

**BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI
FARMAKOLOJİ DOKTORA PROGRAMI**

**SIÇANLARDA ANOSMİ İLE BİLİŞSEL İŞLEV BOZULMASI
ARASINDAKİ İLİŞKİNİN VE MEKANİZMALARININ
ARAŞTIRILMASI**

HAZIRLAYAN

KARL MICHAEL LUX

DOKTORA TEZİ

ANKARA - 2023

**BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI
FARMAKOLOJİ DOKTORA PROGRAMI**

**SIÇANLARDA ANOSMİ İLE BİLİŞSEL İŞLEV BOZULMASI
ARASINDAKİ İLİŞKİNİN VE MEKANİZMALARININ
ARAŞTIRILMASI**

HAZIRLAYAN

KARL MICHAEL LUX

DOKTORA TEZİ

TEZ DANIŞMANI

PROF. DR. Ş. REMZİ ERDEM

ANKARA - 2023

BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Farmakoloji Anabilim Dalı Farmakoloji Doktora Programı çerçevesinde Karl Michael Lux. tarafından hazırlanan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 7/09/2023

BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS / DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

Tarih: 09 / 10 / 2023

Öğrencinin Adı, Soyadı: KARL MİCHAEL LUX

Öğrencinin Numarası:

Anabilim Dalı: Tıbbi Farmakoloji

Programı: Doktora

Danışmanın Unvanı/Adı, Soyadı

Tez Başlığı: Sıçanlarda Anosmi İle Bilişsel İşlev Bozulması Arasındaki İlişkinin Ve Mekanizmalarının Araştırılması

Yukarıda başlığı belirtilen Yüksek Lisans/Doktora tez çalışmamın; Giriş, Ana Bölümler ve Sonuç Bölümünden oluşan, toplam 77 sayfalık kısmına ilişkin, 09 / 10 / 2023 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 9'dır.

Uygulanan filtrelemeler:

1. Kaynakça hariç

2. Alıntılar hariç

3. Beş (5) kelimeden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

“Başkent Üniversitesi Enstitüleri Tez Çalışması Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Usul ve Esaslarını” inceledim ve bu uygulama esaslarında belirtilen azami benzerlik oranlarına tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Öğrenci İmzası:

ONAY

Tarih:

Öğrenci Danışmanı Unvan, Ad, Soyad, İmza:

.....

İTHAF

Bu tezi her zaman yanımda olup tüm Tıp ve doktora hayatım boyunca bana yeri gelidiğinde abilik yeri geldiğinde hocalık yapan, her zaman destek olan sevgili hocam Remzi Erdem'e ithaf ediyorum.



TEŞEKKÜR

Çalışmamın planlanma, yürütülme ve tamamlanmasına kadar tüm aşamalarında bilimsel katkılarıyla ve sonsuz anlayışı ve sabrıyla bana destek olan değerli tez danışmanım
'e,

Doktora eğitim hayatım boyunca özveri ve emekleriyle tam donanımlı şekilde mezun olmamızı sağlayan Başkent Üniversitesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalındaki hocalarım

'a

Tez çalışmamda kullandığım elektrofizyolojik yöntemleri önce sabırla öğreten, sonra da laboratuvar olanaklarını kullanmama izin veren Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi hocam Dr. N. 'ya ve bu deneylerde teknik destek ve yardımını esirgemeyen arkadaşım

elektrofizyoloji laboratuvarını kullanmam için bölümlerinde çalışmama izin veren Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Başkanlığına ve öğretim üyelerine,

Doktora eğitimim boyunca bana destek veren, yardım eden ve motive eden yol arkadaşlarım 'na,

,

Çalışmada kullandığım metimazol etkin maddesi desteği için Polifarma İlaç Sanayi'ye
Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

LUX KM. “Sıçanlarda Anosmi ile Bilişsel İşlev Bozulması Arasındaki İlişkinin ve Mekanizmalarının Araştırılması”, Başkent Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakoloji Anabilim Dalı, Doktora Tezi, 2023.

Anosmi ile nörodejeneratif hastalıklar arasındaki ilişkinin mekanizması ve yönü henüz tam olarak bilinmemektedir. Bu tez çalışmasında sıçanlarda iki farmakolojik ajan, $ZnSO_4$ ve metimazol uygulanarak olfaktör epitel hasarı ile nöronal hasar aracılı anosmi/hiposmi modelleri oluşturulmuş ve çeşitli davranış testleri ile değerlendirilen bilişsel süreç ile koku duyusu kaybı arasındaki olası ilişki incelenmiştir. Bu çalışmada 6 haftalık, Wistar albino ırkı erkek sıçan ($n=18$; 217 ± 18 g) üzerinde *in vivo* ve *in vitro* deneyler gerçekleştirilmiştir. İntranazal $ZnSO_4$ uygulaması ile mukozal hasar ve HVCN1 kanal blokajı ile akut anosmi modeli, metimazol ($75-300$ mg/kg, *i.p.*) enjeksiyonu ile de olfaktör nöronların apoptoz ile harabiyeti sağlanarak kronik anosmi modeli oluşturulması hedeflenmiştir. Sıçanlarda oluşturulan deneysel modellerin anosmi gelişmesine neden olup olmadığının validasyonu Yem Bulma Testi (YBT) ile değerlendirilmiştir. Sonrasında olası nörokognitif değişikliklerin değerlendirilmesi için çeşitli davranış testleri ve LTP’de olası değişikliğin değerlendirilmesi için elektrofizyolojik deneyler gerçekleştirilmiştir. Bazal YBT seansında gömülü yemi bulma bakımından gruplar arasında anlamlı bir fark saptanmazken (Kontrol: $7,7\pm1,78$ dk, Metimazol: $9,3\pm1,89$ dk, Çinko sülfat: $6,1\pm1,99$ dk), anosmi modelleri oluşturulduktan 1 ay ve 2 ay sonraki YBT seanslarında anosmi modelinin geçerliliği doğrulandı (1. ay- Kontrol: $8,5\pm2,39$ dk, her iki anosmi grubu 15 ± 0 dk; $p<0,005$ vs Kontrol; 2. ay- Kontrol: $8,0\pm0,92$ dk, Metimazol: 15 ± 0 dk; Çinko sülfat: $14,75\pm0,49$; $p<0,001$ vs Kontrol). Koku duyusunun kaybı vücut ağırlığında kontrol grubuna göre anlamlı azalmaya neden oldu (Kontrol $\%86,2\pm9,4$ (181gr) vs Metimazol $\%70,3\pm5,86$ (146,5 g) ve Çinko Sülfat $\%61,6\pm3,18$ (127,6 g)). Hipokampal öğrenme-bellek performansının değerlendirildiği Morris Su Labirenti (MSL) testinde bütün grupların anlamlı öğrenme performansı gösterdiği ve kaçış platformunu bulma sürelerinin anlamlı şekilde azaldığı gözlemlendi, ancak gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı. Özellikle prefrontal öğrenme-bellek performansının değerlendirildiği Yeni Nesne Tanıma (YNT) testinde ise Kontrol ve Metimazol grupları arasında anlamlı fark saptandı (Kontrol= $\%83,8$; Metimazol= $\%37,8$; $p<0,05$). Limbik sistem ile ilişkili korku-güdümlü öğrenme-bellek performansının değerlendirildiği Pasif sakınma (PS) testi bulguları da anosmik gruplarda öğrenmenin bozulduğunu gösterdi (Kontrol: $50,3\pm97$ sn vs Metimazol: $11,5\pm9,7$ sn , Çinko sülfat: $2,1\pm0,4$ sn ,); $p<0,05$ Metimazol vs Kontrol ve $p<0,01$ Çinko sülfat vs Kontrol). Anksiyetenin değerlendirildiği Yükseltilmiş Artı Labirent (YAL) ve Açık Alan testleri ile dışkılama sayıları değerlendirildiğinde gruplar arasında anlamlı bir fark saptanmadı. Depresyon-benzeri davranışın değerlendirildiği Zorlu Yüzdürme Testi (ZYT) bulguları da gruplar arasında anlamlı bir fark olmadığını gösterdi. Dentat gyrus üzerinde gerçekleştirilen elektrofizyolojik deneylerde değerlendirilen LTP kayıtlarında bütün hayvanlarda öğrenme/potentiasyon olduğu ve anosminin dentat gyrus ile ilişkili öğrenme fonksiyonlarını bozmadığı görüldü. Bulgularımız ışığında anosminin hipokampal öğrenme ve bellek üzerinde olumsuz bir etkisinin olmadığı ancak prefrontal korteks ve amigdala üzerinde olumsuz etki gösterdiği sonucuna varıldı. Bu bölgeler üzerinde yapılacak ileri elektrofizyolojik çalışmalar ve mekanizmanın aydınlatılmasına yönelik hücresel çalışmalar önerilir.

Anahtar kelimeler: Anosmi, hiposmi, sıçan, bilişsel işlev, elektrofizyoloji

Bu alışma Başkent Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (EK-1, proje no: DA20/16) ve Başkent Üniversitesi Araştırma Fonu'na desteklenmiştir (Proje Onay Tarihi: 13.10.2020). Hayvan deneyleri alışmaları Helsinki Deklarasyonu ve Amerikan Ulusal Sağlık rgt (USA-NIH) tarafından yayınlanan Laboratuvar Hayvanlarının Kullanımına ve Bakımına İlişkin Rehber'e uygun olarak gerçekleştirilmiştir



ABSTRACT

LUX KM. "Investigation of the Relationship and Mechanisms Between Anosmia and Cognitive Dysfunction in Rats", Başkent University Institute of Health Sciences, Department of Pharmacology, PhD Thesis, 2023.

The mechanism and direction of the relationship between anosmia and neurodegenerative diseases is not yet fully understood. In this thesis study, olfactory epithelial damage and neuronal damage-mediated anosmia/hyposmia models were created by administering two pharmacological agents, ZnSO₄ and methimazole, in rats and the possible relationship between cognitive function and loss of sense of smell evaluated by various behavioral tests was examined. In this study, *in vivo* and *in vitro* experiments were performed on a 6-week-old, Wistar albino male rat (n=18; 217±18 g). It was aimed to create an acute anosmia model with mucosal damage and HVCN1 channel blockade with intranasal ZnSO₄ administration and a chronic anosmia model by destroying olfactory neurons with apoptosis with methimazole (75-300 mg/kg, i.p.) injection. The validation of whether experimental models created in rats caused the development of anosmia was evaluated by Buried Food Test (BFT). Subsequently, various behavioral tests were performed to evaluate possible neurocognitive changes and electrophysiological experiments were performed to evaluate the possible change in LTP. While there was no significant difference between the groups in terms of finding buried food in the basal BFT session (Control: 7.7±1.78 min, Methimazole: 9.3±1.89 min, Zinc sulfate: 6.1±1.99 min), the validity of the anosmia model was confirmed in the BFT sessions 1 month and 2 months after the anosmia models were created (1st month- Control: 8.5±2.39 min, both anosmia groups 15±0 min; p<0.005 etc. Control; 2nd month- Control: 8.0±0.92 min, Methimazole: 15±0 min; Zinc sulfate: 14.75±0.49; p<0.001 vs Control). Loss of sense of smell led to a significant reduction in body weight compared to the Control group (Control 86.2±9.4% (181g) vs Methimazole 70.3±5.86% (146.5 g) and Zinc Sulfate 61.6±3.18% (127.6 g)). In the Morris Water Maze (MWM) test, which evaluates hippocampal learning-memory performance, it was observed that all groups showed significant learning performance and the time to find the escape platform was significantly reduced, but no statistically significant difference was found between the groups. In the Novel Object Recognition (NOR) test, in which prefrontal learning-memory performance was evaluated, a significant difference was found between the Control and Methimazole groups (Control= %83,8; Methimazole=%37,8; p<0,05). Passive avoidance (PA) test findings, which assess fear-driven learning-memory performance associated with the limbic system, also showed impaired learning in the anosmic groups (Control: 50.3±97 sec vs Methimazole: 11.5±9.7 sec , Zinc sulfate: 2.1±0.4 sec.); p<0,05 Control vs Methimazole and p<0,01 Control vs Zinc sulfate). When the number of defecations was evaluated with the Elevated Plus Maze (EPM) and Open Field tests in which anxiety was evaluated, no significant difference was found between the groups. The findings of the Forced Swim Test (FST), which evaluates depression-like behavior, also showed that there was no significant difference between the groups. LTP records evaluated in electrophysiological experiments on dentate gyrus showed that there was learning/potentiation in all animals and anosmia did not impair the learning functions associated with dentate gyrus. In the light of our findings, it was concluded that anosmia does not have a negative effect on hippocampal learning and memory, but has a negative effect on the prefrontal cortex and amygdala. Further electrophysiological studies on these regions and cellular studies to elucidate the mechanism are recommended.

Keywords: Anosmia, hyposmia, rat, cognitive function, electrophysiology

This study was approved by Başkent University Animal Experiments Local Ethics Committee (Annex-1, project no: DA20/16) and supported by Başkent University Research Fund (Project Approval Date: 13.10.2020). Animal experiments were conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and the Guidelines for the Use and Care of Laboratory Animals published by the American National Health Organization (USA-NIH)



İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	I
ÖZET	II
ABSTRACT	IV
İÇİNDEKİLER	VI
ŞEKİLLER LİSTESİ	VIII
TABLolar LİSTESİ	IX
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ	X
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Koku Duyusu.....	4
2.2. Olfaktor Sistem	5
2.3. Anosmi/ Hiposmi	7
2.3.1. İntranazal çinko sülfat lavajı aracılı anosmi.....	8
2.3.2. İntraperitoneal metimazol aracılı anosmi.....	8
2.3.3. Anosmi/hiposmi oluştuğunun doğrulanması: Gömülü gemi bulma testi (Buried Food Test).....	8
2.4. Bilişsel Performansı Değerlendirmeye Yönelik Davranış Testler	9
2.4.1. Barnes labirenti (Barnes Maze)	9
2.4.2. Morris su labirenti (Morris Water Maze)	10
2.4.3. Yükseltilmiş artı labirent (Elevated Plus Maze)	11
2.4.4. Açık alan (Open-Field) testi	11
2.4.5. Yeni nesne tanıma (Novel Object Recognition) Testi	12
2.4.6. Porsolt zorlu yüzme testi (Forced Swim Test)	13
2.5. Elektrofizyoloji Deneyleri	13
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	16
3.1. Deney Hayvanları.....	16
3.2. Kullanılan Madde Ve İlaçlar.....	17
3.3. Kullanılan Malzeme Ve Gereçler.....	17
3.4. Deney Grupları.....	17
3.5. Deney Protokolü.....	18
3.6. Anosmi/ Hiposmi Modellerinin Oluşturulması.....	19
3.7. Bilişsel Testler.....	20
3.7.1. Yem Bulma Testi.....	20
3.8. Davranış Deneyleri.....	21
3.8.1. Barnes labirenti	21
3.8.2. Morris su labirenti.....	23
3.8.3. Yükseltilmiş artı labirent (<i>Elevated Plus Maze</i>).....	25
3.8.4. Açık alan testi (<i>Open Field Test</i>).....	26
3.8.5. Yeni nesne tanıma testi (<i>Novel Object Recognition Test</i>)	27
3.8.6. Pasif sakınma (<i>Passive Avoidance</i>) testi	29
3.8.7. Porsolt zorlu yüzdürme (<i>Forced Swim</i>) testi	30
3.9. Elektrofizyoloji Deneyleri.....	31
3.9.1. Uzun erimli güçlendirme (<i>Long term potentiation; LTP</i>) deneyi.....	31
3.10. TSH Ve fT4 Seviyelerinin Ölçümü.....	33
3.11. İstatistiksel Analiz.....	34
4. BULGULAR.....	35
4.1. Deney Hayvanlarında Vücut Ağırlığı İzlemi.....	35
4.2. Deney Hayvanlarının Defekasyon Sayıları.....	36
4.3. Bilişsel Testler.....	37

4.3.1. Gömülü yemi bulma (Burried Food) testi bulguları	37
4.4. Öğrenme-Bellek İşlevini Değerlendirmeye Yönelik Davranış Deneyleri.....	38
4.4.1. Tüm sıçanlarda bazal uzaysal öğrenme-bellek Performansı (Barnes Labirenti) bulguları	38
4.4.2. Uzaysal öğrenme-bellek performansı (Morris su labirenti) bulguları	39
4.4.3. Yeni nesne tanıma testi (NOR) bulguları	41
4.4.4. Pasif sakınma testi bulguları	42
4.5. Anksiyeteyi Değerlendirmeye Yönelik Davranış Deneyleri.....	43
4.5.1. Yükseltilmiş artı labirent bulguları	43
4.5.2. Açık alan testi bulguları	44
4.5.3. Porsolt zorlu yüzdürme testi (Forced Swim Test) bulguları	46
4.6. Elektrofizyoloji Deneyleri.....	47
4.6.1. Long term potentiation deneyi bulguları	47
5. TARTIŞMA.....	48
6.SONUÇ VE ÖNERİLER.....	52
KAYNAKLAR.....	54
EKLER	
EK 1: Etik Kurul Onayı	

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1. Deney Protokolü.....	18
Şekil 2. Gömülü Yemi Bulma Testi için kullanılan standart tip Iv (556 x 334 x 195 mm) kafesin Şeması	20
Şekil 3. “Barnes Maze Test” düzeneği ve uygulama örneği.....	22
Şekil 4. “Morris Su Labirenti Testi” düzeneği.....	23
Şekil 5. “Yükseltilmiş Artı Labirent” uygulaması düzeneği.....	25
Şekil 6. Açık Alan Testi uygulaması.....	26
Şekil 7. “Yeni Nesne Tanıma Testi” düzeneği ve uygulaması.....	28
Şekil 8. Pasif sakınma Testi uygulaması.....	29
Şekil 9. Pasif Sakınma Testi uygulama şeması.....	30
Şekil 10. “Porsolt Zorlu Yüzme Testi” düzeneği.....	31
Şekil 11. LTP kayıtlarının alınması için lateral perforan yolak ve dentat gyrusun Açılması.....	32
Şekil 12. Lateral perforan yolaktan alınan LTP kaydı örnekleri.....	33
Şekil 13. Vücut ağırlığındaki artış	35
Şekil 14. Vücut ağırlığındaki artış yüzdesi	36
Şekil 15. Pasif Sakınma Testi sırasındaki ortalama dışkılama sayıları	37
Şekil 16. Sıçanlarda Yem Bulma Testinde performansın karşılaştırılması.....	38
Şekil 17. Sıçanlarda Bazal Uzaysal Öğrenme-Bellek Performansının değerlendirilmesi ..	39
Şekil 18. Deney hayvanlarının kaçış platformunu bulma süreleri	39
Şekil 19. Deney hayvanlarının Hedef kadranda geçirilen süre yüzdeleri	40
Şekil 20. Deney hayvanlarının Hedef kadranda geçirilen süre yüzdeleri	40
Şekil 21. Deney hayvanlarının nesnelere gösterilen ilgi süresi	41
Şekil 22. Deney hayvanlarının nesnelere gösterilen göreceli ilgi süresi	42
Şekil 23. Deney hayvanlarının pasif sakınma testinde latans ortalamaları	43
Şekil 24. Sıçanların açık kollarda geçirdikleri ortalama süre	44
Şekil 25. Açık Alan toplam katledilen mesafe	45
Şekil 26. Sıçanların orta bölgede geçirdiği süre (Sn)	45
Şekil 27. ZYT Sıçanların ortalama hareketsiz kalma süresi (sn).....	46
Şekil 28. Sıçanlarda “Long term potentiation” bulguları	47

TABLÖLAR LİSTESİ

	Sayfa
Tablo 1. Deney grupları.....	18



SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

AA: Açık alan
AP: Antero- Posterior
BL: Barnes Labirenti
cAMP: Siklik adenosin monofosfat
cGMP: Siklik guanozin monofosfat
DA: Dopamin
DR: Dopamin Reseptörü
D₁: Dopamin reseptör 1 alttipi
DAT: Dopamin taşıyıcısı
DV: Dorso-Ventral
G proteini: Guanin nükleotid-bağlayıcı protein
G_s: Stimulan tip G proteini
G_{olf}: Olfaktör tip G proteini
GPKR: G-Proteini ile Kenetli Reseptör (*G-Protein-coupled receptor*; GPCR)
icv: İntraserebroventriküler
ko: *Knock out*
MAO-B: Monoamino oksidaz
MFB: Orta ön beyin demeti
ML: Medio-lateral
MSL: Morris Su Labirenti
MSS: Merkezi sinir sistemi
OR: Olfaktör Reseptör
PSS: Periferik sinir sistemi
PZYT: Porsolt Zorlu Yüzdürme Testi
s.c.: subkutan
SF: Serum fizyolojik
YAL: Yükseltilmiş Artı Labirent
YNT: Yeni Nesne Tanıma Testi
ZnSO₄: Çinko sülfat
ZYT: Zorlu Yüzdürme Testi

1. GİRİŞ

Koku duyusu embriyolojik olarak en eski duyu olmasına karşın, mekanizması en az anlaşılmış olan duyudur. Koku duyusu, ilişkili sinirsel yolların beyin sapında bir çekirdeği olmaması nedeniyle bir kraniyal sinir değil beynin uzantısı olarak kabul edilmesi, rejenerasyon özelliği olması, talamusa uğramadan kortekse ulaşan tek duyu olması, bir koku belleğinin bulunması gibi, onu diğer duylardan ayrıcalıklı kılan birçok yönüyle çok özel bir duyudur (1, 2). Özellikle son yıllarda sinirbilimleri alanında koku duyusunun anlaşılmasına yönelik pek çok araştırma bu duyunun evrimsel ve yaşamsal önemi hakkında çok önemli bulgular sağlamıştır (3, 4). Koku alma yetisi, canlılarda doğadaki diğer canlı ve cansız maddelerin çoğu hakkında bilgiye, deneyime dayalı davranış değişikliği gelişmesine neden olduğu için koku duyusu evrimsel süreçte çok önemli bir role sahiptir. Canlının diğer canlılarla ve türdeşleriyle ilişkilerini düzenlemekte en güvenilir referanslarından olagelmıştır. Bu özel duyunun canlılardaki eş bulma, yiyecek bulma, rakipten ve olası tehlikelerden kaçınma gibi pek çok davranıştaki önemli rolü, sağlıklı bir koku duyusunun ve işlevsel bir koku belleğinin, insan dahil canlıların evrimindeki önemini açıkça ortaya koymaktadır (5).

Koku duyusunda süreç düşük derişimlerdeki uçucu kimyasal maddelerin kemosenörler aracılığı ile tanınması ile başlar (6). Koku duyusu evrimsel sürecin en ilkel duylarından birisi olmakla beraber, en karmaşık moleküler mekanizmalardan birisine sahiptir. Koku reseptörleri yüzlerce reseptör proteininden oluşur. Bunlar ise binlerce kokunun algılaması ve ayırt edilmesini sağlar (7). Pek çok canlı türü koku duyusu sayesinde kimyasal bileşikler ve bu bileşiklerin aracılık ettiği tepkimeleri ayırt edebilmektedir. Farklı türler, farklı koku alma reseptör setlerine sahiptir (8). Koku maddeleri çeşitli kimyasal yapıda uçucu, düşük derişimlerde çoğunlukla hidrofobik organik bileşiklerdir (9, 10).

İnsanlarda olfaktör genler, kromozomların kopyalama hatasına yatkın bölgelerinde yer almaktadır. Olfaktör reseptörün yapısındaki değişiklik kokulara karşı afinitesinde değişikliklere neden olarak koku algısında ve kokulara karşı verilen davranışsal tepkilerde varyasyonlara yol açmaktadır. Yaşam tarzındaki adaptasyonların bir kısmı çevreye ve tepkilere karşı olfaktör reseptör genlerinin artması, azalması veya yok olması ile de dengelenmektedir.

Buck ve Axel tarafından olfaktör reseptör (OR) protein süper ailesinin (3) keşfi ve insan genom projesi ile İnsanların kokuları nasıl algıladıkları üzerine olan ilgiyi olfaktör genler, proteinler, transdüksiyon mekanizmaları ve koku alma repertuarlarının gelişimi üzerine kaydirmiştir. (11-14).

Koku duyusu en karmaşık moleküler mekanizmalardan birisine sahiptir. Yüzlerce reseptör proteininden oluşan koku reseptörleri binlerce kokunun algılaması ve ayırt edilmesini sağlar (7). Bu karmaşık ağ genetik, cinsiyet, yaş, hormonal durum, hastalıklar ve çevre gibi birçok modülatör faktörden etkilenir. Koku algısındaki bu kompleks moleküler ve kortikal ağlar göz önüne alındığında birçok ilaç molekülünün de bu sistem üzerinde modülatör etkilerinin olduğu açıktır (11).

Olfaktör sinir dış dünya ile temas halinde olan tek kranial sinirdir, böylelikle kimyasallar ve patojenler açısından en yüksek riski taşır. Koku algısı *bulbus olfactorius*'ta yoğunlaşmış ve tüm beyine yayılmış moleküler yollardan oluşur. Koku duyusu ile ilişkili dokuz yüzden fazla gen ve psödogen, 20. kromozom ve Y kromozomu hariç, tüm insan genomuna yayılmıştır (11). İnsanlardaki koku duyusunda yaklaşık 400 fonksiyonel gen ürünü ve bunların kodladığı olfaktör G proteini (G_{olf}) ile kenetli reseptörler (GPKR) görev alır (9, 12). Bu reseptörlerin gelen kimyasal uyarıya farklı derecede yanıt vermesiyle oluşturdukları paternlerin tanınması sayesinde 400'e yakın reseptör binlerce kokuyu ayırt etmeyi sağlar. Farklı odorantlar farklı olfaktör reseptör kombinasyonlarını uyarır ve kendine özgü bir örüntü (patern) oluşturur (6, 15).

