surgical outcome. *Neurology.* 1995;**45**(7):1353-8.
184. Pruessner JC, Li LM, Serles W, Pruessner M, Collins DL, Kabani N, Lupien S, Evans AC. Volumetry of hippocampus and amygdala with high-resolution MRI and three-dimensional analysis software: minimizing the discrepancies between laboratories. *Cereb Cortex.* 2000;**10**(4):433-42.
185. Horváth K, Kövér F, Kovács N, Kállai J, Nagy F. [Volumetric measurements of the hippocampus and amygdala with MRI in healthy adults]. *Orv Hetil.* 2002;**143**(37):2145-51.
186. Pedraza O, Bowers D, Gilmore R. Asymmetry of the hippocampus and amygdala in MRI volumetric measurements of normal adults. *J Int Neuropsychol Soc.* 2004;**10**(5):664-78.
187. Thompson DK, Wood SJ, Doyle LW, Warfield SK, Egan GF, Inder TE. MR-determined hippocampal asymmetry in full-term and preterm neonates. *Hippocampus.* 2009;**19**(2):118-23.
188. Mitchell RL, Crow TJ. Right hemisphere language functions and schizophrenia: the forgotten hemisphere? *Brain.* 2005;**128**(Pt 5):963-78.
189. Novelty RA, Augustine EA, Mattson RH, Glaser GH, Williamson PD, Spencer DD, Spencer SS. Selective memory improvement and impairment in temporal lobectomy for epilepsy. *Ann Neurol.* 1984;**15**(1):64-7.
190. Ogawa H, Hiroshima S, Kamada K. Left hippocampectomy in an epilepsy patient with right hemisphere language dominance. *Cogent Medicine.* 2017;**4**(1):1364029.

191. Kohl MM, Shipton OA, Deacon RM, Rawlins JN, Deisseroth K, Paulsen O. Hemisphere-specific optogenetic stimulation reveals left-right asymmetry of hippocampal plasticity. *Nat Neurosci.* 2011;14(11):1413-5.
192. Xing Y, Chen W, Wang Y, Jing W, Gao S, Guo D, Xia Y, Yao D. Music exposure improves spatial cognition by enhancing the BDNF level of dorsal hippocampal subregions in the developing rats. *Brain Res Bull.* 2016;121:131-7.
193. Yau SY, Li A, So KF. Involvement of Adult Hippocampal Neurogenesis in Learning and Forgetting. *Neural Plast.* 2015;2015:717958.



İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

SIÇANLARDA ADOLESAN DÖNEMDE ÖNGÖRÜLEBİLİR KRONİK STRES VE ZENGİN ÇEVRE UYGULANMASININ SPASYAL HAFIZA VE HIPOKAMPAL ASİMETRİ ÜZERİNE ETKİSİ

ORJİNALLİK RAPORU

% 6	% 4	% 2	% 1
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	KAPTAN, Zülal and ÜZÜM, Gülay. "Erişkin Hipokampal Nörogenezin Öğrenme ve Hafıza Fonksiyonlarındaki Rolü", Türk Nöroloji Derneği, 2016. Yayın	% 1
2	norosirurji.dergisi.org İnternet Kaynağı	% 1
3	tr.wikipedia.org İnternet Kaynağı	% 1
4	Submitted to Trakya University Öğrenci Ödevi	<% 1
5	library.cu.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
6	www.jns.dergisi.org İnternet Kaynağı	<% 1

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Zülal	Soyadı	Kaptan
Doğ.Yeri	Beyoğlu	Doğ.Tar.	06/08/1989
Uyruğu	TC	TC Kim No	11975923300
Email	zulalkaptan@gmail.com	Tel	05302846511

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora	İstanbul Üniversitesi Fizyoloji Doktora Programı	2018
Yük.Lis.	İstanbul Üniversitesi Fizyoloji Yüksek Lisans Programı	2014
Lisans	İstanbul Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik	2011
Lise	Özel Cent Lisesi	2007

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Öğretim Görevlisi	Biruni Üniversitesi	2016-
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	Çok iyi	İyi	Çok iyi	78	

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı	78		
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office (Word, Excel, Powerpoint)	Çok iyi
Adobe Photoshop	Çok iyi
GraphPad Prism	Çok iyi
Foxit PDF Editor	Çok iyi
Inkscape	Çok iyi
SPSS	İyi
Visual Studio	Orta
MATLAB	Orta

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

1. Kaptan Z, Akgün-Dar K, Kapucu A, Dedeakayoğulları H, Batu Ş, Üzüm G. Long term consequences on spatial learning-memory of low-calorie diet during adolescence in female rats; hippocampal and prefrontal cortex BDNF level, expression of NeuN and cell proliferation in dentate gyrus. Brain Res. 2015 Aug 27;1618:194-204. doi: 10.1016/j.brainres.2015.05.041. Epub 2015 Jun 10.
2. Kuruca SE, Karadenizli S, Akgun-Dar K, Kapucu A, Kaptan Z, Uzum G. The effects of 17 β -estradiol on blood brain barrier integrity in the absence of the estrogen receptor alpha; an in-vitro model. Acta Histochem. 2017 Jul;119(6):638-647. doi: 10.1016/j.acthis.2017.07.005.