Koku duyusunun en periferdeki anatomik zemini burnun üst seviyesinde yer alan epitelin içinde yerleşik olarak bulunan olfaktör reseptör hücreleri, destek hücreleri ve bazal hücrelerden oluşur. Destek hücreleri mukozal sınırdaki mikrovilluslar ile kaplı sekretuar granüller içeren bir yapıdır. Andiferansiye kök hücreler olan bazal hücreler reseptör hücrelerinin yıkım-yapım döngüsünden (*turnover*) sorumludurlar. Olfaktör reseptör hücreleri de siliaları olan ve olfaktör sinir ile devam eden yapılardır. Olfaktör sinir ince, myelinsiz ve yavaş ileten bir sinirdir. Bu sinirler kafatabanında yer alan kribriiform kemiğin içindeki deliklerden geçerek *bulbus olfactorius*'ta yer alan glomerüller içinde mitral hücreler (1000 reseptör hücresi 1 tane mitral hücre ile) ile sinaps yaparlar ve *tractus olfactorius* aracılığı ile olfaktör tüberkül, entorinal korteks, amigdala, periamigdaloid korteks, piriform korteks ve anterior olfaktör kortekse iletim yaparlar.

Koku duyusunun periferdeki ana moleküler bileşenleri G_s ve $G_{s/olf}$ reseptörleridir. Bu reseptörlerin büyük çoğunluğu adenilat siklaz, küçük bir kısmı ise guanilat siklaz enzimleri ile kenetlidir ve uyarılmaları sonucunda hücre içinde sırasıyla cAMP ve cGMP gibi ikinci ulakların artışına neden olarak katyon (Na^+/Ca^{2+}) kanallarının ve ardından da Cl^- kanallarının açılmasına neden olurlar. Bu süreç depolarizasyona yol açarak bir aksiyon potansiyelini başlatır. Aksiyon potansiyelinin oluşması açısından diğer bir önemli kanal ise Nav1.7 kanalıdır. Bu kanalın

inhibisyonu sinir iletisini baskılar. Olfaktör sistemin daha üst merkezlerinde ise bölgesel farklılık göstermekle beraber, dopamin D₁ reseptörleri ile kenetli G_s ve G_{s/olf} reseptörleri bulunmaktadır. Bu yolağın farklı ilaçlar ile aktive ve inhibe olduğu gösterilmiştir. Örneğin, opioidler koku yolağını baskılarken, teofilinler uyarır. Son yıllarda birçok çalışma nörodejeneratif hastalıklarda koku duyusunda kayıp olduğunu göstermiştir. Bu kaybın birçok hastalığın tanısında öncü-belirteç olabileceği ileri sürülmüştür. Örneğin, amiotrofik lateral skleroz, Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı ve Huntington hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıklarda koku duyusunda da kayıp olduğu gösterilmiş ancak bunun hastalıkla ilişkisi henüz net olarak açıklanamamıştır (16-18).

Anosmi ile nörodejeneratif hastalıkların ilişkisi bilinmekle birlikte mekanizmanın açık olmaması bu tez çalışmasının özgün yönüdür. Bu tez çalışması ile başlayabilecek derinlemesine bir araştırma sürecinde mekanizmaya yönelik bir ipucunun bulunabilmesi Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı, Huntington hastalığı, ALS gibi pek çok nörodejeneratif hastalığın tedavisine katkıda bulunacak kanıt sağlayabilecektir.

Bu tez çalışmasının amacı sıçanlarda akut ve kronik anosmi modellerinde nörokognitif işlevdeki olası değişikliklerin nöropsikofarmakolojik ve elektrofizyolojik ölçütler aracılığıyla incelenmesidir.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Koku Duyusu

Omurgalılarda burun ve ağız ile ilişkili duyu sistemlerinden koku alma, tat alma ve trigeminal veya genel kemosenör sistemin oluşturduğu üç duyu sistemi canlının çevresel kimyasalları algılamasına aracılık eder (1, 19- 20)

Hayvanlarda koku alma duyu kimyasal ortamdan gelen sinyalleri algılamak üzere gelişmiştir. Bu sinyaller ne yeneceğine, ne zaman üreyeceğine, hangi yöne hareket edileceğine ve hangi uyaranların ödüllendirici veya tehlikeli olarak hatırlanacağına dair ipuçları içerir (1,2). İnsanlarda da kokular diğer insanlar, hayvanlar, bitkiler ve çevre ile ilgili pekçok durum hakkında bilgi sağlar. Koku duyu beslenme ve sosyal iletişim üzerinde etkilidir (1).

Koku duyu embriyolojik olarak en eski duyu olmasına karşın, mekanizması henüz en az anlaşılmış olan duyudur. Koku duyu, ilişkili sinirsel yolların beyin sapında özel bir nöral çekirdeğinin bulunmaması nedeniyle bir kranial sinir değil beynin uzantısı olarak kabul edilmesi, rejenerasyon özelliğine sahip olması, talamusa doğrudan uğramaksızın kortekse ulaşan tek duyu olması, özelleşmiş bir koku belleğinin bulunması gibi, onu diğer duylardan ayrıcalıklı kılan birçok yönüyle çok özel bir duyudur (1, 2).

İnsanların sahip olduğu tüm duylar arasında koku alma duyu en ilkel ve en volatil duyudur (21). Havadaki binlerce küçük kimyasal (koku maddeleri; odorantlar) algılar, kodlar ve ayırt eder; Koku maddeleri uçucu, daha hafif, genellikle çok küçük derişimlerden bulunan, çeşitli kimyasal yapıda ve özellikte, büyük ölçüde hidrofobik organik bileşiklerdir (9-10).

Koku maddeleri olarak adlandırılan bu uyaranlar, burnun içini kaplayan epitel tabakasındaki koku alma epitelinde bulunan özelleşmiş koku alma reseptörü nöronları ile etkileşime girer. Reseptör hücrelerden çıkan aksonlar, doğrudan olfaktör bulbustaki nöronlara projekte olur, bu da sırasıyla ön beyindeki diğer yapıların yanı sıra temporal lobtaki piriform kortekse projeksiyonlar gönderir (1). Bu nedenle koku alma sistemi, birincil reseptörlerden duysal bilgileri işleyen altı katmanlı neokortikal bir bölgeye giden talamik bir bağlantıyı (informasyon, mesaj, röle) içermemesi bakımından duysal sistemler arasında benzersizdir. Bunun yerine, piriform korteks, filogenetik olarak neokorteksten daha eski olduğu düşünülen üç katmanlı arkikortekstir ve bu nedenle koku almaya adanmış özel bir işleme merkezini temsil eder (1).

Tüm türler arasında koku duyusu iki ana soruna yanıt olarak gelişmiştir; kimyasal bileşikler ve bunların neden olduğu benzersiz tepkimeleri fark etmek ve ayırt etmek. Bununla birlikte, koku duyusu sadece koku maddelerini tanımlamak ve ayırt etmek değil, nesnelere veya olaylara duygusal bir nitelik katmak, ruh halimizi ve düşüncelerimizi etkilemek, sosyal etkileşimlerde bir katalizör görevi görmek, davranışları ve bireylerarası ilişkileri düzenlemek gibi işlevleriyle insanlığın evriminde önemli bir role sahiptir (5).

2.2. Olfaktör Sistem

İnsanlarda olfaktör genler, kromozomların kopyalama hatasına yatkın bölgelerinde yer almaktadır. Olfaktör reseptör (OR) geni duplikasyona uğrar ve bu esnada iki özdeş genden birisi mutasyona uğrayabilir. Bu mutasyon fonksiyonel bir geni bir psödogene çevirebilir, fatal veya non-fatal olabilir, mutasyon sonucu moleküler yapıda hafif değişiklikler ile kopyalanmaya devam eder.

OR'deki yapısal değişimler odorantlara karşı afinitesinde değişikliklere yol açarak koku algısında ve kokulara karşı verilen davranışsal tepkilerde varyasyonlara neden olur. Yaşam tarzındaki adaptasyonların bir kısmı çevreye ve tepkilere karşı OR genlerinin artması veya yok olması ile de dengelenmektedir. Olfaktör sistem bu değişikliklerden avantaj sağlayarak kokulara karşı birbirinden ayrı ve öğrenilmiş davranışsal tavırlar göstermektedir (8).

İnsanların kokuları nasıl algıladıklarına olan ilgi oldukça günceldir ve iki önemli bilimsel çalışma aracılığı ile önem kazanmıştır. Bu çalışmalar Buck ve Axel tarafından OR protein süper ailesinin (3) keşfi ve insan genom projesidir (12). Bu da araştırmaların odağını olfaktör genler, proteinler, transdüksiyon mekanizmaları ve koku alma repertuarlarının gelişimi üzerine kaydırmıştır (11-14). Özellikle son yıllarda sinirbilimleri alanında koku duyusunun anlaşılmasına yönelik pek çok araştırma bu duyunun evrimsel ve yaşamsal önemi hakkında çok önemli bulgular sağlamıştır (3, 4).

Koku duyusunun tümüyle kaybı (anosmi) veya azalması (hiposmi) birçok nedene bağlı olarak gelişebilir ve yaşam kalitesini ciddi anlamda bozar. Çalışmalarda koku duyusunun yaşlanma ile yaygın bir şekilde azaldığı gösterilmiştir. Anosminin 65-80 yaş arasındaki bireylerin %50'sinde, 80 yaş üzeri bireylerin ise %75'inde gözlemlendiği bildirilmiştir (22-23). İleri yaşta koku kaybına bağlı mortalite riski koroner kalp hastalıkları kadar yüksek bulunmuştur. Son yıllarda, amiotrofik lateral skleroz (ALS), Alzheimer hastalığı, Parkinson

hastalığı ve Huntington hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıklarda koku duyusunda da kayıp olduğu gösterilmiş ancak bunun hastalıkla ilişkisi henüz net olarak açıklanamamıştır (16-18).

Koku duyusunda süreç düşük derişimlerdeki uçucu kimyasal maddelerin kemosenörler aracılığı ile tanınması ile başlar (6). Koku duyusu evrimsel sürecin en ilkel duyularından birisi olmakla beraber, en karmaşık moleküler mekanizmalardan birisine sahiptir.

Koku reseptörleri yüzlerce reseptör proteininden oluşur. Bunlar ise binlerce kokunun algılaması ve ayırt edilmesini sağlar (7). Bu karmaşık ağ; genetik, cinsiyet, yaş, hormonal durum, hastalıklar ve çevre gibi birçok modölatör faktörden etkilenir. Koku algısındaki bu kompleks moleküler ve kortikal ağlar göz önüne alındığında birçok ilaç molekülünün de bu sistem üzerinde modölatör etkilerinin olduğu açıktır (11).

Olfaktör sinir dış dünya ile temas halinde olan tek kranial sinirdir, böylelikle kimyasallar ve patojenler açısından en yüksek riski taşır. Koku algısı *bulbus olfactorius*'ta yoğunlaşmış ve tüm beyine yayılmış moleküler yollardan oluşur. Koku duyusu ile ilişkili dokuz yüzden fazla gen ve psödogen, 20. kromozom ve Y kromozomu hariç, tüm insan genomuna yayılmıştır (11). İnsanlardaki koku duyusunda yaklaşık 400 fonksiyonel gen ürünü ve bunların kodladığı olfaktör G proteini (G_{olf}) ile kenetli reseptörler (GPKR) görev alır (6, 24). Bu reseptörlerin gelen kimyasal uyarıya farklı derecede yanıt vermesiyle oluşturdukları paternlerin tanınması sayesinde 400'e yakın reseptör binlerce kokuyu ayırt etmeyi sağlar. Farklı odorantlar farklı OR kombinasyonlarını uyarır ve kendine özgü bir örüntü (patern) oluşturur (6, 15).

Koku duyusunun en periferdeki anatomik zemini burnun üst seviyesinde yer alan epitelin içinde yerleşik olarak bulunan olfaktör reseptör hücreleri, destek hücreleri ve bazal hücrelerden oluşur. Destek hücreleri mukozal sınırdaki mikrovilluslar ile kaplı sekretuvar granüller içeren bir yapıdır. Farklılaşmamış kök hücreler olan bazal hücreler reseptör hücrelerinin yıkım-yapım döngüsünden (*turnover*) sorumludurlar. OR hücreleri de siliaları olan ve olfaktör sinir ile devam eden yapılardır. Olfaktör sinir ince, myelinsiz ve yavaş ileten bir sinirdir. Bu sinirler kafatabanında yer alan kribriform kemiğin içindeki deliklerden geçerek *bulbus olfactorius*'ta yer alan glomerüller içinde mitral hücreler (1000 reseptör hücresi 1 tane mitral hücre ile) ile sinaps yaparlar ve *tractus olfactorius* aracılığı ile olfaktör tüberkül, entorinal korteks, amigdala, periamigdaloid korteks, piriform korteks ve anterior olfaktör kortekse iletim yaparlar.

Koku duyusunun periferdeki ana moleküler bileşenleri G_s ve $G_{s/olf}$ proteinleri ile kenetli reseptörlerdir. Aslında olfaktör epiteldeki reseptörler odorant (koku reseptörleri) ve feromonları (vomeronazal reseptörler) bağlayarak etkinleşecek biçimde özelleşmiştir.

Bu reseptörlerin büyük çoğunluğu adenilat siklaz, küçük bir kısmı ise guanilat siklaz enzimleri ile kenetlidir ve uyarılmaları sonucunda hücre içinde sırasıyla cAMP ve cGMP gibi ikinci ulakların artışına neden olarak katyon (Na^+/Ca^{2+}) kanallarının ve ardından da Cl^- kanallarının açılmasına neden olurlar. Bu süreç depolarizasyona yol açarak bir aksiyon potansiyelini başlatır. Aksiyon potansiyelinin oluşması açısından diğer bir önemli kanal ise Nav1.7 kanalıdır. Bu kanalın inhibisyonu sinir iletisini baskılar.

Olfaktör sistemin daha üst merkezlerinde ise bölgesel farklılık göstermekle beraber, dopamin D_1 reseptörleri ile kenetli G_s ve $G_{s/olf}$ proteinleri bulunmaktadır. Bu yolağın farklı ilaçlar ile aktive ve inhibe olduğu gösterilmiştir. Örneğin, opioidler koku yolağını baskımlarken, teofilin uyarır. Son yıllarda birçok çalışma nörodejeneratif hastalıklarda koku duyusunda kayıp olduğunu göstermiştir. Bu kaybın birçok hastalığın tanısında öncü-belirteç olabileceği ileri sürülmüştür.

2.3. Anosmi

2.3.1. İntranazal çinko sülfat lavajı-aracılı anosmi:

Alberts ve Galef (1971) tarafından ilk kez bildirilmesinden sonra, çinko sülfatın ($ZnSO_4$) burun içine uygulanması, çeşitli türlerde olfaktör epiteli yok ederek oluşturulan bir anosmi modeli olarak kullanılmıştır (25). Aslında, bu yöntemin etkinliği o kadar yaygın kabul görmüştür ki, bazı durumlarda, koku tespiti için bir davranış testinin yokluğunda bile anosminin olduğu varsayılmıştır (26-29). Bununla birlikte, bu uygulamanın genel olarak sanıldığından çok daha az etkili olabileceğine dair önemli kanıtlar vardır. Sıçanlar ve hamsterlar ile yapılan anatomik çalışmalar, intranazal $ZnSO_4$ uygulamasının tüm koku alma epitelini tahrip etmeyebileceğini ortaya koymaktadır (28; 30-31).

Fareler üzerinde benzer koordineli anatomik ve davranışsal çalışmalar yapılmamış olsa da $ZnSO_4$ tedavisinin farelerde daha etkili olabileceğine inanmak için nedenler vardır. Bir dizi çalışma, $ZnSO_4$ 'ün farelerde esas olarak tüm koku alma epitelinde şiddetli dejeneratif değişiklikler oluşturduğunu göstermektedir (32-34). Basit besin bulma ve benzeri testler (Tablo

l'de özetlenmiştir) kullanılarak yapılan çalışmalarda, intranazal ZnSO₄ uygulanan farelerin günler, hatta haftalar boyunca anosmik olduğu bildirilmiştir (33; 35-36).

Farede koku almanın moleküler biyolojisinin anlaşılmasına yönelik hızlı gelişmeler göz önüne alındığında, koku alma sisteminin deneysel manipülasyonuna elverişli yöntemlerin geliştirmesi giderek daha önemli hale gelmektedir. ZnSO₄ ile intranazal lavaj uygulamasının koku alma sisteminde güvenilir biçimde bir bozulmaya ve anosmiye/hiposmiye yol açması bu amaç için fayda sağlayacaktır.

Ne yazık ki, farelerde ZnSO₄ ile oluşturulan anosmiye yönelik çalışmaların çoğunda en ayrıntılı anatomik bulgular elde edildiği halde uygulamanın davranışsal etkileri değerlendirilmemiş veya nispeten kaba davranış testleri kullanmıştır (31; 37).

2.3.2. İntraperitoneal metimazol aracılı anosmi

Metimazol insanlarda koku ve tat duyusu yitimine neden olabilen antitiroid bir ilaçtır. Kemirgenlerde olfaktotoksik bir ajandır (38; 39). Sıçanlarda ve farelerde koku yitimi/ anosmi ve koku diskriminasyonunda anlamlı değişiklikler yaptığı gösterilmiştir (39; 40;42). Anosmi/hiposmi gelişmesi hem mukozal hasar hemde nöronal hasar bağlıdır (38-40). Anosmi oluşması için 14-21 gün gerekmektedir daha kısa süreli uygulamalarda nöronal hasar %10 civarında olup düşük seviyede hiposmiye neden olur, deney süresince tekrarlanan intraperitoneal enjeksiyonlar yapılmalıdır (39;41;42). Long-evans sıçanlarında 25mg/kg ip enjeksiyon veya 50mg/kg oral metimazol olfaktör mukoza harabiyeti için yeterlidir, 300mg/kg tek do zip enjeksiyon ile totale yakın olfaktör epitel harabiyeti oluşmaktadır (42). Anosmi/hiposmi ile ilgili çalışmalarda kognitif fonksiyon çalışmaları yapılacağı zaman antitiroid bir ajan olan metimazol kullanıldığında tiroid fonksiyonlarının değerlendirilmesi önem arz etmektedir.

2.3.3. Anosmi/Hiposmi Oluşturğunun Doğrulanması: Gömülü Yemi Bulma Testi (*Burried Food Test*)

Gömülü yemi bulma testi ilk olarak 1971'de Alberts ve Galef tarafından tanımlanmıştır (25). O zamandan beri modifiye edilip geliştirilerek uygulanan bu test, çeşitli durumlarda koku alma bozukluğunun sonuçlarını araştırmak için kullanılmıştır. Örneğin: koku alma işlevinin dişi farelerin erkek türdeşlerine karşı sosyal davranış performansı üzerindeki etkilerinin analizi (43), hem ana koku alma sisteminin hem de vomeronazal organın davranışa katılımının ayırt edilmesi

(44) veya sülfat metabolizmasındaki bir bozukluk olan hiposülfatemi hayvan modelleri (45) üzerine deneysel çalışmalarda bu testten yararlanılmıştır. Ayrıca, örneğin nöronal hücre adezyon molekülü (Nrcam) *null* farelerde seçici imidazol olmayan histamin H₃ reseptörü antagonistinin anksiyete ve depresyon benzeri bozukluklardaki etkilerini incelemek için (46), sosyalliği ve bilişsel işlevi değerlendirmek için (47), endokannabinoidlerin koku duyusu nöronlarındaki rolünü analiz etmek için (48) kullanılmıştır. Koku alma duyusuna özgü Ric-8B nakavt farelerde koku alma duyusunun bozulup bozulmadığını belirlemek için diğer motivasyonel, davranışsal ve hücresel testlerle birlikte gömülü gıda testinin kullanıldığı çalışmalar da mevcuttur (49). Bu çalışmalarda kullanılan gömülü yemi bulma test yöntemlerinde bazı farklılıklar olduğu dikkat çekmektedir. Örneğin, bazı araştırmacılar koku alma testi sırasında yeniliğin neden olduğu keşif faaliyetini azaltmak için test kafesinde test öncesi alışma aşamasını kullanırken, diğerleri kullanmamıştır. Bu alışmanın, gruplar içindeki tepki değişkenliğini azaltmada yardımcı olabileceğine dikkat etmek önemlidir.

Deney hayvanının yiyecek aramak için koku ipuçlarını kullanma konusundaki doğal eğilimine dayanan gömülü yemi bulma testi, uçucu kokuları alma yeteneğini doğrulamak için kullanılır. Ana parametre, sınırlı bir süre içinde, bir kafes altlığı tabakasının altına gizlenmiş küçük bir parça yemek, kurabiye, vb yiyecekleri bulma süresinin saptanmasıdır.

Hayvanın yeni kokuları araştırma eğilimine dayanan koku alışma/alışkanlık testi hayvanın farklı kokuları algılayıp ayırt edemediğini test etmek için kullanılır. Bu amaçla, hem sosyal olmayan kokular hem de sosyal kokular kullanılabilir.

2.4. Bilişsel Performansı Değerlendirmeye Yönelik Davranış Testleri

2.4.1. Barnes labirenti (*Barnes Maze*)

Barnes labirenti (BL), ilk olarak Carol Barnes tarafından sıçanlarda uzaysal hafızayı incelemek için geliştirilen (50) ve daha sonra farelerde kullanılmak üzere uyarlanan (51) kuru zemin üzerinde gerçekleştirilen bir davranış testidir. Parlak ışık ve açık alanlar, evrimsel olarak besin zincirindeki pek çok tür için av oluşturan kemirgenlerde caydırıcıdır ve kaçış davranışını tetiklemek için motive edici faktörlerdir. Kavramsal olarak, hayvanların çevredeki görsel ipuçları ile sabit bir kaçış konumu (güvenli kutu; *safe box*) arasındaki ilişkiyi öğrendiği hipokampus-aracılı bir görev olması bakımından Morris su labirentine (MSL) benzer (52). Barnes labirenti düzeneği, çevresinde ışınsal olarak eşit aralıklarla yerleştirilmiş belli sayıda

delik bulunan (fareler için 40, sıçanlar için 18) yükseltilmiş dairesel bir platformdan oluşur. Bir deliğin altına kaçış kutusu monte edilirken kalan delikler boş bırakılır.

Kaçış odası/kutusu, birkaç ardışık güne yayılmış günlük denemeleri içeren eğitim süresince sabit tutulur. Eğitim sırasında, kemirgenler kaçış kutusunun yerini öğrenmek için tipik olarak üç farklı arama stratejisi dizisini (rastgele, seri, uzamsal) kullanır (53).

MSL, kemirgenlerde uzaysal öğrenmeyi değerlendirmek için baskın model olmasına rağmen, BL de kayda değer birkaç önemli avantaj sunar. Her şeyden önce, BL yüzme ve onunla ilişkili potansiyel bulandırıcı değişkenleri (*confounding variables*) içermez. Yüzme, kemirgenlerin doğuştan içgüdüsel olarak bildiği ancak hoşlanmadıkları bir fiziksel etkinliktir. MSL eğitiminin plazma kortikosteron düzeylerinde BL ile oluşandan daha fazla artış oluşturduğunu belgeleyen çalışmalarda ayrıntılı olarak açıklandığı gibi yüzme stres yaratan bir süreçtir (54). Ayrıca, çoğu MSL protokolünde kullanılan yüzme koşullarının, vücut sıcaklığında performansı etkileyebilecek azalmalara neden olabildiği bildirilmiştir (55). Son olarak, yukarıda belirtildiği gibi, BL her denemenin sırasında deney hayvanı tarafından kullanılan üç olası arama stratejisinin net bir şekilde tanımlanmasına da izin verir.

2.4.2. Morris su labirenti (*Morris Water Maze*)

İngiliz sinirbilimci Richard G. M. Morris tarafından 1981 yılında geliştirilen ve kendi adıyla anılan MSL deney hayvanlarında uzaysal öğrenme-bellek işlevinin değerlendirildiği bir düzeneğdir (52). MSL, geliştirilmesinden bu yana geçen 42 yıl içinde özellikle kemirgenlerde öğrenme ve bellek işlevlerini değerlendirmede çok popüler bir araç haline geldi. İşlevselliğine dair nicel bir kanıt olarak, PubMed veri-tabanındaki mevcut yayınlarda MSL düzeneğinin kullanıldığı deneysel araştırma sayısının 2020 yılı itibarıyla 11.000'in üzerinde olması gösterilebilir. MSL'nin bu popülerliği, hipokampal-aracılı uzaysal öğrenme ve bellek işlevini değerlendirmedeki etkinliği dahil, pek çok olumlu özelliğinin bulunması ile açıklanabilir; örneğin görevin ana amacına ikincil olan çeşitli deneysel manipülasyonlarda (lezyon oluşturma, farmakolojik ve genetik çalışmalar) denekler tarafından gösterilen herhangi bir motivasyonel varyasyondan muaf olması ve kobaylar, sıçanlar ve fareler dahil farklı türlerle yapılan çalışmalarda güvenilirliğinin gösterilmiş olması avantajlarındandır (56).

2.4.3. Yükseltilmiş artı labirent (*Elevated Plus Maze*)

Yükseltilmiş artı labirent (YAL), kemirgenler için yaygın olarak kullanılan bir davranış testidir ve çeşitli farmakolojik ajanların ve steroid hormonların anti-anksiyete etkilerini değerlendirmek ve anksiyete ile ilgili davranışın altında yatan beyin bölgelerini ve mekanizmaları tanımlamak için yapılan çalışmalarda etkinliği doğrulanmış bir düzendir.

YAL, File ve diğ. (1993) tarafından kemirgenlerin kaygı tepkilerini değerlendirmek için basit bir yöntem olarak tanımlanmıştır (57). Güçlü bir yaklaşma-kaçınma çatışmasına yol açan yerden yüksek bir açık yol ve buna neden olmayan kapalı bir yol içeren Y şeklinde bir aparat kullanan test, ilk olarak Montgomery (1953) tarafından tanımlanmıştır (58). Bu düzeneğin, yerden yüksek, artı (+) işareti şeklinde düzenlenmiş, ikisi açık ikisi kapalı dört koldan oluşan versiyonu YAL'ın ilk prototipi olarak Handley ve Mithani (1984) tarafından önerilmiştir (59). YAL'ın farmakolojik, fizyolojik ve davranışsal bir test olarak sıçanlarda kullanımının validizasyonu 1 yıl sonra Pellow ve diğ. (1985) gerçekleşmiştir (60). Bu yazarlar, kemirgenlerin kaygı davranışlarının değerlendirilmesini, açık kollarda geçirilen sürenin kapalı kollarda harcanan süreye oranını kullanarak açıkladılar. Tipik olarak koşullu bir tepki oluşturan zararlı uyaranların (yani elektrik çarpması, yiyecek/su yoksunluğu, yüksek sesler, yırtıcı hayvan kokusuna maruz kalma, vb.) sunumuna dayanan kaygı yanıtlarını değerlendirmek için kullanılan diğer davranışsal analizlerin aksine, yükseltilmiş artı labirent kemirgenlerin içgüdüsel olarak karanlık, kapalı alanları tercih etme eğilimine ve koşulsuz yükseklik/açık alandan kaçınma eğilimlerine dayanır (61).

2.4.4. Açık alan (*Open-Field*) testi

Yaklaşık 40 yıl önce bir model olarak önerilmesinden bu yana açık alan (AA) testi, hayvan psikolojisinde en yaygın kullanılan deneysel araştırma düzeneklerinden biri haline gelmiştir. Popülaritesi muhtemelen büyük ölçüde aygıtın basitliğinden, iyi tanımlanmış davranışların kolay ve hızlı çözülmesinden ve bu davranışların genel kabul görmüş bir yorumundan kaynaklanmaktadır. Ayrıca, deneysel, fizyolojik ve farmakolojik manipülasyonlar ve standartlaştırılmış koşullar altında yeterince güvenilir ve geniş bir bağımsız değişken aralığında tekrarlanabilir ölçümler verir. Basitliği, uygulama ve değerlendirme kolaylığı gibi özellikleri de yaygın kabul görmesinin diğer nedenlerindendir (62; 63)

2.4.5. Yeni nesne tanıma (*Novel Object Recognition*) testi

Yeni bir nesne ya da yeni bir yer veya ortam gibi yeni durumlarla karşılaşmanın farelerde yaklaşma, ilgi gösterme davranışlarını ortaya çıkarabildiğine dair Berlyne tarafından 1950'de yapılan bir gözlemden yola çıkarak (64), 1980'lerin sonunda yeni bir davranış testi geliştirilmiştir: Yeni nesne tanıma testi (YNT) Test aynı seansta gerçekleştirilen iki oturumdan oluşur. İlk seansta (Alışma), deney hayvanı iki benzer nesneyi herhangi bir tanesini incelemekte özgürdür ve ikinci oturumda (Test), nesnelerden bir tanesi deney hayvanının, önceden tanımadığı yeni bir nesne ile değiştirilir. YNT, deney hayvanının bir dizi kuralı öğrenmesini gerektirmeyen tek denemelik bir görevden oluşur, pekiştirici gerektirmez ve tamamen kemirgenin tanıdık nesne yerine yeni nesneyi keşfetme konusundaki doğuştan gelen içgüdüsel tercihiyle dayanır. Böylece, tanıdık nesneyi hatırlayan bir kemirgenin, yeni nesneyi keşfetmek için daha fazla zaman harcaması beklenir (65). Ennaceur ve Delacour (1988), yeni nesne ve yeni yer tanıma testlerini inceleyerek bu testlerin, harici olarak uygulanan kuralların veya pekiştirmenin yokluğunda, öncelikle bir kemirgenin doğuştan gelen keşif davranışına dayanan basit davranışsal hafıza analizleri olduğu sonucuna vardılar (66).

Zamanla YNT, özellikle prefrontal korteks-aracılı çalışan bellek değişikliklerinin araştırılması için yaygın olarak kullanılan bir model haline geldi. Kemirgenlerde çalışan bellek, dikkat, kaygı ve yenilik tercihi ölçmek için yapılandırılabilir (67; 68). YNT, çeşitli farmakolojik tedavilerin ve beyin hasarının etkilerini test etmek için de kullanılmıştır (67). YNT'de hayvanların performansının değerlendirilme şekli de değişebilir. Her çalışmanın amacına göre ayırım (diskriminasyon) indeksi, genel alışma indeksi veya tercih indeksi gibi farklı indeksler kullanılabilir (66; 69-70). Hayvanlarda nesne tanımanın, yeni ve tanıdık nesnelerin keşif süresindeki farkla ölçülebileceğini not etmek önemlidir. Tanıma ölçüsü, yeni nesne ile harcanan süre ile örnek nesne ile harcanan süre arasındaki aralıktan ve ayrıca ilk denemede deney hayvanlarının örneği keşfetmesi için izin verilen süreden etkilenir. Bu test referans bir hafızadan tamamen bağımsız olmakla beraber, diğer primatlarda uygulanan görsel testlere benzeriğinden ötürü türler arası kıyaslama yapma olanağı sağlar. YNT temeli sıçanların spontan davranışlarına dayalı olduğu için sıçanlarda saf işlevsel hafıza testi olarak değerlendirilebilir (66; 71).

2.4.6. Porsolt zorlu yüzdürme testi (*Forced Swim Test*)

Zorlu yüzdürme testi (ZYT), 1978 yılında Porsolt ve meslektaşları tarafından antidepresan ilaçların etkililiğini değerlendirmek için kemirgenlerde model olarak geliştirilen davranışsal bir testtir (72). Detke ve diğ. (1996) ZYT'nin modifiye edilmiş bir versiyonunda, serotonerjik ve noradrenerjik antidepresan ilaçlar arasındaki ayrımı kolaylaştırmak için aktif davranışların yüzme ve tırmanmaya göre sınıflandırılmasını ekledi. Halen ZYT temel araştırmalarda ve potansiyel antidepresan tedavilerin taramasında yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca hayvan modellerinde depresif-benzeri davranışları değerlendirmek için en sık kullanılan testlerden biridir. ZYT prosedürünün basitliğine ve hassasiyetine rağmen, farklı gruplar arasında temel hareketsizlik oranlarında bile önemli farklılıklar olduğu bildirilmiştir (73), bu da çalışmaların sonuçlarının karşılaştırılmasını zorlaştırmaktadır. ZYT hakkında yayınlanan birkaç metodolojik makale ve incelemeye rağmen, prosedürü etkileyebilecek faktörlerin açıklığa kavuşturulması için ihtiyaç hala mevcuttur. ZYT prosedürünü etkileyebilen faktörler arasında hayvan ırkı, vücut ağırlığı, yaş, cinsiyet ve bireysel farklılıklar sayılabilmektedir (74).

ZYT'nin bu tez çalışması kapsamındaki davranış testleri arasına dahil edilmesinin gerekçesi, oluşturulan hiposmi/anosmi modelleri aracılığıyla, sıçanlar için hayati öneme sahip koku duyusunun kaybedilmesi ile depresyon-benzeri bir durumun gelişebilme ve bunun da değerlendirilen bilişsel performans üzerinde olumsuz bir bulandırıcı/karıştırıcı etki oluşturabilme olasılığıdır.

2.5. Elektrofizyoloji Deneyleri

Long-term potentiation (LTP) ilk olarak tavşan hipokampusünde Terje Lomo tarafından 1966 da keşfedilmiştir, genel olarak tetani olarak isimlendirilen yüksek frekanslı bir uyarı ile hipokampal eksitator sinapsların uyarılmasının hızlı ve uzun süreli (günlerce) sinaptik güçlenmenin görterilmesi günümüzde LTPnin altında yatan temel biyolojik değişikliklerin araştırılması veya davranışsal öğrenme ve LTP arasında nedensel ilişkilerin gösterilmesi revaçtadır (75; 76). Ana mekanizma presinaptik iletim ile postsinaptik iletim arasındaki kimyasan bağın güçlenmesine dayalı olmasına rağmen günümüzde hala LTP nin altında yatan mekanizma tam olarak anlaşılamamıştır, hipokampüste CA1 de bu süreç neredeyse tamamı ile NMDA reseptörleri ile gerçekleşmesine rağmen mossy fiberler ile CA3 arasındaki LTP NMDA reseptörlerinden bağımsızdır (77). Bu çalışmada LTP ile lateral perforan yolağa yerleştirilen elektrodlar aracılığı ile dentat gyrus stimüle edilerek öğrenme ve bellek elektrofizyolojik açıdan değerlendirilmiştir. Burada nöronlar arası bağlantının, sinaptik gücün sık uyarıma bağlı

güçlenmesi sözkonusudur. Öğrenme ve bellek işlevini değerlendirmek için canlı hayvanda tüm organizma olarak yapılması ekstrapole edebilmek açısından daha önemlidir. LTP korku duyusunun işlenmesinde de kritik öneme sahiptir. Morris su labirenti gibi uzaysal öğrenmeyi değerlendiren testlerde LTPnin rolü gösterilmiştir. Burada özellikle hippkampil NMDA reseptörlerinin önemi gösterilmiştir, beyinin CA1 bölgesi başta olmak üzere. Bu çalışmada koku duyusunun öğrenme-bellek üzerindeki etkisi değerlendirildiği için dentat gyrusta LTP etkisinin değerlendirilmesi tercih edildi. Lateral entorinal korteks ile dentat girus arasında gerçekleşen LTP nin NMDA bağımlı olması ve ketamine tarafından inhibe edildiği gösterilmiştir (78). Dentat girus kayıtları NMDA yı etkilemeyen üretan aneztezisi ile gerçekleştirilmiştir. Çalışmadaki davranış deneyleri sonuçları sonrası koku duyusunun korkuya bağlı öğrenme parametrelerinde oluşturduğu değişiklikten ötürü ileride LTPnin amigdalada da değerlendirilmesinin önem arz ettiğini düşünüyoruz.

RASYONEL: Bu tez çalışmasının rasyoneli literatürde nörodejeneratif hastalıklarla ilişkisi gösterilmiş olan anosminin nörodejenerasyon süreciyle ilişkisinin mekanistik olarak açıklanmasının ilgili hastalıkların tedavisine ve hastaların hayat kalitesi üzerine olumlu etki gösterme olasılığıdır. Olfaktör epitel hasarı ve sinirsel hasar aracılığıyla oluşturulan koku duyusu kaybı ile bilişsel performans arasındaki olası ilişkinin yönü ve gelişme süreci ile ipuçlarının elde edilmesi ileriki çalışmalar için yol gösterici olacaktır.

TEZİN ÖZGÜN DEĞERİ: Anosmi ile nörodejeneratif hastalıkların ilişkisi bilinmekle birlikte mekanizmanın açık olmaması ve ilişkinin yönünün (anterograd, retrograd, vb) ve sorumlu basamağın (olfaktör epitel, olfaktör sinir) henüz tam olarak bilinmemesi bu tez çalışmasının özgün yönüdür. Bilişsel performans ile koku kaybı arasındaki ilişkiye yönelik bir ipucunun bulunabilmesi nörodejeneratif hastalıklardan Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı, Huntington hastalığı, ALS gibi pek çok nörodejeneratif hastalığın tedavisine katkıda bulunacak kanıt sağlayabilecektir.

AMAÇ:

Bu tez çalışmasının amacı sıçanlarda farklı mekanizmalarla oluşturulan akut ve kronik anosmi modellerinde çeşitli nörokognitif işlevlerdeki olası değişikliklerin nöropsikofarmakolojik ölçütler aracılığıyla incelenmesidir. Bu tez çalışmasında sıçanlarda farklı mekanizmalarla anosmi/hiposmi oluşturan iki farmakolojik ajan, ZnSO₄ ve metimazol uygulanarak, sırasıyla olfaktör epitel hasarı- ile nöronal hasar-aracılı anosmi/hiposmi modelleri

oluşturmak ve çeşitli davranış testleri ile değerlendirilen bilişsel süreç ile koku duyusu kaybı arasındaki olası ilişkinin ortaya konabilmesi amaçlanmaktadır.

HİPOTEZ(LER):

- 1) Anosmi ğrenme ve bellek işlevi üzerine olumsuz etki oluşturur.
- 2) Anosmi ile oluşturulan olası öğrenme-bellek bozulması anosminin nöroanatomik zemini ile ilişkilidir.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu tez çalışmasında gerçekleştirilen *in vivo* ve *in vitro* deneylere Başkent Üniversitesi Tıp ve Sağlık Bilimleri Araştırma Kurulu ve Hayvan Deneyleri Etik Kurulundan onay alındıktan sonra başlandı (EK-1, onay tarihi ve proje no: 13.10.2020, DA20/16). Başkent Üniversitesi Araştırma Fonu'na desteklenen bu çalışma kapsamındaki ön-deneyler Başkent Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Merkezi bünyesinde Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı tarafından oluşturulan Davranış Laboratuvarı ve Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında gerçekleştirildi. Elde edilen ön-verilerin ışığı altında planlanan ileri elektrofizyolojik deneyler Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Elektrofizyoloji Laboratuvarında gerçekleştirildi.

Hayvan deneyleri çalışmaları Helsinki Deklarasyonu ve Amerikan Ulusal Sağlık Örgütü (USA-NIH) tarafından yayınlanan Laboratuvar Hayvanlarının Kullanımına ve Bakımına İlişkin Rehberine uygun olarak gerçekleştirildi. Hayvanlarda acı, ağrı, huzursuzluk oluşturacak her türlü müdahaleden kaçınmaya özen gösterildi.

3.1. Deney Hayvanları

Bu çalışmada, 217 ± 18 g ağırlığında, 6 haftalık, 18 adet erkek Wistar albino sıçan kullanıldı. Sıçanlar Başkent Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim Merkezi'nden temin edildi. Ortama alışmalarını sağlamak için deneylerin başlamasından 14 gün önce Başkent Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi Araştırma Ünitesi'ne getirilen sıçanlar, sıcaklığı ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) ve bağıl nemi ($32 \pm 7\%$) sabit, vantilatör ile havalandırılan, 12 saat aydınlık /12 saat karanlık döngüsü uygulanan bir odada, 6'şarlı gruplar halinde, standart sıçan kafeslerinde barındırıldı. Tüm gruplara *ad libitum* standart sıçan yemi ve musluk suyu verildi.

Anosminin yemek yeme davranışını ve iştahı etkileme olasılığını değerlendirebilmek için, sıçanların vücut ağırlıklarındaki değişim takip edildi.

Özellikle bu sıçan ırkının seçilmesinin nedeni, bu çalışmada oluşturulacak modelin bu ırktaki işlevselliğinin literatürdeki benzer çalışmalarda gösterilmiş olması, bu yaş grubunun seçilme nedeni ise incelenecek ölçütler göz önüne alındığında nörogelişimsel açıdan ve deneysel sürecin uzunluğu bakımından en uygun yaş dönemi olması, erkek cinsiyetin seçilmesinin nedeni ise dişilerdeki olası hormonal döngü değişkenliklerin incelenecek değişkenlere yapacağı olası etkinin dışlanmasıdır.

3.2. Kullanılan Madde Ve İlaçlar

%5'lik ZnSO₄ çözeltisi (Sigma Aldrich), Metimazol (Polifarma)

3.3. Kullanılan Malzeme Ve Gereçler

- Standard tip Iv (556 x 334 x 195 mm) sıçan kafesleri
- Barnes labirenti
- Morris su labirenti
- Açık Alan düzeneği
- Yükseltilmiş Artı Labirent
- Porsolt Zorlu Yüzdürme düzeneği
- Pasif Sakınma Düzeneği
- Stereotaksik çevre
- Grass Instrumens S4400 stimülatör
- Batıray, YSED headstage
- Kaldıray, YSED DC amplifikatör
- PowerLab/8sp, ADInstruments AD/DA dönüştürücü
- LabChart 7, ADInstruments dijital very kayıt ve işleme
- Logitech HD300 kamera
- Debut video capture yazılımı

3.4. Deney Grupları

Aklimizasyon sürecinde iken rastgele olarak 6'şarlı gruplara ayrılan ve her kafese ait farklı renkte (M: mavi, K: kırmızı, Y: yeşil) kuyruk boyası ile kodlandırılarak (#1-6) ayrı kafeslerde barındırılan sıçanlarda deney grupları oluşturulmadan önce dört ardışık gün boyunca uygulanan Barnes Labirentinde tüm sıçanların bazal uzaysal öğrenme-bellek performansları değerlendirildi. BL bulgularına göre iyi-orta-düşük performans olarak kategorize edilen sıçanlar, Tabakalı Rastgele Örneklem Yöntemi ile her deney grubu kendi içinde heterojen, gruplar arasında ise homojen olacak şekilde dağıtıldı. Buna göre bir deney grubu, normalde farklı kafeslerde barınmakta olan sıçanlardan oluştu. Böylece, aklimizasyon sonrası deney gruplarına rastgele ayrılma sürecinde yaşanabilecek kafes birleştirmesinden kaynaklanabilecek ve kafes içi alfa sıçan kaynaklı kavga, yaralanma vb olumsuz durumlar engellenmiş oldu. Sonuçta, Tabakalı Rastgele Örneklem ile belirlenen deney grupları Tablo 1'deki gibi oluştu:

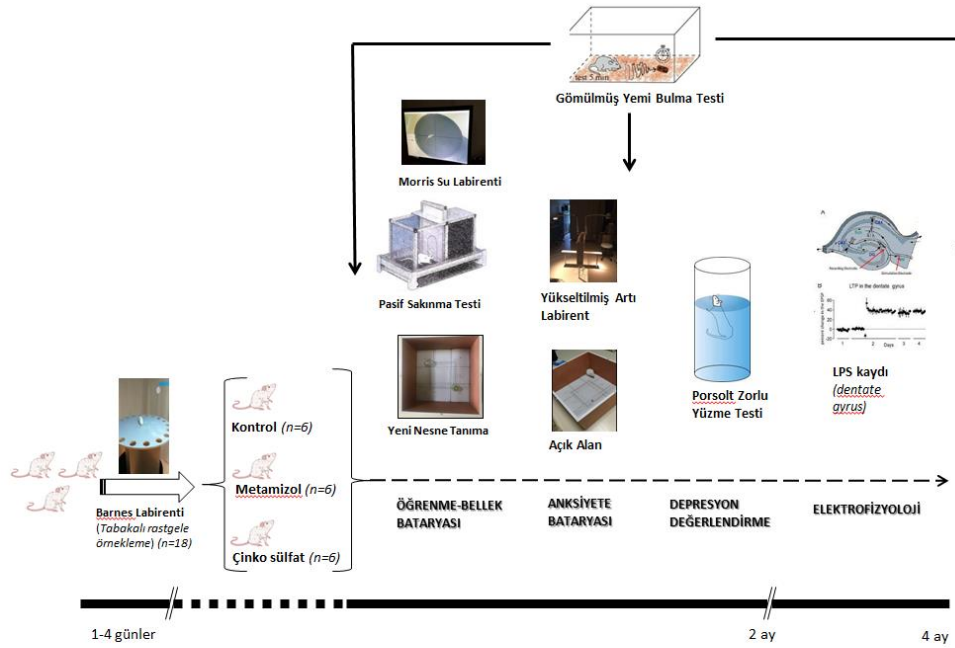
Tablo 1 Deney grupları

Tablo 1. Deney Grupları			
	KONTROL	METİMAZOL	ÇİNKO SÜLFAT
1	K1	K3	K2
2	K4	K6	M3
3	K5	M2	M4
4	M1	M6	Y3
5	M5	Y2	Y4
6	Y1	Y6	Y5

(K: kırmızı, M: mavi, Y: yeşil)

3.5. Deney Protokolü

DeneySEL tasarım ve akış şeması Şekil 3.1’de özetlenmektedir.



Deney Protokolü

Şekil 1. Deney Protokolü

3.6. Anosmi/ Hiposmi Modellerinin Oluşturulması

Bu çalışmada anosmi / hiposmi modellerinin oluşturulması için 2 farklı yöntem kullanıldı.

Akut anosminin değerlendirileceği birinci anosmi yönteminde st solunum yolu enfeksiyonlarında görülen mukozal harabiyet/kuruma şeklindeki koku duyusu kaybını taklit etmesi amacıyla inko Sülfat ($ZnSO_4$) ile nazal irrigasyon ile uygulandı. Bu uygulama için %5'lik $ZnSO_4$ zltisi, hayvanlara uygulanmadan hemen önce taze hazırlandı, haftada bir gün sıklığında ve aynı gün içerisinde de üçer saatlik aralıklarla 3 kez olacak şekilde uygulandı. İlk yöntemde uygulama için 100 l otomatik pipet ucu ısıtılarak uzatıldı. Pipet ucu 5 ml enjektör ucuna takıldıktan sonra, $ZnSO_4$ zltisi bu enjektör ile hayvan başına 3x5 mL hacimde olacak şekilde intranasal irrigasyon suretiyle uygulandı. Uygulama esnasında sıçanlar, kafaları işaret parmağı ve orta parmak arasında kalacak şekilde baş parmak ve yüzük parmağı ile de kolların altından kavranarak tutuldu. Irrigasyon işlemi esnasında hayvanlar yere yaklaşık olarak 45° açıyla tutularak irrigasyon sıvısının solunum sistemine kaçmasının engellenmesine zen gösterildi. Pipet ucu burun deliklerinden birine yerleştirilip irriğe edilirken diğer burun deliğinden solüsyon sıvısının tekrar dışarı akması sağlanarak yıkama yapıldı. Uygulamadan ortalama 48-72 saat sonra anosmi/ hiposmi gelişmesine neden olduğu bildirilen bu uygulamanın haftada bir tekrarlanması önerilmiştir (33;35-37;79-80).

Sıçanlarda anosmi/hiposmi gelişip gelişmediği, $ZnSO_4$ ile nasal irrigasyon uygulamasından 24 saat açlıktan sonra yapılan Yem Bulma Testi (*Burried Food Test*) ile değerlendirildi.

Nörodejeneratif hastalıklarda görülen koku kaybına daha büyük benzerlik gösteren ve olgun olfaktör nöron harabiyeti ile seyreden kronik anosminin değerlendirileceği ikinci anosmi yöntemi olarak ise intraperitoneal (*i.p.*) metimazol (300 mg/kg / 0,5 mL distile su) uygulaması ile bir model oluşturuldu.

Deney hayvanı boynu etrafından yukarıda tarif edilen şekilde tutulduktan sonra sırt üstü çevrilerek bilek üstünde yatırıldı ve sıçanın kuyruğu, tutan kişinin bilek etrafına dolanarak karın ön duvarının gerilmesi sağlandı. Stabil olarak tutulduğundan emin olunduktan sonra 1 mL'lik insulin enjektörü ile sağ alt kadranda inguinal ligament üzerinden yaklaşık 30 derecelik bir aı ile *i.p.* enjeksiyon yapıldı.

Bu uygulama ile oluşan anosminin geçici olduğu, oluşması yaklaşık 2-3 hafta sürdüğü ve 3-6 hafta içerisinde düzeldiği bildirildiğinden (41-42; 81) bu tez çalışmasında metimazol uygulaması üç haftada bir sıklıkta tekrarlandı.

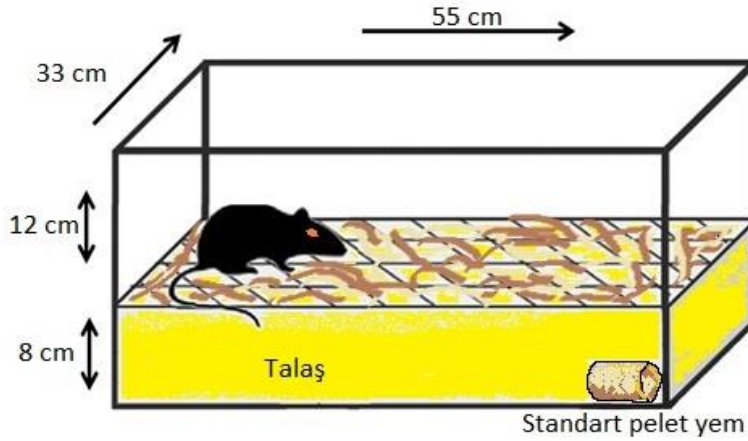
Bu çalışmada kronik anosmi modeli için tek doz metimazol (300 mg/kg *i.p.*) uygulamasından sonra, anosmi gelişimi 24 saat açlıktan sonra Yem Bulma Testi (*Burried Food Test*) ile değerlendirildi.