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında (Proceedings) basılan bildiriler

1. 19th Asia Pacific Conference on Critical Care Medicine, 2016, Bangkok, Thailand. Effects of low calorie diet started from adolescence on learning and memory; evaluation in terms of inflammatory and oxidative markers. Zülal Kaptan, Huri Dedeakayoğulları, Ahmet Can Hiçyılmaz, Gülay Üzüm
2. Joint meeting of the Federation of European Physiological Societies (FEPS) the Baltic Physiological Societies, 2015, Kaunas, Lithuania. Effects of calorie restriction in adolescence on brain and serum BDNF levels and serum cholesterol levels in adulthood. Zülal Kaptan, Gülay Üzüm. DOI: 10.1111/apha.12626
3. Joint meeting of the Federation of European Physiological Societies (FEPS) the Baltic Physiological Societies, 2015, Kaunas, Lithuania. The proportion of neuron specific neuronal protein (NeuN) positive neurons in hippocampal CA regions of adult female rats fed with low-calorie diet during adolescence; levels of NOS isoforms in hippocampus. Zülal Kaptan, Kadriye Akgün-Dar, Ayşegül Kapucu, Gülay Üzüm. DOI: 10.1111/apha.12626
4. Joint meeting of the Federation of European Physiological Societies (FEPS) and the Hungarian Physiological Society, 2014, Budapest, Hungary. Evaluation of spatial learning and memory, level of serum cholesterol and tryglyceride in caloric restriction applied adolescent female rats. Gülay Üzüm, Zülal Kaptan. DOI: 10.1111/apha.12362

Ulusal hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

1. Kaptan Z, Üzüm G. Erişkin Hipokampal Nörogenezin Öğrenme-Hafıza Fonksiyonundaki Rolü. Turk JNeurol. 2016; 22(4): 149-155. DOI: 10.4274/tnd.68889

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler

1. 16. Ulusal Sinirbilim Kongresi/ 2018/ İstanbul Teknik Üniversitesi, İstanbul. Adolesan dönemde uygulanan düşük kalorili diyetin sağ ve sol hipokampusta nörogeneze etkisi. Zülal Kaptan, Kadriye Akgün-Dar, Ayşegül Kapucu, Gülay Üzüm
2. 16. Ulusal Sinirbilim Kongresi/ 2018/ İstanbul Teknik Üniversitesi, İstanbul. Sıçanlarda hipokampal asimetrinin fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopi ile değerlendirilmesi - Evaluation of hippocampal asymmetry in rats by fourier transform infrared spectroscopy. Gülay Üzüm, Kadriye Akgün Dar, Ayberk Yılmaz, Olcay Bölükbaşı Yalçinkaya, Zülal Kaptan
3. 15. Ulusal Sinirbilim Kongresi / 2017 / Sakarya Üniversitesi, Sakarya. Adolesan Dönemde Uygulanan Düşük Kalorili Diyetin Spasyal Öğrenme/Hafıza ve Hipokampal Asimetri Üzerine Etkisi; Nörogenez Açısından Değerlendirme. Zülal Kaptan, Kadriye Akgün-Dar, Ayşegül Kapucu, Gülay Üzüm
4. 41. Ulusal Fizyoloji Kongresi / 2015 / Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Çanakkale. Adolesan Dönemde Başlayan ve Erişkin Dönemde de Devam Eden Düşük Kalorili Diyetin Öğrenme Hafıza Üzerine Etkileri; Serumda Oksidan ve Antioksidan Markırların Seviyeleri. Zülal Kaptan, Şule Batu, Gülay Üzüm. DOI: 10.1111/apha.12591
5. 40. Ulusal Fizyoloji Kongresi / 2014 / Kayseri Erciyes Üniversitesi, Kayseri. Adolesan Dönemde Başlayan Uzun Süreli Kalori Kısıtlaması Uygulamasının Spasyal, Nonspasyal Öğrenme ve Hafıza Performansları Üzerine Etkisi. Zülal Kaptan, Gülay Üzüm.
6. 40. Ulusal Fizyoloji Kongresi / 2014 / Kayseri Erciyes Üniversitesi, Kayseri. Adolesan Dönemde Düşük Kalori Diyet Uygulamasının Serum Lipid Profili ve Hipokampusta Oksidatif Stres Üzerine Etkisi. Zülal Kaptan, Kadriye Akgün-Dar, Şule Batu, Gülay Üzüm.

7. 39. Ulusal Fizyoloji Kongresi / 2013 / Hacettepe Üniversitesi, Ankara. Streptozotocin ile İndüklenen Diyabetik Sıçanlarda Beyin Hasarının Biomarkırları Üzerine Atorvastatinin Etkisi. Neslihan Ferak, Kadriye Akgündar, Ayşegül Kapucu, Işıl Albeniz, Zülal Kaptan, Gülay Üzüm.

Diğer Yayınlar

1. Yüksek Lisans Tezi: Sıçanlarda Adolesan Dönemde Kalori Kısıtlamasının Hipokampusta Nöroenez, Öğrenme ve Hafıza Üzerine Etkisinin Araştırılması
Danışman: Prof. Dr. Gülay Üzüm

Bilimsel Kuruluşlara Üyelikler

1. TFBD (Türk Fizyolojik Bilimler Derneği)
2. IUPS (International Union of Physiological Sciences)

Ödüller

1. Türk Fizyolojik Bilimler Derneği Genç Araştırmacı Ödülü - 2015

Sertifikalar

1. Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası, 19-30 Aralık 2016, İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar DETAE, İstanbul.