3.7 Bilişsel Testler

3.7.1. Yem bulma testi

Anosmi/ hiposminin değerlendirilmesi için gömülü yemi bulma testi kullanıldı. Bu testin amacı aç olan hayvanın kafesteki talaş altlık (*bedding*) içine önceden araştırmacı tarafından gömülmüş olan yemi, kokusunu takip ederek bulmasıdır. Deneyin başlangıcında koku duyusunun yerinde olduğunu, modeller oluşturulduktan sonra ise koku duyusunun işlevini kaybettiğini göstermek için kullanıldı. Literatürde bu test için hayvanın alışık olduğu standart yem kullanılması tavsiye edilmekte, sıçanın kokusuna aşına olmadığı yeni bir yem kullanılması önerilmemektedir (25; 43-45; 82-83).

Test ortamında süreç kafesler yerden 1 metre yükseklikteki masaya yerleştirildikten ve kafes alanı aydınlatıldıktan sonra müdahale etmeden odanın bir köşesinden izlendi. Bu test için her sıçana zaman üst sınırı olarak 15 dakika tanındı. Sıçanlar kafes içine bırakıldıktan sonra kronometre başlatıldı ve gömülü yemi bulma süresi kaydedildi. Yemi bulunduğu yerden çıkartma/yeme davranışı anosmi/hiposmi gelişmediği yönünde değerlendirildi, yemin bulunamaması ise sıçanın anosmik/hiposmik olduğu yönünde kanıt kabul edildi.



Şekil 2. Gömülü Yemi Bulma Testi için kullanılan standart tip Iv (556 x 334 x 195 mm) kafesin Şeması

Test uygulaması için standart tip Iv (556 x 334 x 195 mm) kafesin zemini taze talaş ile 8 cm yüksekliğe kadar doldurularak örtüldü ve yem her seferinde rastgele bir konum belirlenerek

gömüldü. Kaprofajiyi önlemeye yönelik özel zemin üzerinde 24 saat aç bırakılan sıçanlar yem bulma testi için kafesin ortasına yerleştirildi ve 15 dakikalık süre başlatıldı (Şekil 2). Deney sırasında koklama davranışı da gözlemlendi. Her sıçan için yeni bir kafes ve taze talaş kullanılarak önceki sıçanlardan kalması muhtemel kokusal ipuçları/karıştırıcı etkenler önleildi. Test için, sıçanların alışkın olduğu, tadını ve kokusunu bildiği, Başkent Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi'nde kullanılmakta olan standart sıçan pelet yemi kullanıldı.

3.8. Davranış Deneyleri

Davranış testleri Başkent Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Merkezi bünyesinde Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı tarafından kurulan Davranış Laboratuvarında gerçekleştirildi. Nörokognitif performansın değerlendirilmesi amacıyla çeşitli davranış testleri uygulandı; Barnes Labirenti, Morris Su Labirenti, Yeni Nesne Tanıma, Pasif Sakınma, Yükseltilmiş Artı Labirentve Açık Alan testleri uygulandı. Kognitif değerlendirmeden sonra ilaç uygulamaları ile testler tekrar edilip aralarındaki farklılıklar ve zamana bağlı gelişmeler belli aralıklarla değerlendirildi.

3.8.1. Barnes labirenti

Gömülü yemi bulma testi ile tüm hayvanların bazal koku duyularının normal olduğu gösterildikten sonra rastgele tabakalı dağılımın sağlanabilmesi için uzaysal hafıza/ bellek testlerinden BL uygulandı (Şekil 3). Barnes labirenti 140 cm yüksekliğinde, 120 cm çapında, tasarımı dış çerçesinde, eşit açılı aralıklarıyla yerleştirilmiş 8,2 cm çaplı 18 eşit adet delik bulunduran ve bu deliklerden birisinin altında, içinde talaş altlık döşeli bir güvenli kaçış odasının (*safe box*) bulunduğu bir düzeneştir. BL, hipokampus-aracılı uzaysal öğrenme-bellek performansını test etmek ve için kullanıldı. BL sürecinde, kuyruklarından nazikçe tutularak kafeslerinden alınıp 20 cm çapında, üstü kapalı opak bir silindir kutu içinde etrafı görmeleri engellenerek taşınmak suretiyle yavaşça platonun ortasına bırakılan sıçanların, deliklerden birinin altında bulunan güvenli odayı (*safe box*), etraf duvarlara daha önceden yerleştirilmiş bulunan görsel ipuçlarından (kare, 3 adet daire, üçgen ve boş) yararlanarak bulma süresi yani latans kaydedildi. Sıçan platforma bırakılır bırakılmaz deney odasından çıkıldı ve gözlem dışarıdan web kamera bağlantılı bir bilgisayar monitörü aracılığıyla gerçekleştirildi ve kayıt altına alındı. Araştırmacının odadan çıkmasının gerekçesi BL etrafındaki mevcut görsel ipuçlarına ek, karıştırıcı bir etken oluşturmanın önüne geçilmesidir. Hedefi 120 saniye içinde bulamayan sıçan başarısız kabul edilerek deney sonlandırıldı. Ardından, deney odasına yeniden

girilerek hedefi bulamayan sıçan el ile nazıkçe kaçış kutusuna yönlendirildi ve kutuyu bulması sağlandıktan sonra odadan çıkıldı ve sıçanın 15 saniye boyunca oriyante olması sağlandı.



Şekil 3. “Barnes Labirenti” düzeneği ve uygulama örneği

Deney esnasında alanın çevresi köşelere yerleştirilmiş 60 Watt’lık 4 adet lamba ile alttan aydınlatıldı. BL testi 4 ardışık gün yinelenerek öğrenme eğrileri elde edildi.

Her denekten sonra BL platformu önceki sıçandan kalan kokusal ipuçlarından arındırmak için önce %70 etanol, sonra su ile ıslatılmış bezler ile silindikten sonra kuru bez ile kurulandı. Güvenli kutuyu bulma süreleri kaydedilerek, tüm sıçanların performansları öğrenme eğrilerine göre skorlandı ve üç alt gruba (iyi, orta, kötü) ayrıldı. Bu gruplarda yer alan hayvanlar açık erişimli www.random.org web sitesi kullanılarak üç dengeli gruba randomize bir şekilde dağıtıldı (84). Ardından aynı uygulama ile tekrar randomizasyon yapılarak hayvanlar kontrol grubu, çinko sülfat grubu ve metimazol grubu olmak üzere deney gruplarına atandı.

3.8.2. Morris su labirenti

Uzaysal öğrenme-bellek performansını değerlendirmekte kullanılan diğer bir hipokampal kognisyon testi olan MSL bu amaçla yapılan en duyarlı testlerden birisidir. Sıçanın bir su tankının içindeki gizli platformu etraftaki görsel ipuçlarından yararlanarak bulması ve zaman içinde yerini öğrenmesi beklenir.

Belirlenen gruplarda anosmi modelleri oluşturulduktan sonra uzaysal öğrenme/ bellek performansının değerlendirilmesi için MSL test bataryası uygulandı. MSL 120 cm çapında, su derinliği 50 cm olan ve içerisi tamamen siyah boyanmış, silindir şeklinde bir düzenektir. İçerisine yerleştirilen 14 cm çapındaki kaçış platformu su seviyesinin 1 cm altındadır (Şekil 4). Deney esnasında havuz suyu sıcaklığı sabit ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$) tutuldu. Test alanında, deney odasının duvarlarına oryantasyon amaçlı görsel imleçler yerleştirildi, bunlar havuzun çevresinde birbirlerine 90 derece açı ile yerleştirilmiş, her kadranda bir şekil olacak şekilde üç daire, üçgen ve bayraktan oluştu, dördüncü kadrana bir imleç yerleştirilmedi (56).



Şekil 4. “Morris Su Labirenti Testi” düzeneği

Test esnasında havuz çevresi köşelere yerleştirilmiş 60 Watt’lık 4 adet lamba ile alttan aydınlatıldı. Deneklerin takibi tavana monte edilmiş bir kamera sistemi ile ayrı bir odadan yapıldı. Analizler çevrim-dışı (*off-line*) olarak kamera kayıtlarının izlenmesiyle gerçekleştirildi.

Test başlamadan bir gün önce hayvanlar ilk kez su ile karşılaşacakları için alıştırma amacıyla 30 saniye süreyle havuzda yüzdürüldü. Alıştırma gününü takiben aralıksız olarak dört ardışık gün eğitim (*training*), beşinci gün “prob” deneyi yapıldı. Eğitim protokolü için sağ alt kadranın orta hattında, havuz duvarından 35 cm uzaklığa kaçış platformu yerleştirildi. “Prob”

deneyine kadar kaçış platformunun yeri sabit bırakıldı. Eğitim protokollerinde her denek için aynı olacak şekilde hergün rastgele kombinasyonlarda hayvanlar her dört kadranda, başları havuz duvarına bakacak şekilde nazikçe suya bırakıldı. Zaman üst sınırı (*cut-off*) 120 saniye olarak belirlendi. Platformu bulamayan hayvanlar el ile nazikçe platforma yönlendirildi, oriyantasyon amacıyla platform üzerinde 15 saniye tek başına serbest bırakılan sıçanlar platformdan alınıp kurulandıktan sonra sıcak bir ortamda sıraları gelinceye kalan kendi kafeslerinin içinde bekletildi. Latans (kaçış platformunu bulma) değerlerinin saptanması için her hayvanın günlük her dört kadranda elde ettikleri latans skorlarının ortalaması alındı. Dört günlük sürecin sonunda, kaçış latansı (*escape latency*) değerlerindeki gelişmeye dayalı öğrenme eğrileri elde edildi. Beşinci gün gerçekleştirilen prob deneyi için kaçış platformu havuzdan çıkartıldı. Bu aşamada izlem süresi 1 dakika ile kısıtlandı ve sıçanların kaçış platformunun tam karşısındaki kadranda tek bir sefer suya bırakılmaları ile gerçekleştirildi. Prob deneyinde amaç, sıçanın eğitim (*training*) döneminde öğrenmiş olması beklenen kaçış platformunun yerini ne kadar hatırladığının gösterilmesidir. Sıçanın eskiden kaçış platformunun bulunduğu kadranda (hedef kadrana) ne kadar zaman geçirdiği, hedef kadrana ilk giriş zamanı gibi ölçütler kaydedildi. İzlem aşaması video kaydı üzerinden havuzun sadece ilgilenilen alanı görünür hale getirilerek gerçekleştirildi, hayvanın ilgili alanda bulunduğu süre esas alındı. Bellek presipitasyonunun değerlendirilmesi için 14 gün sonra “retansiyon” deneyi yapıldı. Tek gün yapılan bu aşamada eğitim seansında uygulanan protokol yinelenildi.

3.8.3. Yükseltilmiş artı labirent (*Elevated Plus Maze*)

Gruplar arasındaki anksiyete düzeyinde görülebilecek farklılıklar yükseltilmiş artı labirent testi ile değerlendirildi. YAL; yerden 1 metre yükseklikte, artı şeklinde, karşılıklı 2’şer adet açık ve kapalı kolları ve ortada açık bir santral alanı (kavşak) bulunan bir düzendir.



Şekil 5. “Yükseltilmiş Artı Labirent” uygulaması düzeneği

Kapalı kollar 40 cm yüksekliğinde duvarlar ile çevrilidir. Kolların genişliği 10 cm’dir ve açık kollarda kayıp düşmeyi engellemek için dış kenarlarda 0,5 cm’lik çıkıntılar mevcuttur (Şekil 5). Loş ortamda yapılan YAL testinde açık kollar 60 cm yükseklikten üzerlerine düşen 60 Watt’lık 2 adet beyaz ışık kaynağı ile aydınlatıldı. Deney süreci tavana monte edilmiş bir kamera sistemi ile takip edildi ve kayıt altına alındı.

YAL testi evrimsel süreçte besin zincirindeki pek çok predatörü için bir av olan sıçanların karanlık, güvenli alanlarda bulunmayı içgüdüsel olarak tercih etme ve anksiyete düzeyleri azaldıkça keşif yapmak, eş, yiyecek aramak, vb için açık alanlara çıkma eğilimlerine dayanılarak geliştirilmiş bir düzendir. YAL bulguları santral alanın (kavşak) kaç kez geçildiği, açık ve kapalı kollarda geçirilen süre gibi ölçütler ile değerlendirildi Hayvanlar düzeneğe

yukarıdan, yüzleri kapalı kola bakacak şekilde bırakılıp kamera ile takip edildiler. Deney süresi 180 saniye olarak belirlendi.

Her denekten sonra YAL düzeneği önceki sıçandan kalan kokusal ipuçlarından arındırmak için önce %70 etanol, sonra su ile ıslatılmış bezler ile silindikten sonra kuru bez ile kurulandı.

3.8.4. Açık alan testi (*Open Field Test*)

Anksiyete durumunun değerlendirilmesi için, duyarlılığı YAL testinden görece düşük olmakla birlikte, bu amaçla kullanılan bir diğer test de AA testidir. Uygun ek aparatların bulunması halinde lokomotor aktivite değerlendirmesi için de kullanılabilen AA düzeneği bu tez çalışmasında anksiyete düzeyinin değerlendirilmesi amacıyla kullanıldı. AA, boyutları 50 x 50 x 40 olan bir kutudan ve içindeki 12,5x12,5 cm boyutlarında 16 eşit kareye bölünmüş zeminden oluşturuldu (Şekil 6).



Şekil 6. Açık Alan Testi uygulaması

Bu tez çalışmasında kullanılan Açık Alan (AA) düzeneği siyah renkte ve tek parçadır, kamera kayıtları üzerinden sonradan dijital olarak grid eklemesi yapılarak değerlendirildi. AA

düzeneğinde ortadaki dört kare "orta alan" olarak tanımlandı. Hayvanın anksiyete düzeyi düştükçe orta alana çıkma frekansı ve orta alanda geçirdiği zaman artar.

AA testi ardışık 2 günde uygulandı. İlk gün sıçanlar 30 saniye süreyle düzenek içine bırakılıp ortama alıştırdılar, ardından hayvanlar alanın ortasına nazikçe bırakıldılar ve on dakika süre ile kamera yardımıyla izlendiler. Kamera kayıtlarından çevrim-dışı (*off-line*) olarak sıçanın orta alanda geçirdiği zaman ve dışkılama sayısı saptandı. Test aşaması 24 saat sonra gerçekleştirildi ve yukarıda belirtilen protokol yinelenildi. Kamera kayıtlarına dijital olarak grid eklenip açık alan giriş-çıkışları takip edildi. Zaman kronometre ile ölçüldü.

Dışkı sayımı her hayvan için deney sonunda alan temizlenirken yapıldı. Her sıçandan sonra AA düzeneği önceki sıçandan kalan kokusal ipuçlarından arındırmak için önce %70 etanol, sonra su ile ıslatılmış bezler ile silindikten sonra kuru bez ile kurulandı.

3.8.5. Yeni nesne tanıma testi (*Novel Object Recognition Test*)

Peririnal korteks işlevinin değerlendirmesi için kullanılır. Kare şeklinde eşit bölünmüş alanlara sahip olan bir haznenin dört köşesine yerleştirilmiş nesnelere maruz bırakılan sıçanın nesneleri tanımasından sonra, bir nesne değiştirildiğinde verdiği tepkiler değerlendirilir (Şekil 7).Yeni nesne tanıma testi kognitif fonksiyon değerlendirmek için kullanılan bir testtir, özellikle nesne tanıma/ hatırlama belleğine dair fikir verir. Test, kemirgenlerin spontan olarak yeni nesnelere, daha önceden tanıdıkları nesnelere oranla daha fazla zaman ayırma eğilimleri esas alınarak geliştirilmiştir. Yeni nesneyi daha çok keşfetme tercihi öğrenme ve anımsama hafızasını yansıtır. YNT açık alan düzeneğinde gerçekleştirildi.

Kullanılan nesnelerin yaklaşık olarak aynı ebatlarda, çok karmaşık olmayan basit nesneler olması tercih edilir. Sıçanların kırmızı-yeşil renk körü olması nedeni ile, nesne seçimi yapılırken kırmızı renkten kaçınıldı.

Bizim çalışmamızda sert plastikten üretilmiş, birbirinin aynı iki adet siyah silindir ve bir adet açık pembe renkli koni kullanıldı.



Şekil 7. “Yeni Nesne Tanıma Testi” düzeneği ve uygulaması

Nesneler kuzey yönü köşelerden 12,5 cm uzağa yerleştirildi. AA testinden sonra uygulandığı için bu test için alıştırma (habituasyon) safhasına gerek duyulmadı.

İlk gün birbirinin eşi olan nesneleri keşfetme ve tanımaları için sıçanlara 10 dakika süre tanındı ve nesnelerle ilgilenme süreleri saniye cinsinden kaydedildi. Nesne ile ilgilenme davranışının kriterleri sıçanın nesneye dokunması, temas etmesi, nesneyi koklaması, ısırması veya üstüne tırmanması şeklinde önceden tanımlandı.

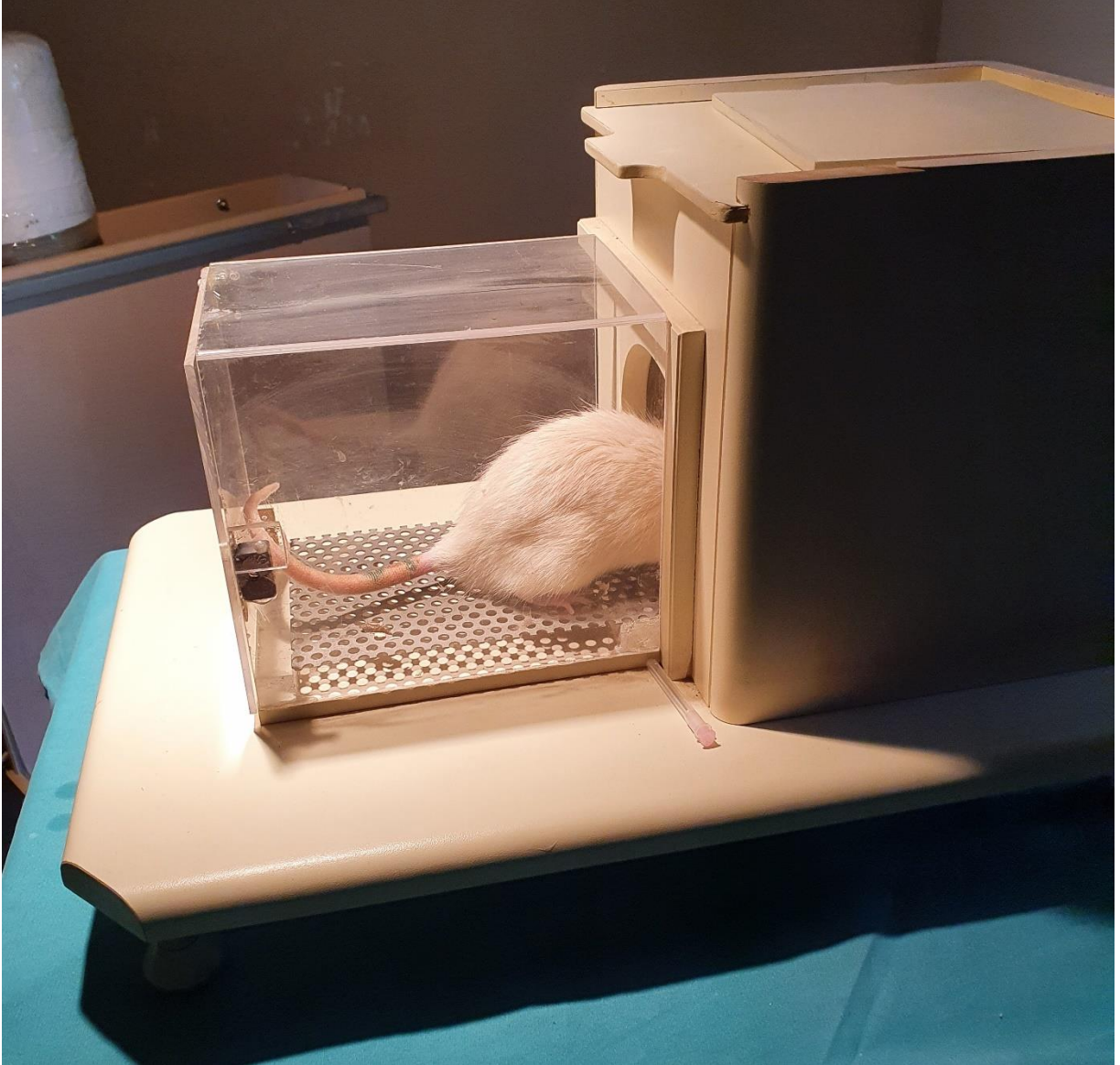
İkinci gün objelerden birisi çıkartılıp yerine yeni nesne yerleştirildi. Nesnelerin konumlarında bir değişiklik yapılmadı ve hayvanlara tekrar 10 dakika süre tanındı. Yeni ve eski nesnelere gösterilen ilgi süreleri kaydedildi, ayrıca her sıçan için aşağıdaki formülle hesaplanan diskriminasyon indeksi saptandı.

Diskriminasyon İndeksi = [Yeni Nesne ile İlgilenme süresi / (Her iki nesne ile toplam ilgilenme süresi)] x 100

Her sıçandan sonra YNT düzeneği önceki sıçandan kalan kokusal ipuçlarından arındırmak için önce %70 etanol, sonra su ile ıslatılmış bezler ile silindikten sonra kuru bez ile kurulandı.

3.8.6. Pasif sakınma (*Passive Avoidance*) testi

Pasif sakınma testi korkuya dayalı bir testtir ve kemirgenlerde özellikle amigdala/limbik sistem-aracılı öğrenme-bellek performansının değerlendirilmesi için kullanılır. Bu testte, deneklere aversiv (itici) bir stimölasyon uygulanır (ayaktan elektroşok) ve uygulama yapılan ortamdan kaçınmayı öğrenmesi beklenir.

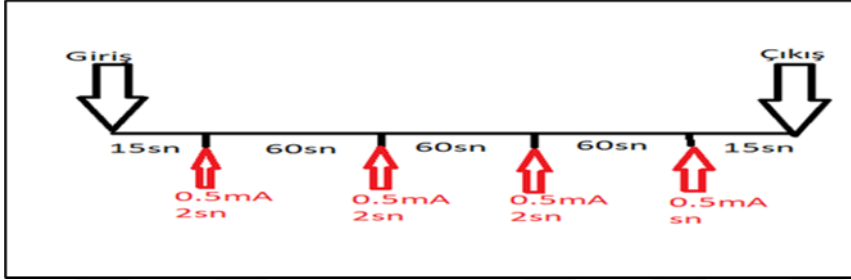


Şekil 8. Pasif sakınma Testi uygulaması

Pasif Sakınma Test (PST) düzeneği, ortasından bir kapı ile ayrılmış, bir yarısı aydınlık diğer yarısı karanlık iki odadan oluşturuldu. İletken bir metal ızgaradan oluşan zemin karanlık alan ile aydınlık alan arasında birbirinden bağımsızdı. Yalnızca karanlık alandaki zemin stimölatöre bağlandı. Stimölator (Micro Medical Electronic; MME Stimulator) aracılığıyla

kapalı odanın altındaki metal ızgara zemine 0,5 mA, 2 saniye süren, 50 Hz, 1 dakika intervallerle uygulanan 4 tek elektriksel uyarı uygulandı (Şekil 8)

Üç gün süren bir test bataryası olan PST uygulaması kapsamında; birinci gün sıçanlar düzeneğe aydınlık taraftan nazıkçe bırakıldı ve 30 saniye boyunca tüm alanı serbestçe keşfetmelerine müsaade edildi (Şekil 9).



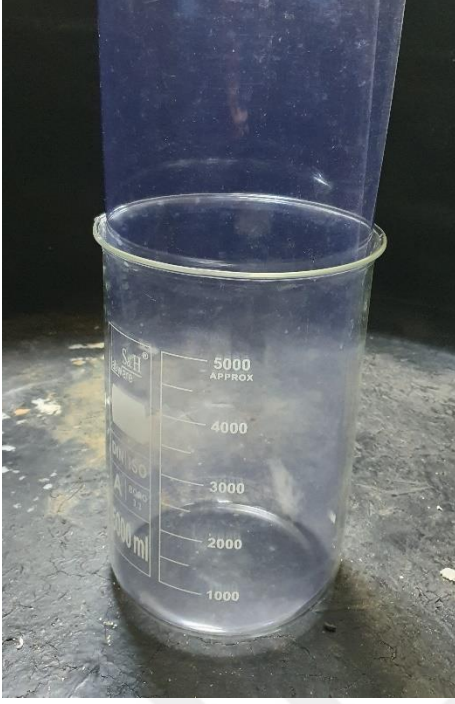
Şekil 9. Pasif Sakınma Testi uygulama şeması

İkinci gün, hayvanlar ilk gün olduğu gibi aydınlık alana bırakıldılar, karanlık alana geçtikleri anda kompartmanın kapısı kapatıldı ve birer dakikalık intervaller ile 4 kez elektroşok uygulandı.

Üçüncü gün, deney 60 saniye süre ile sınırlandırıldı ve karanlık alana geçişten kaçınma süresi/ latans gözlemlendi. Süre kronometre ile ölçüldü. Normal öğrenme/bellek fonksiyonlarına sahip sıçanların tekrar aydınlık alana bırakıldıklarında karanlık alana geçmekten sakınmalarının beklendiği PST deneyinin üçüncü gününde incelenen ölçüt bu fenomendeki değişiktir. Her sıçandan sonra PST düzeneği önceki sıçandan kalan kokusal ipuçlarından arındırmak için önce %70 etanol, sonra su ile ıslatılmış bezler ile silindikten sonra kuru bez ile kurulandı.

3.8.7. Porsolt zorlu yüzdürme (*Forced Swim*) testi

Sıçanlarda koku yitimine bağlı olası depresyon-benzeri davranışın değerlendirmesinde kullanıldı. Sıçanın ayaklarının zemine temas etmeyeceği yükseklikte su ile dolu olduğu silindir şeklinde şeffaf bir su tankında (Şekil 10), gerçekleştirilen ZYT uygulamasında suya bırakılan ve dışarı çıkması mümkün olmayan sıçanın 15 dakika boyunca yüzmesine izin verildi, 24 saat sonra aynı düzeneğe bırakılan sıçanın 5 dakika içindeki hareketsiz kaldığı süre ölçülerek, bu süresinin artması depresyon-benzeri davranış (*öğrenilmiş çaresizlik*) göstergesi olarak kabul edildi.



Şekil 10. “Porsolt Zorlu Yüzme Testi” düzeneği

3.9. Elektrofizyoloji Deneyleri

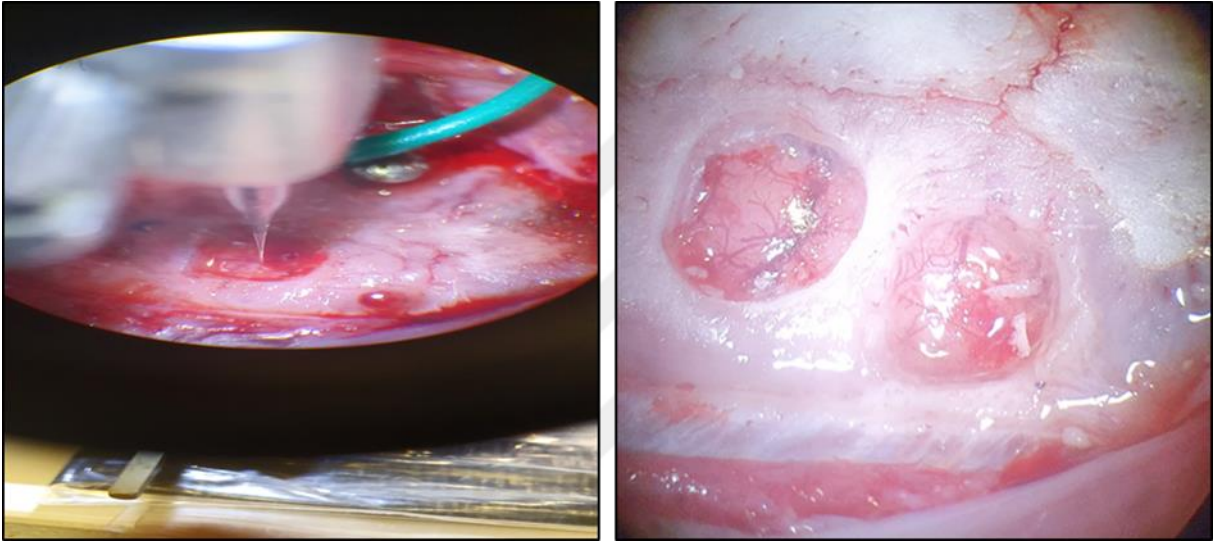
Deney hayvanlarına uygulanan davranış çalışmalarında elde edilen bulguların anlamlı olması nedeniyle ileri elektrofizyolojik deneyler gerçekleştirildi. Bu deneyler Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalında Prof. Dr. M. Yıldırım Sara laboratuvarında ve onun gözetiminde gerçekleştirildi.

3.9.1 “Long term potentiation” (LTP)

Koku duyusu olfaktör reseptörler tarafından gelen uyarıyı olfaktör sinir aracılığı ile bulbus olfaktoriusa taşır, bulbusta işlenen uyarı olfaktör yolak ile medial ve lateral olfaktör alana bölünerek iletilir. Medial olfaktör alan hipotalamus ve limbik sistemi uyarır, bu yolak koku duyusunun emosyonel ve motivasyonel kısmını oluşturur. Lateral olfaktör alan da uyarı ikiye bölünür prepiriform korteks, piriform korteks ve amigdalaya giden yolak hipokampüse ve talamusa giden yolak orbitofrontal kortekse iletim yapar. Talamus bilinçli koku algısını yönetir. Bu çalışmada lateral olfaktör yolağın hipotalamusa giden dalları incelenmiştir, lateral perforan yolak koku hafızasında yer aldığı hipotalamik iletimden sorumludur ve dentat girus koku duyusunun işlendiği primer bölgelerden birisidir. Olfaktör reseptörlerden gelen duyu lateral perforan yolak ile primer olfaktör kortekse taşınmaktadır. Çalışma sürecinde yer alan davranış deneylerinin primer olarak işlendiği bölgenin hipokampus olması nedeni ile, bu alanda

elektrofizyolojik olarak sinaptik güçlenmede/ eksitator postsinaptik potansiyel (EPSP) kayıtları alındı.

LTP kayıtları hayvanlar ürethan anestezisi (1.2mg/kg) altına alınarak gerçekleştirildi. Anestezi sonrası stereotaksik çerçeveye yerleştirilen hayvanların skalpları ortahat insizyon ile açıldı. *Bulldog* klempler ile cilt yanlara doğru açıldıktan sonra, eküvyon çubukları ile periost sıyrıldı. Bregma ve lambda yükseklikleri seviyelendirilip kafanın paralel olması sağlandıktan sonra lateral perforan yolak ve dentat gyrusun bulunduğu alanlara *drill* yardımı ile pencereler (*burrhole*) açıldı. Sol parietookspital bölgede topraklama için başka *burrhole* açılarak buraya bir vida yerleştirildi (şekil 11).

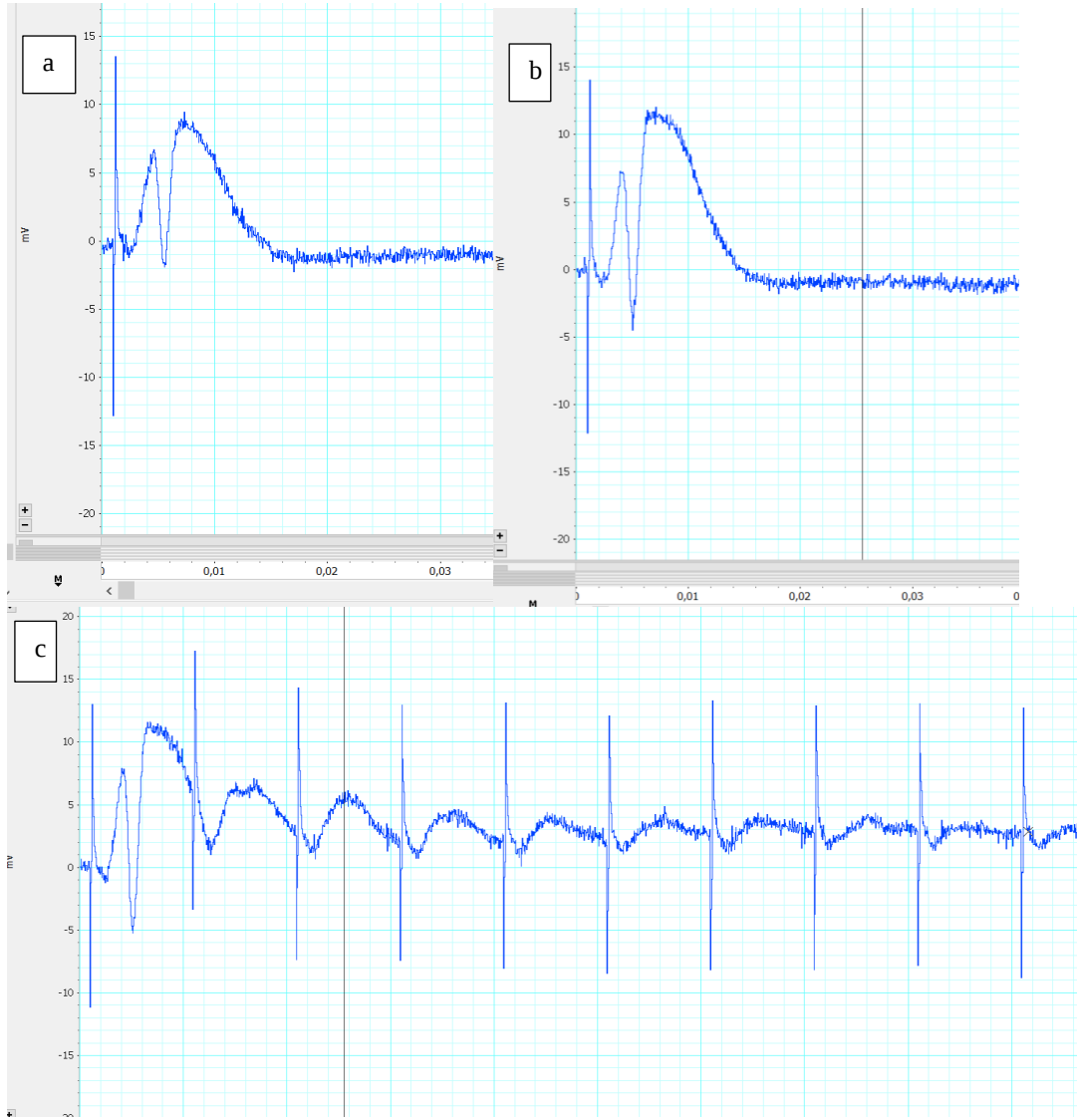


Şekil 11. LTP kayıtlarının alınması için lateral perforan yolak ve dentat gyrusun açılması

Sol tarafta: Mikroskop altında yeşil kablonun bağlı olduğu vida toprak hattı, ön tarafta parietal kemikteki pencereden lateral perforan yolağa giren cam kayıt elektrodu: sağ taraf: Sırası ile parietal bölgede kayıt elektrodu için açılan perncere, parietookspital bölgede stimülasyon elektrodu için açılan pencere.

Davranış deneylerinin sonuçlarını elektrofizyolojik olarak teyit etmek için dentat gyrus stimülasyonu ile lateral perforan yolaktan LTP kaydı alındı (Şekil 12) (85).

Koordinatlar Paxinos Sıçan Beyin Atlasına göre belirlendi. Cam kayıt elektrodu içerisine çamaşır suyu içerisinde oksitlenmiş gümüş elektrod yerleştirilip lateral perforan yolağa yerleştirildi. Koordinatlar: PA:-3,8; L:2,3; H:2,7-3,2mm). Bipolar stimülasyon elektrodu dentat gyrusa yerleştirildi (Koordinatlar: PA:-8,1; L:4,3; H:3,2mm, Standart LTP protokolü uygulandı, 15 dk bazal (*baseline*) kayıt, birer dakika ara ile 3 kez 1 saniyelik 100Hz'de stimülasyon ile LTP indüksiyonunu takiben 1 saatlik kayıt yapıldı (Şekil 12).



Şekil 12. Lateral perforan yolaktan alınan LTP kaydı örnekleri

a: baseline EPSP; b: LTP uygulaması sonrasında elde edilen EPSP; c: stimülasyon sırasında elde edilen EPSP.

3.10. TSH Ve fT4 Düzeyleri Ölçümü:

Metimazol'ün asıl tiyoamid grubu bir antitiroid ilaç olması nedeniyle, sıçanlarda hipotiroidi oluşturmuş olma ihtimalini ekarte edebilmek için, her gruptan rastgele seçilen örneklerle tiroid hormonlarının ve TSH, kan düzeyleri ölçüldü.

Serum TSH vs fT4 seviyelerinin ölçümünde ELİSA kitleri kullanıldı (BT LAB, Zheijang, Çin, E0180Ra, E0735Ra). BT LAB kitleri katı faz sandviç ELİSA tipi kitler. Teste özgü monoklonal antikorlar kuyucukların duvarına kaplandıktan sonra, kit içerisindeki standartlar ve örnekler pipetaj ile kuyucuklara yüklenip ve assayler üreticinin gönderdiği talimatlar doğrultusunda gerçekleştirildi. Sonuç değerlendirmesi için 450 nm de microplate okuyucu(Bio-Tek Instruments INC.ELX 800, USA) ile yapıldı. Değerlendirilen örneklerin TSH ve fT4 seviyeleri normal aralıkta oldukları için sıçanlar ötiroid kabul edildi.

3.11. İstatistiksel Analiz:

İstatistiksel ön-değerlendirme Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik Anabilim Dalı uzmanları ile birlikte gerçekleştirildi. Kullanılması gereken deney hayvanı sayısı güç analizi ile belirlendi. Veriler ortalama $\pm$ ortalamanın standart hatası olarak belirtildi. Verilerin normal dağılıma uygunluğu test edildi, parametrik varsayımların doğrulanması halinde gruplar arası farklılıklar için iki yönlü ANOVA ve ilgili post-*Hoc* testler, doğrulanmaması halinde ise Kruskal-Wallis ve ilgili post-*Hoc* testler kullanıldı. $P < 0,05$ istatistiksel olarak önemli kabul edildi. Grafler Grafpad 8.0 yazılımı yardımı ile yapıldı.

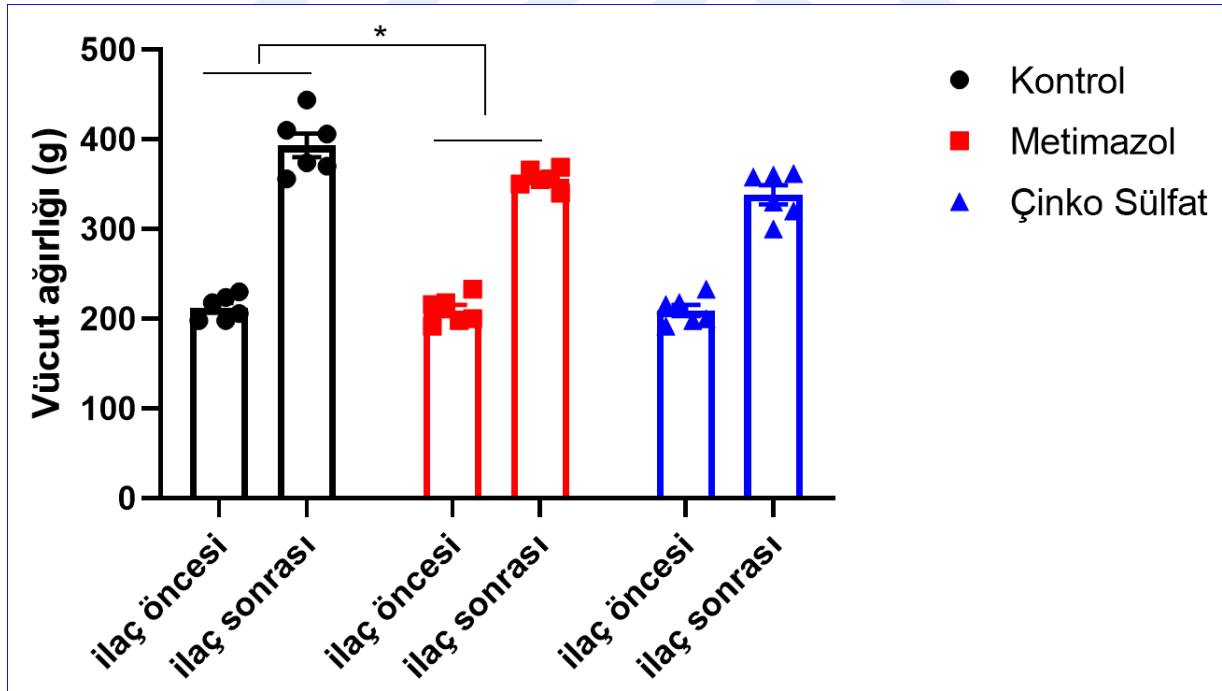


4. BULGULAR

4.1. Deney Hayvanlarında Vücut Ağırlığı İzlemi

Koku duyusunun kaybının hayvanların yeme alışkanlıkları ve iştahları üzerindeki etkisinin değerlendirilebilmesi amacı ile hayvanlar anosmi modellerinin oluşturulma tarihinden itibaren 4 ay boyunca tartıldı. Beklenildiği şekilde kontrol grubunda vücut ağırlıkları $86,2 \pm 9,4$ (181 g) artarken, anosmi oluşturulmuş gruplarda vücut ağırlığı artışı Metimazol grubunda $70,3 \pm 5,86$ (146,5 g) ve Çinko Sülfat grubunda $61,6 \pm 3,18$ (127,6 g) olarak saptandı.

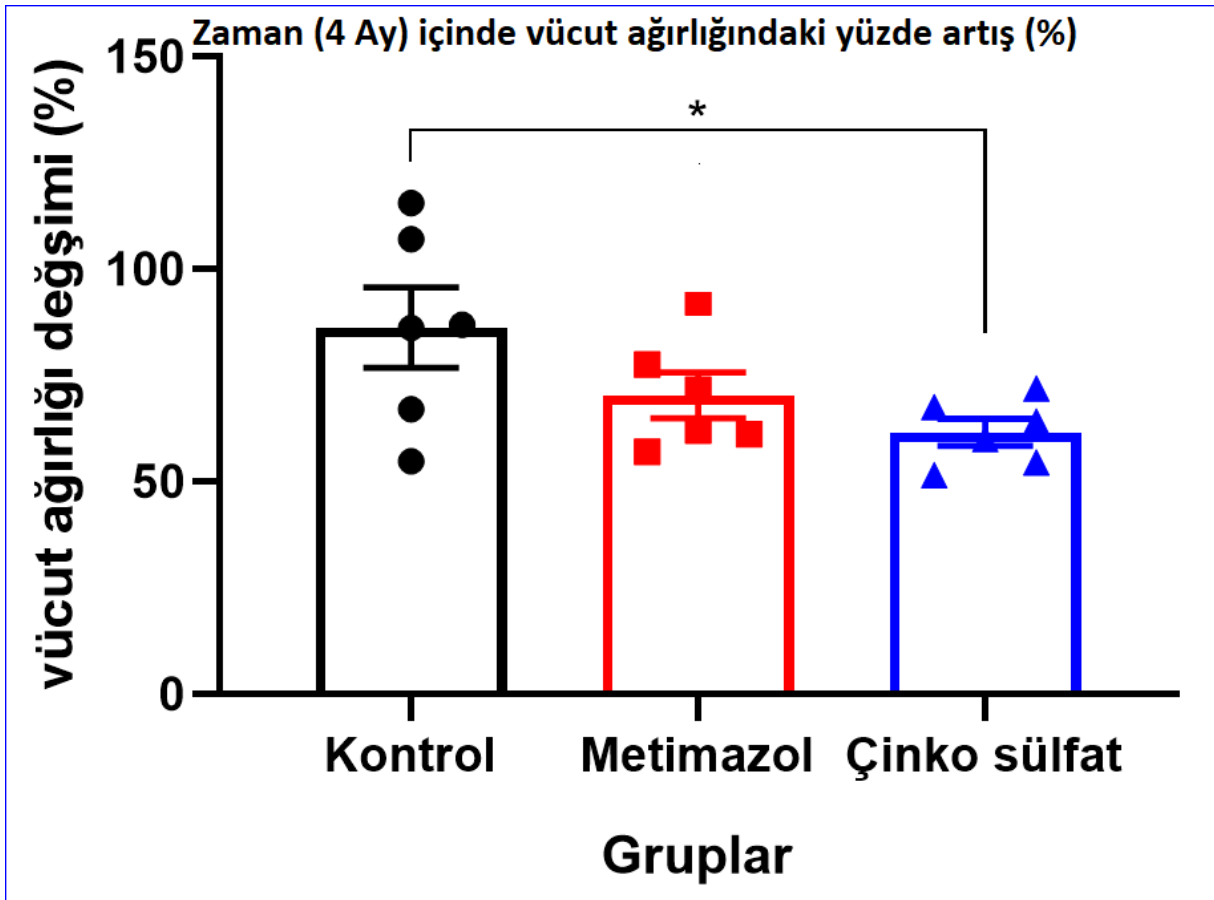
Veriler normal dağıldığı için ağırlığın zamanla değişimi analizi için iki yönlü anova testi kullanıldı. Zamanla ağırlık değişimi analizi sonucunda $p=0,0142$ ve $F(2, 15)=5,726$ hesaplandı. Anlamlı fark dolayısıyla posthoc analiz yapıldı. kontrol-metimazol için adjusted $p=0,0893$; kontrol-çinko sülfat için adjusted $p=0,0130$ ve metimazol-çinko sülfat için adjusted $p=0,5854$ bulundu. Anlamlı olarak çinko sülfat grubunun kontrol grubuna kıyasla daha az kilo aldığı belirlendi. (Şekil 13).



Şekil 13. Vücut Ağırlığındaki Artış; Kontrol grubu ile Metimazol grubu arasındaki değişim istatistiksel olarak anlamlı (* $p=0,0893$), Kontrol vs Çinko Sülfat istatistiksel olarak anlamlı ($p=0,0130$); Metimazol vs Çinko Sülfat arasında anlamlı bir fark saptanmadı ($p=0,5854$). Her grup için $n=6$.

Kilo alma yüzdesi şeklinde tek yönlü anova analizine çevrildiğinde ise normallik analizi hem shapiro wilk hem de kolmogorov smirnov testi ile yapıldı. Çünkü çok yakın sonuçlar ile

sınırdıydı. Sonra yapılan kruskal wallis testi p değeri 0,1252 ile anlamsız iken gruplar arasındaki fark için yapılan tek yönlü anova testinde $p=0,0499$ bulundu. İstatistiksel anlamlı değerlendirildi ve yapılan posthoc analizde kontrol-çinko sülfat arasında sadece anlamlı fark bulundu. $p=0,0431$ ile sınıra oldukça yakın bulundu. Vücut ağırlığındaki yüzde değişim Kontrol ve anosmi grupları arasında anlamlı fark gösterdi, Metimazol için $356 \pm 5,3\text{gr}$; Çinko Sülfat grubu için $338,3 \pm 10,74\text{gr}$ ve Kontrol grubu $393,3 \pm 13,31\text{gr}$, grupların vücut ağırlığındaki mutlak değişim ise Kontrol ile Çinko Sülfat arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu saptandı ($p=0,0431$; Kontrol $393,3 \pm 5,3\text{gr}$ vs Çinko Sülfat $338,3 \pm 10,74$) (Şekil 14).



Şekil 14. Vücut ağırlığındaki artış yüzdesi

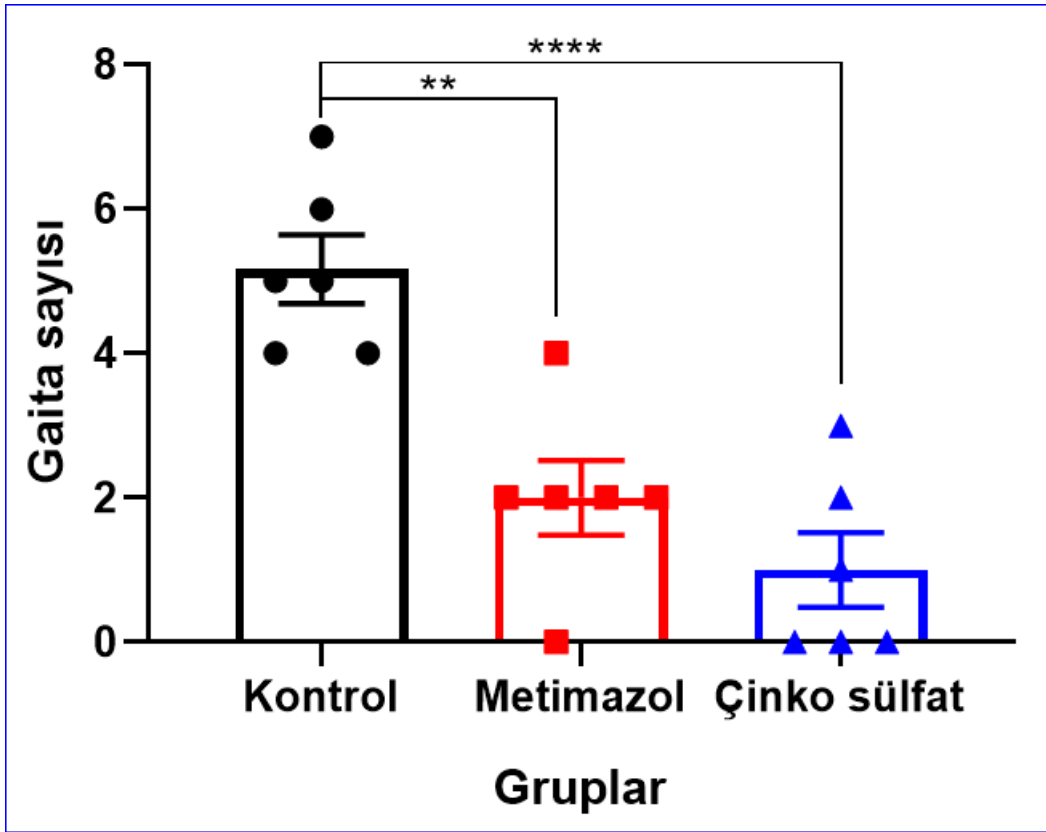
Yüzde olarak vücut ağırlığındaki değişim Kontrol vs Çinko Sülfat için $p=0,431$. Her grup için $n=6$.

Kilo alımındaki değişikliklerin anosmiye bağlı olduğu düşünüldü, olası ihtimaller

- Depresyon gelişmesi → Zorlu yüzdürme testi ile ekarte edildi
- Metabolizma hızlanması → TSH ve tiroid fonksiyon testleri ile ekarte edildi
- İştah azalması

4.2. Deney Hayvanlarının Defekasyon sayıları

Sıçanlarda anksiyete göstergesi olarak kabul edilebilen, hayvanın yeni bir ortama girdiğindeki dışkılama sayısı, anksiyetenin değerlendirildiği korku-motivasyonlu öğrenmenin değerlendirildiği PST düzeneklerinde incelendi (Şekil 15).



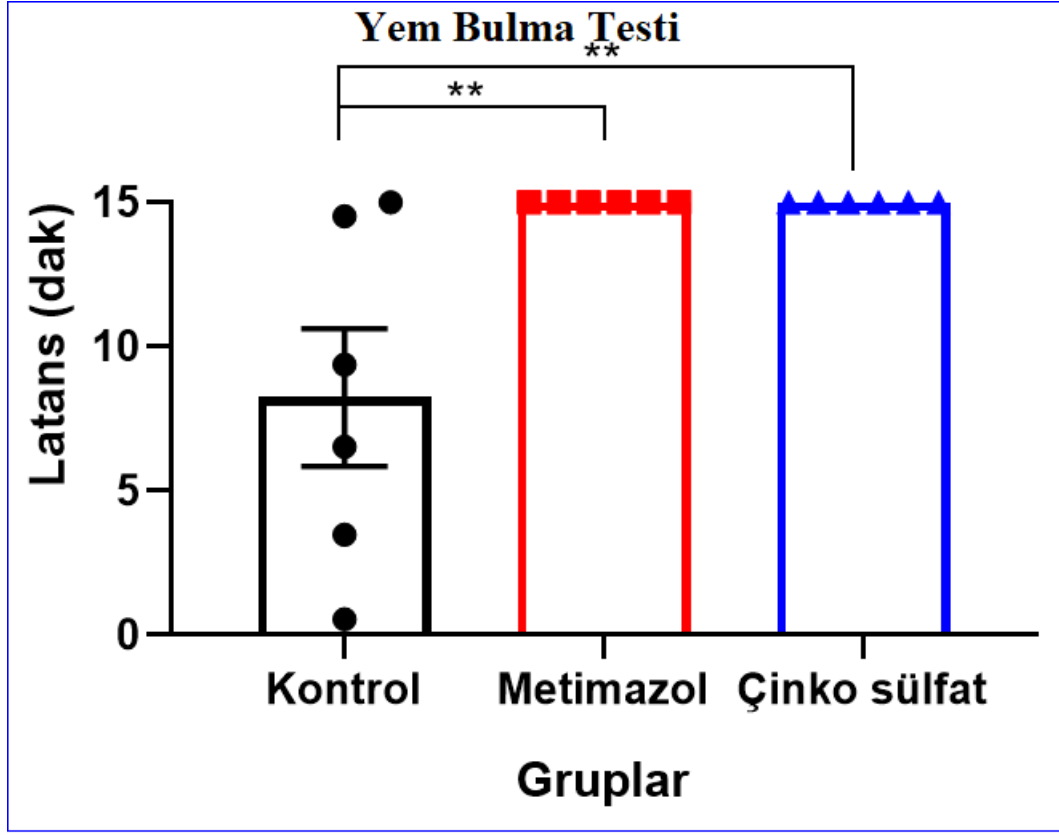
Şekil 15. Pasif Sakınma Testi sırasındaki ortalama dışkılama sayıları: SPSS ile normallik analizi yapıldı. Shapiro wilk testi yapıldı. $p=0,177$ olduğundan normal dağıldığı düşünüldü. One way anova sonucu $p<0,0001$ ve $F=18,65$. Multiple comparison yani posthoc test sonuçlarına göre kontrol-metimazol adjusted $p=0,0013$ ve kontrol-çinko sülfat adjusted $p<0,0001$. Her grup için $n=6$.

4.3. Bilişsel testler

4.3.1. Yem bulma testi bulguları

Deneylerin başlangıç aşamasında sıçanlarda koku duyusuna yönelik herhangi bir farmakolojik müdahalede bulunulmadan önce tüm hayvanlarda bazal koku duyularının işlevselliği test edildi. Bu ilk YBT seansında tüm sıçanlar gömülü yemi kendilerine tanınan süre içinde bulabildiler (Kontrol grubu $7,7\pm1,78$ dakika, metimazol grubu $9,3\pm1,89$ dakika ve çinko sülfat grubu $6,1\pm1,99$ dakika). Anosmi modelleri oluşturulduktan sonra test 1. ayda tekrarlandı Kontrol grubu ortalama $8,5\pm2,39$ dakikada yemi bulurken diğer gruplar verilen süre zarfı içerisinde gömülü yemi bulamadılar (her iki anosmi grubu için 15 ± 0 dakika; $p<0,005$ vs Kontrol. Deneylerin ikinci ayında tekrarlanan YBT de benzer bulgular sağladı, Kontrol grubu ortalama $8\pm0,92$ dk içinde yemi bulurken, Metimazol grubu verilen süre zarfı içerisinde yemi bulamadı, Çinko Sülfat grubunda ise yalnızca bir sıçan yemi bulabildi (Y3: $12,03$ dk'da yemi buldu ancak tanınan süre zarfında yemi tüketmedi). Her 2 grupta kontrol grubu arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğu saptandı ($8\pm0,92$ vs 15 ± 0 ve $14,75\pm0,49$ sn; $p<0,001$ vs

Kontrol). YBT bulguları bu tez çalışmasında oluşturulan anosmia/hiposmi modellerinin gerçekleştiğini doğruladı ve oluşturulan anosmi modelleri geçerli kabul edildi (Şekil 16).



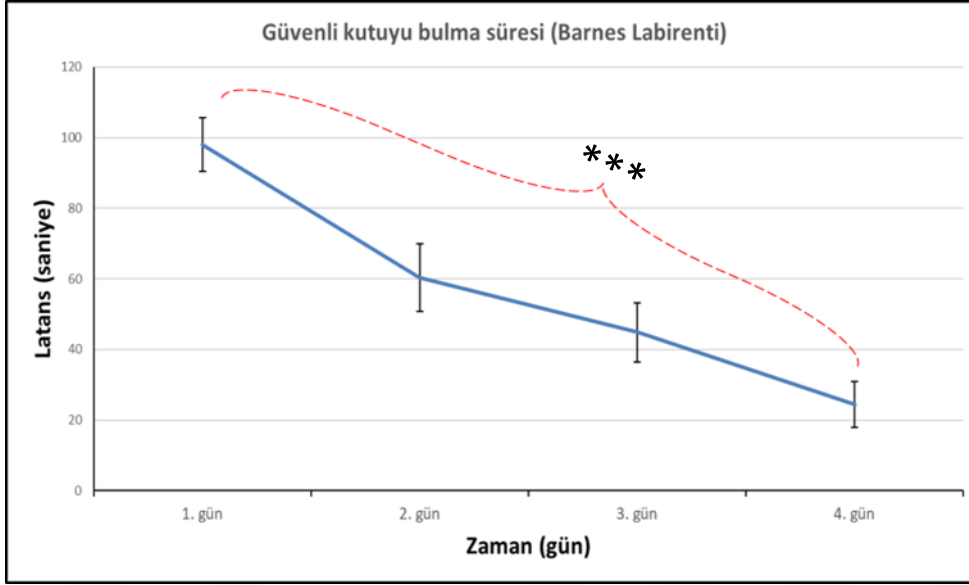
Şekil 16. Sıçanlarda Yem Bulma Testinde performansın karşılaştırılması

SPSS ile normallik analizi yapıldı. Shapiro wilk testi yapıldı. $p < 0,001$ olduğundan normal dağılmadığı düşünüldü. Kruskal wallis test sonucu $p = 0,0021$ ve $\chi^2 = 12,64$. Multiple comparison yani posthoc test sonuçlarına göre kontrol-metimazol adjusted $p = 0,0062$ ve kontrol-çinko sülfat adjusted $p = 0,0062$. Her grup için $n = 6$.

4.4. Öğrenme-Bellek İşlevini Değerlendirmeye Yönelik Davranış Deneyleri

4.4.1. Tüm sıçanlarda bazal uzaysal öğrenme-bellek performansı (Barnes Labirenti) bulguları

BL deney bataryası sıçanları deney gruplarına tabakalı rastgele örnekleme yöntemi ile bias oluşturmayacak şekilde dağıtabilmek amacıyla anosmi modelleri uygulanmadan önce gerçekleştirildi. Tüm hayvanlarda uzaysal öğrenme-bellek performansındaki gelişme istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Şekil 17). Sıçanlar iyi, orta ve zayıf performans gösterenler olacak şekilde üç tabakaya ayrıldı, ardından rastgele olarak 3 gruba dağıtıldıktan sonra, bu gruplar da rastgele olarak deney grupları olarak atandı.

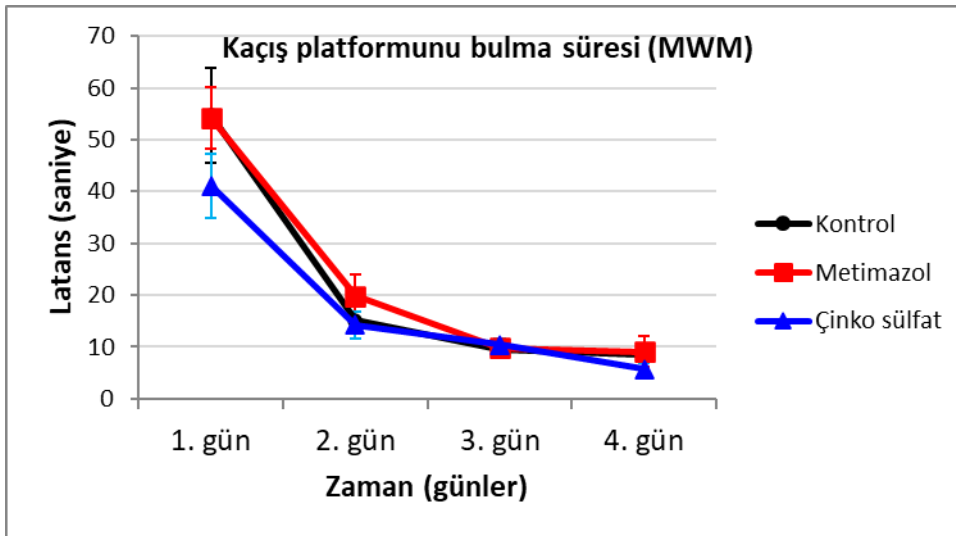


Şekil 17. Sıçanlarda Bazal Uzaysal Öğrenme-Bellek Performansının değerlendirilmesi

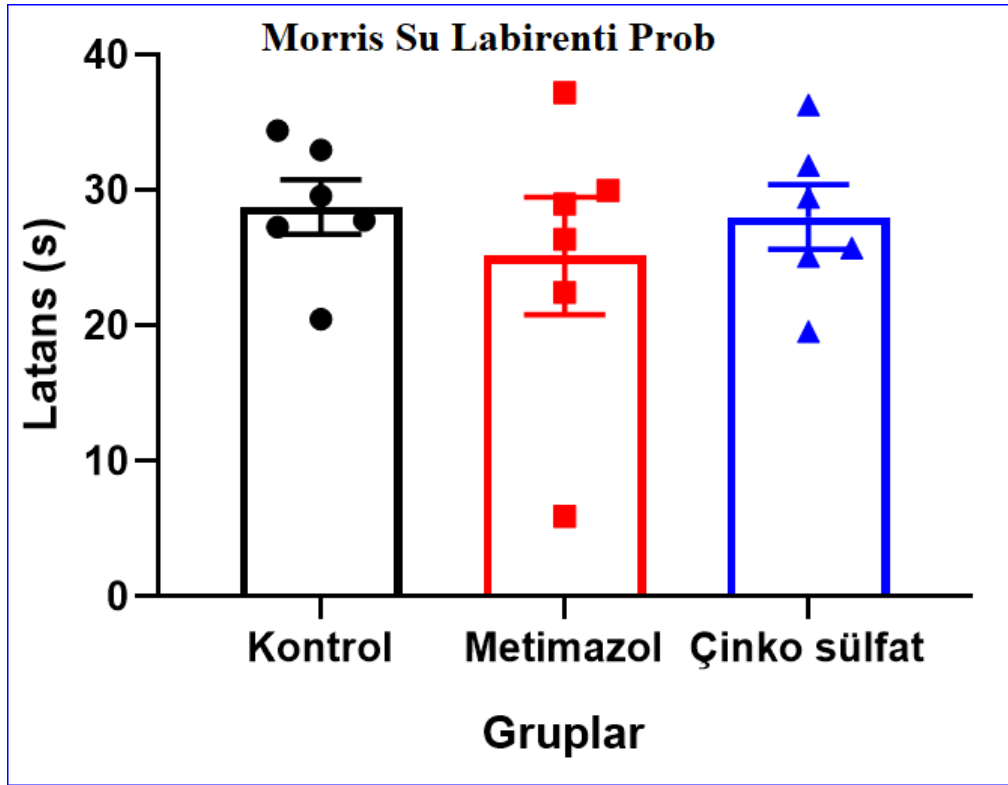
* Bazal değerlendirme ve tabakalı rastgele örnekleme için tüm deney hayvanlarında yapılan ön test, *** $P < 0,0001$, Tekrarlayan ölçümler için ANOVA. $n=18$.

4.4.2. Uzaysal öğrenme-bellek performansı (Morris su labirenti) bulguları

MSL testinde 4 günlük eğitim sürecinde bütün grupların anlamlı öğrenme performansı gösterdiği ve kaçış platformunu bulma zamanlarının anlamlı şekilde geliştiği gözlemlendi, ancak gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı (Şekil 18). Beşinci gün yapılan prob deneyde kaçış platformu uzaklaştırıldıktan sonra hedef kadranda geçirilen süre (Şekil 19) ve 20'nci gün yapılan retansiyon testinde hedef platformda geçirilen süreler anlamlı bir şekilde öğrenme olduğunu gösterirken gruplar arasında uzaysal öğrenme açısından anlamlı bir fark saptanmadı (Şekil 20).

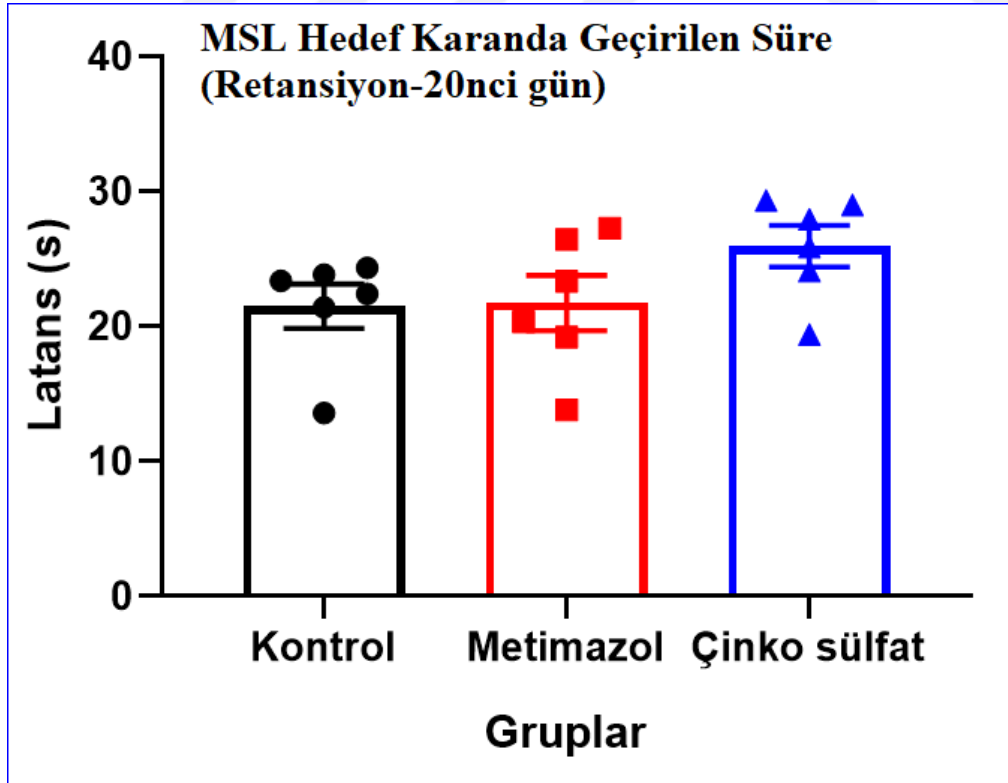


Şekil 18. Deney hayvanlarının kaçış platformunu bulma süreleri



Şekil 19. Deney hayvanlarının Hedef kadranda geçirilen süre yüzdeleri

SPSS ile normallik analizi yapıldı. Shapiro wilk testi yapıldı. $p=0,052$ olduğundan normal dağıldığı düşünüldü. One way anova sonucu $p=0,6889$ ve $F=0,3820$. Anlamlı fark yok idi. Her grup için $n=6$.

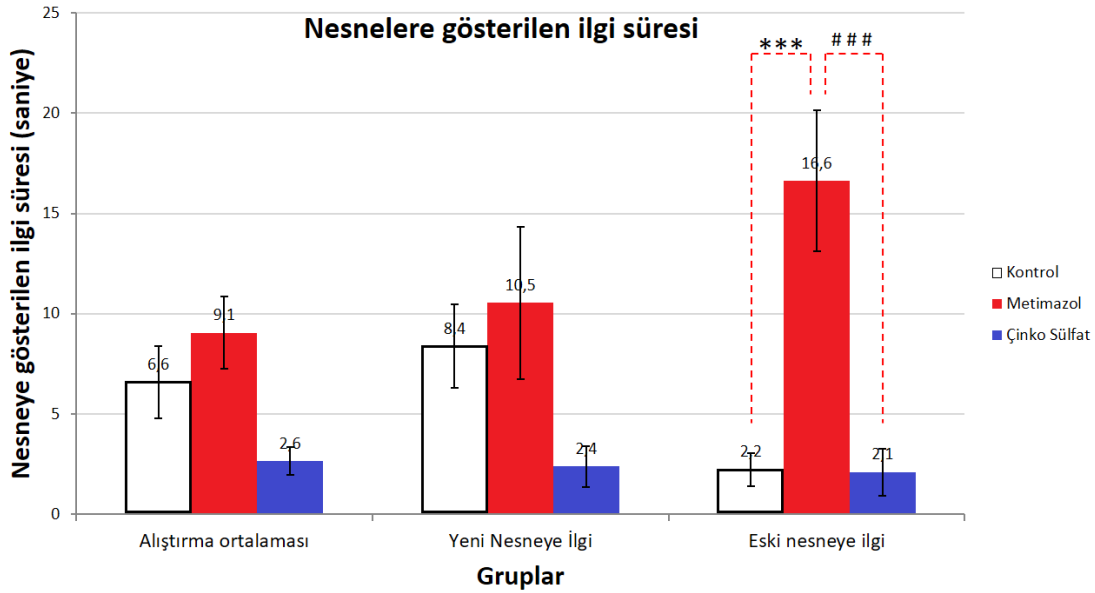


Şekil 20. Deney hayvanlarının Hedef kadranda geçirilen süre yüzdeleri

SPSS ile normallik analizi yapıldı. Shapiro wilk testi yapıldı. $p=0,237$ olduğundan normal dağıldığı düşünüldü. One way anova sonucu $p=0,1660$ ve $F=2,029$. Anlamlı fark yok idi. Tüm gruplar için $n=6$.

4.4.3. Yeni nesne tanıma testi (NOR) bulguları

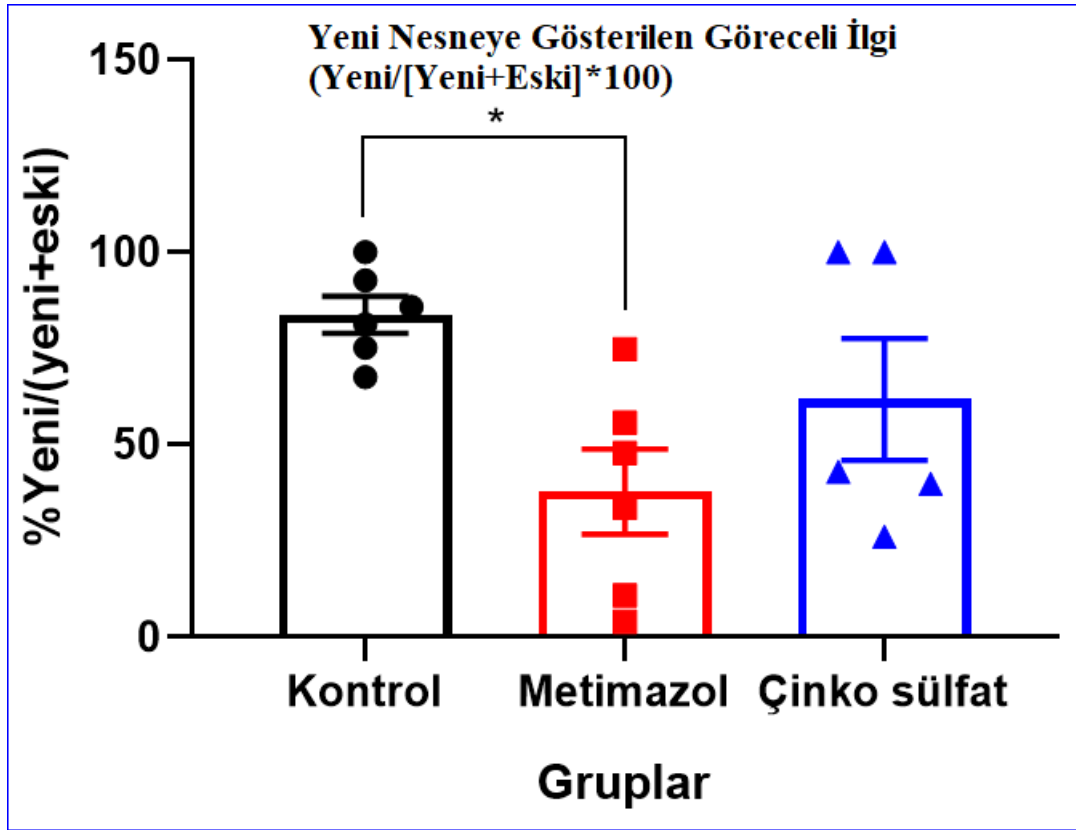
NOR testinde daha önceden tanıtılmış nesnelerden birisinin yerine yeni bir nesne konulduğunda hayvanların yeni nesneye daha fazla ilgi göstermesi beklenir, kontrol grubu istatistiksel anlamlılık düzeyine ulaşmasa da bu doğrultuda hareket etti ve yeni nesneye daha fazla ilgi gösterdi. Çinko Sülfat grubu bütün nesnelere yaklaşık eşit ilgi gösterdi yeni ve eski nesneler arasında belirgin bir tercih sergilemedi. Metimazol grubu ise eski nesneye daha fazla ilgi gösterdi. Bu veride eski nesneyi öğrenmemiş olma ihtimalini desteklemektedir. Metimazol grubunun eski nesneye olan ilgisi diğer gruplar ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bulundu. $p < 0,005$ vs Kontrol- Eski (Şekil 21).



Şekil 21. Deney hayvanlarının nesnelere gösterilen ilgi süresi:

*** $p < 0,005$ vs Kontrol -Eski; ### $p < 0,005$ vs Metimazol-Eski (ANOVA+Bonferroni). Tüm gruplar için $n=6$.

Yeni nesneye gösterilen göreceli ilgi değerlendirildiğinde $[Y/(Y+E) \times 100]$ Kontrol grubu ile Metimazol grubu arasında anlamlı fark olduğu görüldü (Kontrol= 83,8; Metimazol=37,8; $p=0,0212$ vs Kontrol). Bu bulgu koku duyusunun nöronal harabiyeti ile tanıma ve anımsama performansındaki bozulma arasında bir ilişki olduğuna işaret edebilir (Şekil 22).

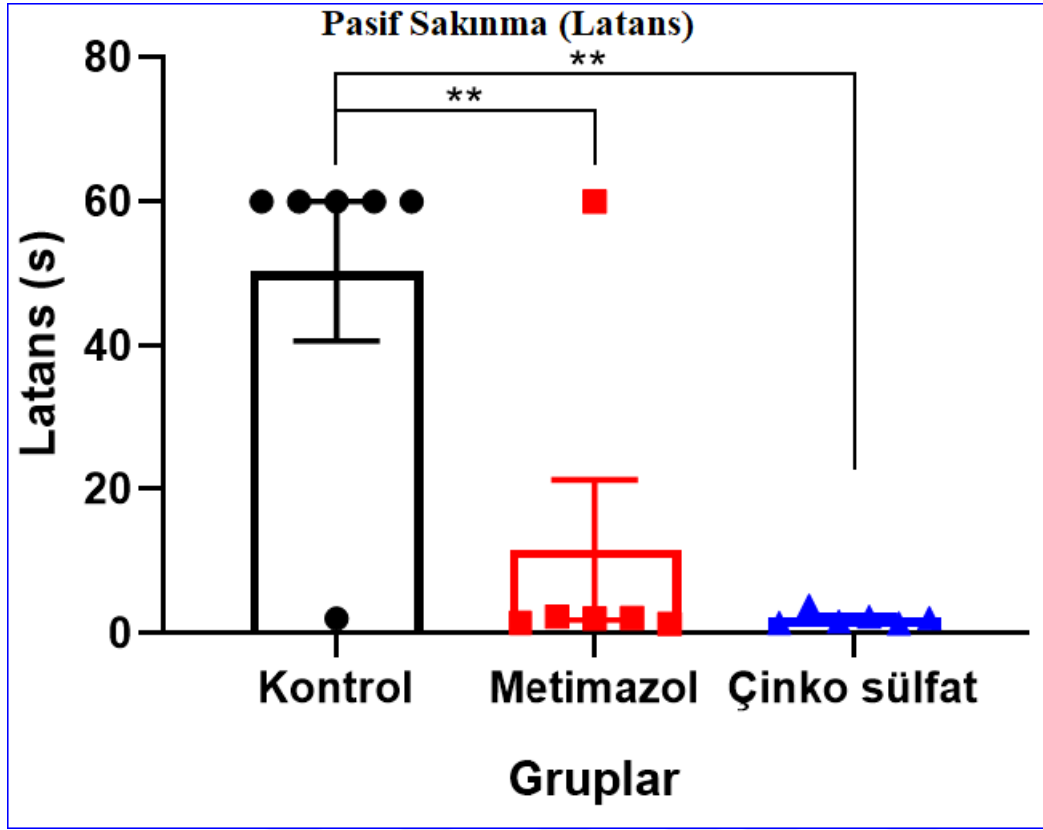


Şekil 22. Deney hayvanlarının nesnelere gösterilen göreceli ilgi süresi:

SPSS ile normallik analizi yapıldı. Shapiro wilk testi yapıldı. $p=0,265$ olduğundan normal dağıldığı düşünüldü. One way anova sonucu $p<0,0271$ ve $F=4,723$. Multiple comparison yani posthoc test sonuçlarına göre sadece kontrol-metimazol arasında anlamlı fark var idi adjusted $p=0,0212$. Tüm gruplar için $n=6$.

4.4.4. Pasif sakınma testi bulguları

Bu tez çalışmasında, koku yitiminin öğrenme-bellek işlevinin farklı bileşenleri üzerindeki etkilerin araştırılması hedeflendiğinden, korku ile güdülenen (*fear-oriented/motivated*) öğrenme-bellek performansını incelemek için sıçanlarda Pasif Sakınma Testi de gerçekleştirildi. Bu tip öğrenme, beyinde amigdala aracılığı ile koordine edilir. Pasif sakınma testinde Kontrol grubu karanlık alandan kaçınırken deney gruplarının çekince göstermeden karanlık alana girdikleri gözlemlendi. Hatta Kontrol grubundaki sıçanların düzenek içine bırakıldıklarında zıt yöne dönerek karanlık alandan kaçmaya çalıştıkları gözlemlendi. Pasif sakınma testi verileri arasındaki farklar istatistiksel olarak yüksek düzeyde anlamlı bulundu; Kontrol grubu için ortalama latans $50,3\pm97$ sn iken, Metimazol için $11,5\pm9.7$ sn ve Çinko Sülfat için $2,1\pm0,4$ sn olarak ölçüldü (Şekil 23). Bu bulgular doğrultusunda amigdala ve koku duyusu arasındaki bağlantıya ilişkin kanıt elde edildi. İleride aynı modeller oluşturularak amigdala üzerinde elektrofizyolojik araştırma yapılması gereklidir.



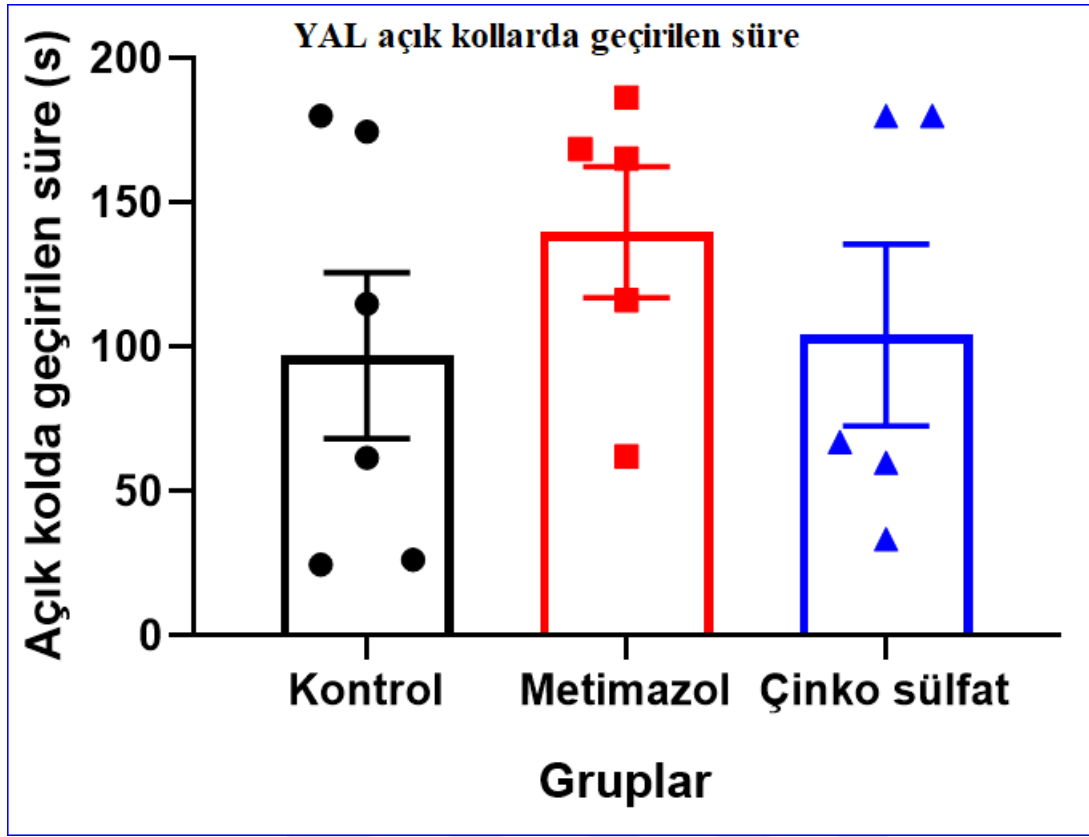
Şekil 23. Deney hayvanlarının pasif sakınma testinde latans ortalamaları:

One way anova test sonucu $p=0,0014$ ve $F=10,45$. Multiple comparison tabi posthoc test (tukey) sonuçlarına göre kontrol-metimazol adjusted $p=0,009$ ve kontrol-çinko sülfat adjusted $p=0,0017$. Tüm gruplar için $n=6$.

4.5. Anksiyeteyi Değerlendirmeye Yönelik Davranış Deneyleri

4.5.1. Yükseltilmiş artı labirent bulguları

Koku yitiminin sıçanlarda anksiyete düzeylerinde yol açması muhtemel etkinin araştırılması için uygulanan testlerden biri olan Yükseltilmiş Artı Labirentte gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı, ancak özellikle Metimazol grubunda açık kollarda bulunma eğiliminin daha fazla olduğu gözlemlendi. Subjektif bir gözlem olarak, deney (anosmia/ hiposmi) gruplarındaki sıçanların Kontrol grubundaki sıçanlara göre hiperaktivite gösterdikleri dikkat çekti (Şekil 24).

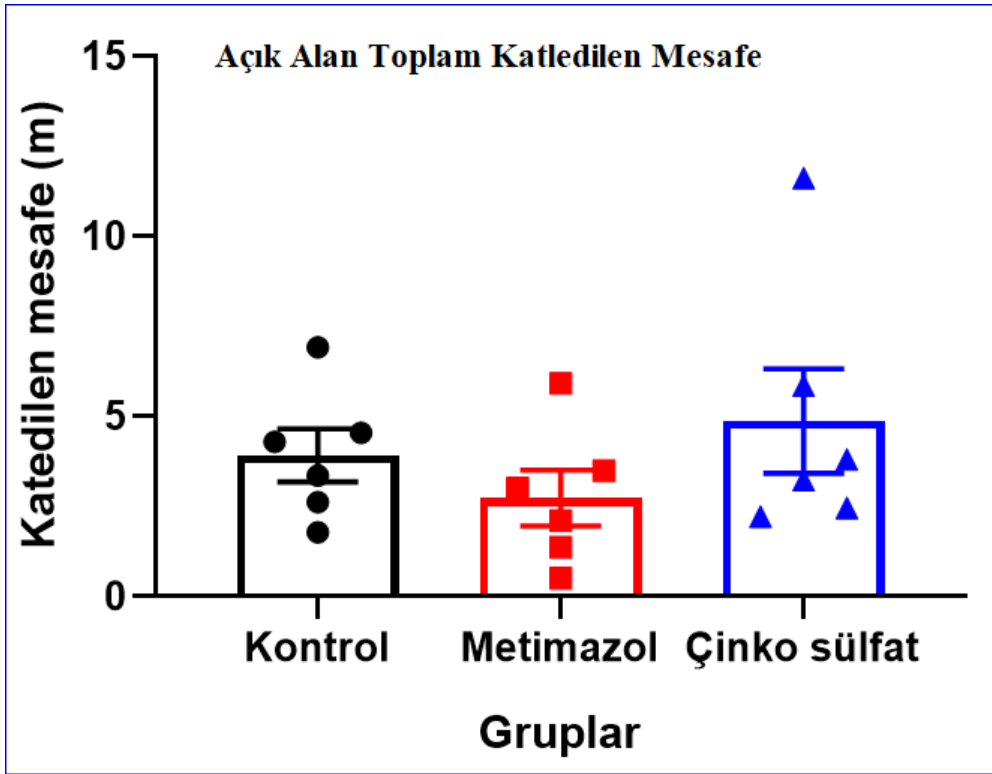


Şekil 24. Sıçanların açık kollarda geçirdikleri ortalama süre:

SPSS ile normallik analizi yapıldı. Shapiro wilk testi yapıldı. $p=0,011$ olduğundan normal dağılmadığı düşünüldü. Kruskal wallis test sonucu $p=0,5272$ ve $\chi^2=1,402$. Anlamlı fark yok idi.

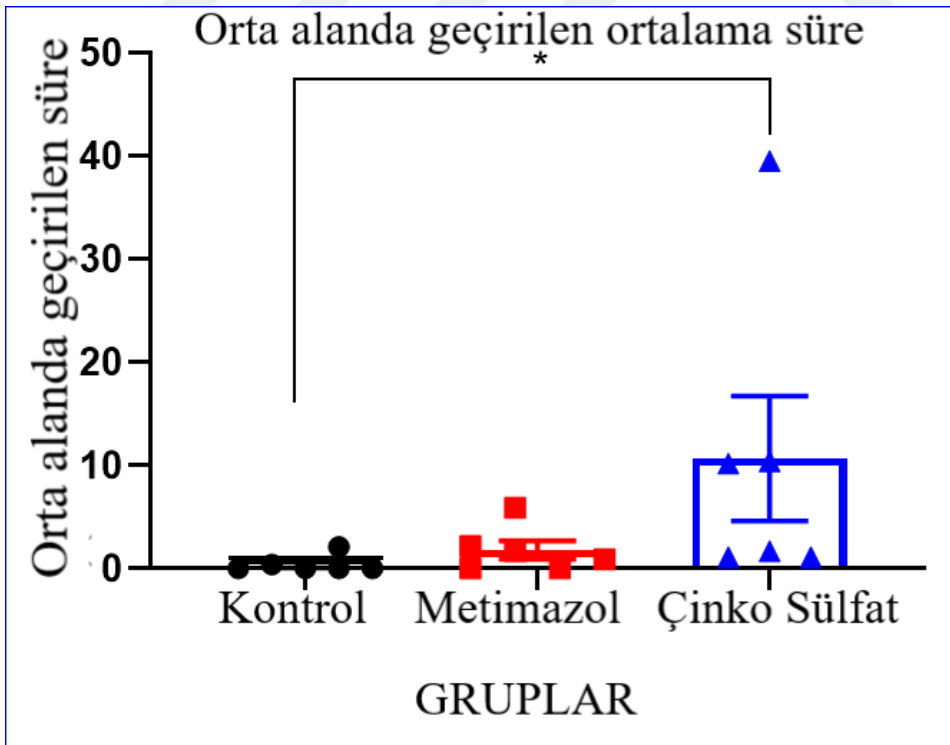
4.5.2. Açık alan testi bulguları

Sıçanlarda anksiyete durumunu değerlendirmek için diğer bir test olarak Açık Alan testi uygulandı. Bu düzenekte sıçanların doğaları gereği köşelerde zaman geçirmesi beklenir YAL bulgularıyla benzer biçimde katledilen mesafe açısından (şekil 25) istatistiksel olarak anlamlı olmamasına rağmen, deney (anosmia/hiposmi) gruplarının orta bölgede daha fazla zaman gözlemlendi. Orta alanda geçirilen zaman Kontrol vs Çinko Sülfat grupları için istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Şekil 26). Bu aşamada önerilebilecek yaklaşım, gruplardaki sıçan sayılarının artırılarak ileri çalışmaların yapılmasıdır.



Şekil 25. Açık Alan toplam katledilen mesafe:

SPSS ile normallik analizi yapıldı. Shapiro wilk testi yapıldı. $p=0,012$ olduğundan normal dağılmadığı düşünüldü. Kruskal wallis test sonucu $p=0,3998$ ve $\chi^2=1,977$. Gruplar arasında istatistiksel anlamlı fark yok. Tüm gruplar için $n=6$.

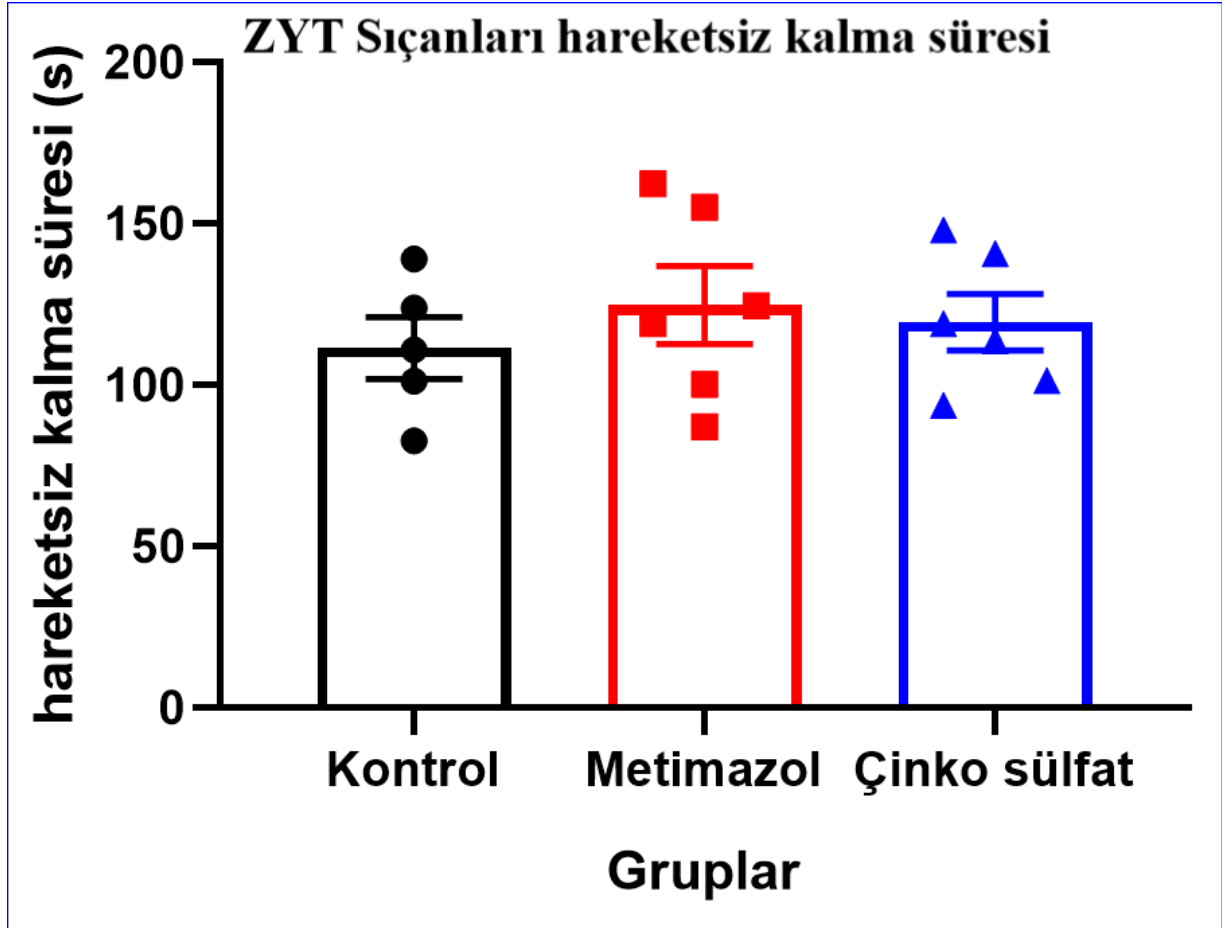


Şekil 26. Sıçanların orta bölgede geçirdiği süre (Sn):

SPSS ile normallik analizi yapıldı. Shapiro wilk testi yapıldı. $p<0,001$ olduğundan normal dağılmadığı düşünüldü. Kruskal wallis test sonucu $p=0,0251$ ve $\chi^2=6,880$. Multiple comparison yani posthoc test sonuçlarına göre fark sadece kontrol ve çinko sülfat grubu arasında adjusted $p=0,0265$. Tüm gruplar için $n=6$.

4.5.3. Porsolt zorlu yüzdürme testi (*Forced Swim Test*) bulguları

Bu tez çalışmasında kullanılan modeller ile yaratılan koku yitiminin sıçanlarda depresyon-benzeri reaksiyon oluşturma ihtimalini değerlendirmek için kullanılan Porsolt ZYT ile özellikle öğrenilmiş çaresizlik paradigması değerlendirildi. Ancak Porsolt ZYTnden elde edilen bulgular gruplar arasında depresyon-benzeri davranış yönünden bir fark olmadığını gösterdi (Şekil 27).



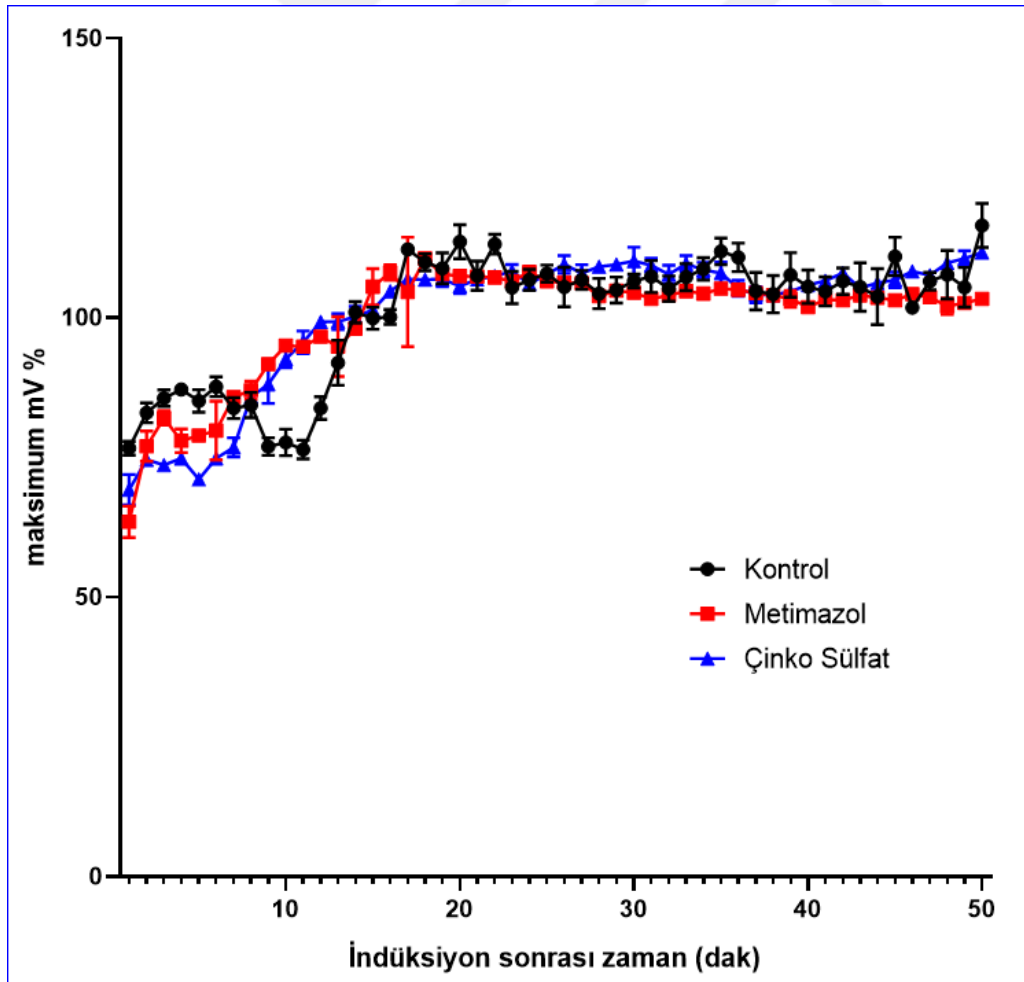
Şekil 27. ZYT Sıçanların ortalama hareketsiz kalma süresi (sn)

SPSS ile normallik analizi yapıldı. Shapiro wilk testi yapıldı. $p=0,705$ olduğundan normal dağıldığı düşünüldü. One way anova sonucu $p=0,6819$ ve $F=0,3935$. Tüm gruplar için $n=6$.

4.6. Elektrofizyoloji Deneyleri

4.6.1. “Long Term Potentiation” bulguları

Bu tez çalışmasında davranış testlerinden elde edilen bulguları destekler nitelikte, elektrofizyolojik bulgular elde edildi; sıçanlara uygulanan LTP sonucunda bütün hayvanlarda öğrenme/ potentiasyon olduğu ve anosminin dentat gyrus üzerindeki fonksiyonları bozmadığı saptandı. Veri seti Max Mv % cinsinden ifade edildi. İstatistiksel olarak gruplar arasında fark bulunmadı (Kruskal- Wallis) ancak metamizol vs çinko sülfat grupları arasında Mann-Whitnet U anlamlı sonuç vermiştir ($p<0.05$) bu anlamlılık Mv yüzde düzeyindeki kıyaslamaya bağlıdır (Şekil 28). Anlamlı olan sonuçlar zaman diliminde belirli noktalardaki sapmalar olduğu gözlemlendi, genel anlamda LTP de fark görülmedi. LTP için grup başına üç sıçan kullanıldı, deneylerin daha geniş bir popülasyon ile tekrarlanması, davranış bataryasında etkin olan diğer beyin alanlarında LTP kayıtlarının alınması ileride değerli veriler elde edilmesine katkıda bulunabilir.



Şekil 28. Sıçanlarda “Long term potentiation” bulguları

Ns (Not- Significant): Kruskal-Wallis; Mann-Whitney U: M-Ç; $P<0,05$. X eksenini geçen zaman/dk, Y eksenini % maksimum mV değerlerini göstermektedir. Grup başına n=3.

5.TARTIŞMA

Bu çalışmada demans ile seyreden nörodejeneratif hastalıkların birçoğunun ilk preklinik bulgusu olan anosminin kognitif fonksiyonlar üzerine olan etkisi incelenmiştir. Bu hastalıklardan biri olan Alzheimer hastalığı ile ilgili yapılan bir çalışmada koku testinin bu hastalığın teşhisine yönelik tanısal bataryanın bir parçası olabileceğini destekleyen bulgular elde edilmiştir. Bununla birlikte bir başka nörodejeneratif hastalık olan Parkinson hastalığında da koku duyusunda kaybın olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Braak skalasında Evre 1 olfaktör düzeydeki etkilenmeyi işaret eder (86). Bu tip hastalıkların etyopatogenezi hala tümüyle açıklanabilmiş değildir, ancak birçoğunda ilk bulgulardan biri anosmidir. Bu tez çalışması, bu tür nörodejeneratif hastalıkların başlangıcı beynin direkt uzantısı olan olfaktör sinirden retrograd taşınan bir etken (im. nörodejenerasyon, enfeksiyon, vb.) olabileceği rasyoneli ile tasarlandı. Literatürde yer alan iki farklı anosmi modelinden yararlanıldı. Soğuk algınlığındaki şekli ile mukozal harabiyet yaratmak için çinko sülfat irigasyonu ve nöronal harabiyet ile koku duyusunun tahribatı için intraperitoneal metimazol uygulama yöntemleri kullanıldı. Bu yöntemler koku duyusunu tamamen yok etmemekte ancak koku duyusu mevcut nöronların oluşturduğu bir “desen tanıma” şeklindeki kodlama yolu ile algılandığı için, bu yolaktaki harabiyet ile kokuların ayırt edilemez hale gelmesiyle en azından hiposmi oluşturmaktadır (38; 87). Yapılan çalışmalarda Alzheimer hastalarında koku diskriminasyonu ve belirli bir kokuyu tanıma Alzheimer hastalarında hastalık evresine göre artmaktadır bunun altında yatan sebep koku hafızasında meydana gelen değişiklikler (88). Koku diskriminasyonunun kognitif fonksiyon kaybını öngören bir belirteç olduğu gösterilmiştir (89). Anosmi/hiposmi oluştuğunun doğrulanması için gömülü yemi bulma testi yapılarak sıçanların, kendileri için tanıdık bir koku kaynağı olan yem peletini 24 saatlik tam açlığı takiben gömülmüş olduğu yerden bulup bulamayacakları sınandı. Model oluşumundan önce bütün sıçanlar yemi bulabilirken, model oluşumu sonrasında deney gruplarının yemi bulamaması hedeflenen anosmi modelinin gerçekleştiği yönünde değerlendirildi.

Anosmi oluşumu takiben kognitif fonksiyonların değerlendirilmesine yönelik davranış bataryasının uygulandığı sıçanlar spasiyel öğrenme, anksiyete, depresyon ve korku odaklı öğrenme açısından değerlendirildikten sonra elektrofizyolojik olarak dentat gyrus ve lateral perforan yolak değerlendirildi.

Uzaysal öğrenme-bellek için Morris su labirenti kullanıldı, gözlemsel olarak anosmik hayvanların daha aktif oldukları gözlemlendi ancak eğitim ve prob deney verileri gözönüne alındığında, anosminin uzaysal öğrenmede anlamlı bir fark yaratmadığı gözlemlendi. Yirmi gün sonra uygulanan retansiyon testinde benzer şekilde, gruplar arasında belirgin bir fark

gözlemlenmedi.

Yeni nesne tanıma testinde de sıçanlar arasında yeni nesneye karşı bir ilgi artışı gözlemlenmezken, ilginç bir şekilde Metimazol grubunun eski (tanıdık) nesneye aşırı ilgi gösterdiği gözlemlendi, yeni nesneye gösterilen göreceli ilgi “Ayrıştırma (diskriminasyon) indeksi” ölçütü ile değerlendirildiğinde Metimazol grubunun kontrole kıyasla anlamlı derecede ilgisiz olduğu saptanmıştır. Bu bulgu, nöronal harabiyet yolu ile koku yitiminin prefrontal korteks aracılı öğrenme işlevini bozduğu yönünde değerlendirildi.

Sıçanlarda anksiyete durumunu değerlendirmek için yükseltilmiş artı labirent ve açık alan testleri uygulandı. Yükseltilmiş artı labirentte açık alanda geçirilen süre açısından anlamlı fark bulunamamıştır ancak gözlemsel olarak metimazol grubunun çok daha aktif olduğu saptandı. Verilerin standart sapmalarının genişliği bu duruma neden olabileceğinden daha büyük bir deney grubu ile bu testin tekrarlanması halinde daha geçerli bir bilgi sağlanabilecektir. YAL testindeki bu bulgu literatürdeki olfaktör bulbektomi ile yapılan çalışmaların bulguları ile benzerdir(90). Bu çalışmalardaki bulgular çevresel bilgi kaynağı olan kokuları algılayamadıklarında, arayış içine giren anosmik hayvanlardan kaynaklandığı öne sürülmektedir. Açık alan testinin sonuçları da benzer yöndedir ve bu bulguları desteklemektedir anosmi grubu orta bölgede daha fazla bulunma eğilimi sergilese de istatistiksel olarak anlamlılık sadece Kontrol grubu ve Çinko Sülfat grubu arasında gözlemlenmemiştir. Ancak ilginç biçimde, anosminin gözlemsel olarak anksiyolitik bir etkisi var gibi gözükmemektedir. Defekasyon sıklığı/sayısı sıçanlarda anksiyete düzeyini işaret edebilecek diğer parametrelerden biridir ve kontrol grubunda defekasyon sayısı pasif sakınma testinde Anosmi/ hiposmi gruplarına karşı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuş olup pasif sakınma bulgularını desteklemektedir. Bu üç bulgu birbirini desteklemektedir ve ilerki çalışmalarda göz önüne alınmalarında fayda vardır. Yükseltilmiş artı labirent testi ve açık alan testinde anosmi grubundaki sıçanların kontrol grubundaki sıçanlara göre daha hiperaktif oldukları gözlenmiştir. Hiperaktivite, anosminin belirgin bir davranışsal sonucudur. Olfaktör bulbektomi yapılan sıçanlarda yapılan bir çalışmada görülen hiperaktivitenin anosmi kaynaklı olabileceği belirtilmiştir(90). Hiperaktivitenin altında yatan fizyolojik etkenin dopamin eksikliği olduğu öne sürülmüştür. Bu da anosmi ile nörodejeneratif bir hastalık olan Parkinson hastalığı arasında bağlantı olduğunu gösteren bir ipucu olarak yorumlanabilir.

Anosmi modelinin oluşturulmasında Çinko Sülfat grubuna uygulanan nazal lavajlar ve Metimazol grubuna uygulanan periyodik intraperitoneal enjeksiyonların ve/veya anosmik/hiposmi oluşmasının hayvanlarda depresif tavırlara neden olup olmadığını değerlendirmek için uygulanan Porsolt zorlu yüzme testi gruplara arasında anlamlı bir fark olmadığını göstermiştir. Böylelikle gruplarda depresyon gelişmediği tüm grupların kognitif

testler sırasında depresyon açısından eşit şartlarda olduğu ve sonuçlar arasındaki farklılıklarda depresyonun rol oynamadığı söylenebilir. Anosmi oluşturmak için kullanılan maddelerden metimazol anti-tiroid bir tiyoüre olduğu ve hipo/hipertiroidinin kognitif fonksiyonlar üzerinde etkileri olduğu bilindiği için, tüm gruplardan rastgele seçilen hayvanlarda TSH ve serbest T3 seviyeleri değerlendirildi, tüm grupların ötiroid oldukları ve kognitif testlerdeki performanslarının tirod hipo/hiper fonksiyonuna bağlı olmadığı gösterildi.

Öğrenmenin diğer bir tipi olan korku ile güdülenen (fear-motivated) öğrenme performansının değerlendirilmesi için uygulanan pasif sakınma testi, diğer kognitif testlerin aksine deney (anosmik/hiposmi) gruplarının karanlık alana tereddütsüz tekrar girdiğini, kontrol grubundaki hayvanların ise korku ile aydınlık alanda beklediğini göstermiştir. Deney grupları ile Kontrol grubu arasındaki bu fark istatistiksel olarak yüksek düzeyde anlamlı bulunmuştur. Elde ettiğimiz bu bulgu da literatürdeki diğer bulgularla benzerdir(90). Anosmik hayvanların korku seviyeleri daha düşüktür (91). Bu bulgular ışığında anosminin amigadala üzerinde olumsuz etkisi olduğu söylenebilir, ancak bu tez çalışması kapsamında elektrofizyolojik olarak bunun test edilmesi mümkün olmamıştır, ileriki çalışmalarda bu ihtimalin aydınlatılması gereklidir.

Bu tez çalışmasında anosmik hayvanlarda öğrenme ve belleğin elektrofizyolojik olarak değerlendirilmesi için lateral perforan yolak ve dentat girus hedef alındı. LTP uygulaması ile dentat girusu uyatarak lateral perforan yolaktan kayıt alındı. Bu kayıtlarda gruplar arasında anlamlı bir farklılık saptanadı, LTP bulguları bu tez çalışmasında elde edilen hipokampal öğrenme-bellek performansı ile ilgili kognitif fonksiyon testlerinin bulgularını desteklemektedir.

Elde edilen bulgular ışığında anosminin hipokampal öğrenme ve bellek üzerinde doğrudan bir etkisinin olmadığı düşünüldü, ancak pasif sakınma ve yeni nesne tanıma testi bulguları ışığında anosminin prefrontal korteks ve amigdala üzerine etkili olduğu önesürülebilir. Bu deneylerin daha geniş bir deney grubu ile tekrarlanmasının ve prefrontal korteks ve amigdalanın elektrofizyolojik olarak değerlendirilmesinin bilimsel literature anlamlı katkılar sağlama potansiyelinin olduğu görüşündeyiz.

Kısıtlılıklar

- 1) Yeteri kadar deney hayvanı ve zaman olmadığı için prefrontal korteks ve amigdala gibi öğrenme-bellek işlevi ile ilgili beyin bölgelerinde elektrofizyolojik kayıtların yapılamamış olması
- 2) Maddi ve teknik sebeplerden ötürü ileri immunhistokimyasal ve moleküler tetkiklerin bu aşamada yapılamamış olması. (*İleride yapılabilme ihtimali göz önünde bulundurularak sakrifiye edilen hayvanların beyinleri -80°C derece sıcaklıkta muhafaza edilmektedir.*)



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında sıçanlarda farklı mekanizmalarla anosmi/hiposmi oluşturan iki farmakolojik ajan, $ZnSO_4$ ve metimazol uygulanarak, sırasıyla olfaktör epitel hasarı- ile nöronal hasar-aracılı anosmi/hiposmi modelleri oluşturmak ve çeşitli davranış testleri ile değerlendirilen bilişsel süreç ile koku duyusu kaybı arasındaki olası ilişkinin ortaya konabilmesi amaçlanmıştır. Anosmi modelinin geçerliliği sıçanların vücut ağırlıkları değişimi ve yem bulma testi ile değerlendirilmiştir. Koku duyusunun kaybının sebep olduğu öğrenme-bellek üzerindeki etkiler Barnes Labirenti, Morris Su Labirenti, yeni nesne tanıma testi ve pasif sakınma testi ile değerlendirilirken, anksiyetenin değerlendirilmesi için açık alan testi ve yükseltmiş artı labirent testi uygulanmıştır.

$ZnSO_4$ ve metimazol uygulanarak oluşturulan anosmi modelinde sıçanların vücut ağırlıkları kontrol grubundaki sıçanlara göre daha az artmıştır. Ayrıca anosmi oluşumunun kontrolü için gerçekleştirilen yem bulma testinde kontrol grubundaki sıçanlar belirlenen sürede yemi bulurken anosmi oluşturulan gruptaki sıçanlar yemi belirlenen sürede bulamamışlardır. Bu testlerin sonucu istenilen anosmi modelinin oluştuğunu göstermektedir.

Koku alma duyusunun bozulması sonucunda öğrenme-bellek işlevi üzerinde oluşan değişikliklerin değerlendirilmesinde kullanılan Barnes Labirenti testinde Kontrol ve deney (anosmik/hiposmi) gruplarındaki sıçanların öğrenme-bellek fonksiyonlarında anlamlı bir değişiklik oluşmamış, sıçanların uzaysal öğrenme işlevinin korunduğu tespit edilmiştir. Aynı şekilde Morris Su labirenti'nin bulguları da benzer bulunmuştur, sıçanlar kaçış platformunun yerini öğrenmişlerdir. Morris Su labirenti testinde yapılan prob deneyi ve presipitasyon belleğinin değerlendirilmesi için uygulanan retansiyon deneyinin sonuçlarında da anosmi gruplarının öğrenme işlevlerinde belirgin bir kaybın olmadığı saptanmıştır. Yeni nesne tanıma testinde kontrol grubu yeni nesneye daha çok ilgi gösterirken metimazol ile anosmi oluşturulan sıçanların yeni nesneye ilgileri azalmıştır. $ZnSO_4$ ile anosmi oluşturulan grupta yeni ve eski nesneye eşit ilgi gösterilmiştir. Korku güdülü (*fear motivated*) öğrenmenin değerlendirildiği pasif sakınma testinde kontrol grubu karanlık bölgeden kaçınırken anosmi oluşturulan gruptaki sıçanlar elektro şok uygulamasına rağmen karanlık bölgeye yönelmişlerdir. Pasif sakınma testinde değerlendirme yapılırken sıçanların dışkılama sayıları da değerlendirilmiş ve Kontrol ve deney (anosmik/hiposmi) grupları arasında anlamlı fark olduğu görülmüştür.

Anosmi sonucunda sıçanlardaki anksiyetenin değerlendirilmesi için açık alan testi ve yükseltilmiş artı labirent testi uygulanmıştır. Açık alan testinde sıçanların orta bölgede geçirdikleri süre incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı çıkmasa da anosmi grubundaki sıçanlar orta alandan daha çok süre geçirmişlerdir. Ayrıca açık alan testinde değerlendirme yapılırken sıçanların dışkılama sayıları da değerlendirilmiş ve gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır. Yükseltilmiş artı labirent sonuçları da kontrol ve anosmi gruplarında anksiyete düzeyleri arasında bir farklılık ortaya çıkartmamıştır. Ancak bu testlerin sonucunda hayvanlarda hiperaktivitenin artmış olduğu gözlemlenmiştir.

Bu tez çalışmasında çeşitli davranış testleri yardımıyla gösterilen, koku yitimi ile kognitif performans arasındaki olası ilişkinin derinlemesine incelenebilmesine yönelik ileri çalışmaların yapılması ve özellikle süreçte $G_s/Olf-D_1R$, D_2R , adrenerjik, kolinerjik vb reseptörlerin, Nav1.7, Na^+/Ca^{2+} , Cl^- vb iyon kanallarının ve fosfodiesteraz-3, adenilat siklaz, guanilat siklaz, sitokrom P450 vb enzimlerin katkısının incelenmesi gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- 1) Purves D., Augustine G. J., Fitzpatrick D., et al. Neuroscience (third ed.) Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts USA (2004) ; 14: 337.
- 2) Mendoza JE, Foundas AL. Clinical Neuroanatomy: A Neurobehavioral Approach. New York: Springer; 2008.p. 114-118, 252-253.
- 3) Buck, L. and Axel, R. (1991) A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. Cell 65, 175-187
Rodriguez, I.; (2013) Singular Expression of Olfactory Receptor Genes. Cell 155, October 10, 274 -277.
- 4) Rinaldi, A. (2007) The scent of life. The exquisite complexity of the sense of smell in animals and humans. EMBO Rep. 8, 629-633
- 5) Sarafoleanu, C.; Mella, C.; Georgescu, M.; Perederco, C. The importance of the olfactory sense in the human behavior and evolution. J. Med. Life, 2009, 2(2), 196-198. [PMID: 20108540]
- 6) Ache, B.W., Young, J.M. (2005) Olfaction: diverse species conserved principles. Neuron 48, 417-430
- 7) Menashe, I., Lancet, D. (2006) Variations in the human olfactory receptor pathway. Cell. Mol. Life Sci. 63, 1485-1493
- 8) Bear, D.M.; Lassance, J.M.; Hoekstra, H.E.; Datta, S.R. Evolution of the genetic and neural architecture for vertebrate odor perception. Curr. Biol., 2016, 26, R1039-R1049. [<http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2016.09.011>] [PMID: 27780046]
- 9) Breer, H. Olfactory receptors: molecular basis for recognition and discrimination of odors. Anal. Bioanal. Chem., 2003, 377(3), 427-433. [<http://dx.doi.org/10.1007/s00216-003-2113-9>] [PMID: 12898108]
- 10) Touhara, K.; Vosshall, L.B. Sensing odorants and pheromones with chemosensory receptors. Annu. Rev. Physiol., 2009, 71, 307-332. [<http://dx.doi.org/10.1146/annurev.physiol.010908.163209>] [PMID: 19575682]
- 11) Glusman, G., et al. (2001) The complete human olfactory sub genome. Genome Res. 11, 685-702
- 12) Zhang, X.; Firestein, S. The olfactory receptor gene superfamily of the mouse. Nat. Neurosci., 2002, 5(2), 124-133. [<http://dx.doi.org/10.1038/nn800>] [PMID: 11802173]

- 13) Zozulya, S.; Echeverri, F.; Nguyen, T. The human olfactory receptor repertoire *Genome Biol*, 2001, 2(6), 18.1-18.12.
- 14) Godfrey, P.A.; Malnic, B.; Buck, L.B. The mouse olfactory receptor gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004, 101(7), 2156-2161. [<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0308051100>] [PMID: 14769939]
- 15) Malnic, B. et al. (1999) Combinational receptor codes for odors. *Cell* 96, 713-723
- 16) Wilson, R. S., Arnold, S. E., Schneider, J. A., Tang, Y., Bennet, D. A. (2007a). The relationship between cerebral Alzheimer's disease pathology and odour identification in old age. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 78, 30-35. Doi:10.1136/jnnp.2006.099721
- 17) Wong, K. K., Muller, M. L., Kuwabara, H., Studenski, S. A., Bohnen, N. I. (2010). Olfactory loss and nigrostriatal dopaminergic denervation in the elderly. *Neurosci. Lett.* 484, 163-167. Doi: 10.1016/j.neulet.2010.08.037
- 18) Bolek Zapiec, Birger V Dieriks, Sheryl Tan, Richard L M Faull, Peter Mombaerts. Maurice A Curtis. A ventral glomerular deficit in Parkinson's disease revealed by whole olfactory bulb reconstruction *Brain*, volume 140, Issue 10, october 2017, Pages 2722-2736, doi.org/10.1093/brain/awx208
- 19) Wyatt, TD. Introduction to Chemical Signaling in Vertebrates and Invertebrates. In: Mucignat Caretta, C., editor. *Neurobiology of Chemical Communication*. Boca Raton (FL): 2014. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK200995/>
- 20) Meister ,M. On the dimensionality of odor space. *Computational and systems biology | Neuroscience* .1-12, 2015. Meister. *eLife* 2015;4:e07865. DOI: 10.7554/eLife.07865 .[PubMed: 26151672]
- 21) Harel, D.; Carmel, L.; Lancet, D. Towards an odor communication system. *Comput. Biol. Chem.*, 2003, 27(2), 121-133. [[http://dx.doi.org/10.1016/S1476-9271\(02\)00092-0](http://dx.doi.org/10.1016/S1476-9271(02)00092-0)] [PMID: 12821309]
- 22) Murphy, C., Shubert, C. R., Cruikshanks, K. J., Klein, B. E., Klein, R., Nondahl, D. M. (2002). Prevalence of olfactory impairment in older adults. *JAMA* 288, 2307-2312. Doi: 10.1001/jama.288.18.2307.
- 23) Doty, R.L.; Kamath, V. (2014)The influences of age on olfaction: a review. *Frontiers in Psychology* 5(20), 2-20.
- 24) Gilad, Y., Lancet, D. (2003) Population differences in the human functional olfactory repertoire. *Mol. Biol. Evol.* 20, 307-314
- 25) Alberts, J.R. and Galef, B.G., Jr (1971) Acute anosmia in the rat: a behavioral test of a peripherally-induced olfactory deficit. *Physiol. Behav.*, 6, 619–621.

- 26) Donald H. Thor, Kevin J. Flannelly, Peripheral anosmia and social investigatory behavior of the male rat, *Behavioral Biology*, Volume 20, Issue 1, 1977, Pages 128-134, ISSN 0091-6773, [https://doi.org/10.1016/S0091-6773\(77\)90682-4](https://doi.org/10.1016/S0091-6773(77)90682-4).
- 27) Alberts, J. R., & Galef, B. G. (1973). Olfactory cues and movement: Stimuli mediating intraspecific aggression in the wild Norway rat. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 85(2), 233–242. <https://doi.org/10.1037/h0035050>
- 28) Winans SS, Powers JB. Olfactory and vomeronasal deafferentation of male hamsters: histological and behavioral analyses. *Brain Res.* 1977 May 6;126(2):325-44. doi: 10.1016/0006-8993(77)90729-6. PMID: 861723.
- 29) Andine, P., Axelsson, R. and Jacobson, I. (1995) The effect of anosmia on MK-801-induced behaviour in mice. *Neurosci. Lett.*, 190, 113–6
- 30) Johnston, R. E. (1992). Vomeronasal and/or olfactory mediation of ultrasonic calling and scent marking by female golden hamsters. *Physiology & Behavior*, 51(3), 437–448. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(92\)90163-V](https://doi.org/10.1016/0031-9384(92)90163-V)
- 31) Slotnick B, Glover P, Bodyak N. Does intranasal application of zinc sulfate produce anosmia in the rat? *Behav Neurosci.* 2000 Aug;114(4):814-29. PMID: 10959540.
- 32) Matulionis DH. Light and electron microscopic study of the effects of ZnSO₄ on mouse nasal respiratory epithelium and subsequent responses. *Anat Rec.* 1975 Sep;183(1):63-82. doi: 10.1002/ar.1091830107. PMID: 1180398.
- 33) Harding JW, Getchell TV, Margolis FL. Denervation of the primary olfactory pathway in mice. V. Long-term effect of intranasal ZnSO₄ irrigation on behavior, biochemistry and morphology. *Brain Res.* 1978 Jan 27;140(2):271-85. doi: 10.1016/0006-8993(78)90460-2. PMID: 626892.
- 34) Burd GD. Morphological study of the effects of intranasal zinc sulfate irrigation on the mouse olfactory epithelium and olfactory bulb. *Microsc Res Tech.* 1993 Feb 15;24(3):195-213. doi: 10.1002/jemt.1070240302. PMID: 8431603.
- 35) Drickamer LC. Peripheral anosmia affects puberty-influencing chemosignals in mice: donors and recipients. *Physiol Behav.* 1986;37(5):741-6. doi: 10.1016/0031-9384(86)90179-4. PMID: 3774905.
- 36) Porter RH, Sentell SW, Makin JW. Effects of intranasal ZnSO₄ irrigation are mitigated by the presence of untreated littermates. *Physiol Behav.* 1987;40(1):97-102. doi: 10.1016/0031-9384(87)90190-9. PMID: 3615658.
- 37) McBride K, Slotnick B, Margolis FL. Does intranasal application of zinc sulfate produce anosmia in the mouse? An olfactometric and anatomical study. *Chem Senses.* 2003

- Oct;28(8):659-70. doi: 10.1093/chemse/bjg053. PMID: 14627534.
- 38) Bergström U, Giovanetti A, Piras E, Brittebo EB. Methimazole-induced damage in the olfactory mucosa: effects on ultrastructure and glutathione levels. *Toxicol Pathol.* 2003 Jul-Aug;31(4):379-87. doi: 10.1080/01926230390201101. PMID: 12851103.
 - 39) Xu W, Slotnick B. Olfaction and peripheral olfactory connections in methimazole-treated rats. *Behav Brain Res.* 1999 Jul;102(1-2):41-50. doi: 10.1016/s0166-4328(99)00004-2. PMID: 10403014.
 - 40) Angela K. Setzer, Burton Slotnick, Disruption of Axonal Transport From Olfactory Epithelium by 3-Methylindole, *Physiology & Behavior*, Volume 65, Issue 3, 1998, Pages 479-487, ISSN 0031-9384, [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(98\)00185-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(98)00185-1).
 - 41) Jeffrey AM, Iatropoulos MJ, Williams GM. Nasal Cytotoxic and Carcinogenic Activities of Systemically Distributed Organic Chemicals. *Toxicologic Pathology.* 2006;34(7):827-852. doi:10.1080/01926230601042494
 - 42) Genter, Mary & Deamer, Nora & Blake, Bonita & Wesley, Deborah & Levi, Patricia. (1995). Olfactory Toxicity of Methimazole: Dose-Response and Structure-Activity Studies and Characterization of Flavin-Containing Monooxygenase Activity in the Long-Evans Rat Olfactory Mucosa. *Toxicologic pathology.* 23. 477-86. 10.1177/019262339502300404.
 - 43) Yamada K, Wada E, Wada K. Female gastrin-releasing peptide receptor (GRP-R)-deficient mice exhibit altered social preference for male conspecifics: implications for GRP/GRP-R modulation of GABAergic function. *Brain Res.* 2001 Mar 16;894(2):281-7. doi: 10.1016/s0006-8993(01)02032-7. PMID: 11251202.
 - 44) Del Punta K, Leinders-Zufall T, Rodriguez I, Jukam D, Wysocki CJ, Ogawa S, Zufall F, Mombaerts P. Deficient pheromone responses in mice lacking a cluster of vomeronasal receptor genes. *Nature.* 2002 Sep 5;419(6902):70-4. doi: 10.1038/nature00955. PMID: 12214233.
 - 45) Dawson PA, Steane SE, Markovich D. Impaired memory and olfactory performance in NaSi-1 sulphate transporter deficient mice. *Behav Brain Res.* 2005 Apr 15;159(1):15-20. doi: 10.1016/j.bbr.2004.09.020. PMID: 15794992.
 - 46) Sheryl S. Moy, Randal J. Nonneman, Nancy B. Young, Galina P. Demyanenko, Patricia F. Maness, Impaired sociability and cognitive function in Nrcam-null mice, *Behavioural Brain Research*, Volume 205, Issue 1, 2009, Pages 123-131, ISSN 0166-4328, <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.06.021>.
 - 47) Amine Bahi, Shamma Al Mansouri, Elyazia Al Memari, Mouza Al Ameri, Syed M Nurulain, Shreesh Ojha, β -Caryophyllene, a CB2 receptor agonist produces multiple

- behavioral changes relevant to anxiety and depression in mice, *Physiology & Behavior*, Volume 135, 2014, Pages 119-124, ISSN 0031-9384, <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2014.06.003>.
- 48) Hutch CR, Hillard CJ, Jia C, Hegg CC. An endocannabinoid system is present in the mouse olfactory epithelium but does not modulate olfaction. *Neuroscience*. 2015 Aug 6;300:539-53. doi: 10.1016/j.neuroscience.2015.05.056. Epub 2015 May 30. PMID: 26037800; PMCID: PMC4485596.
 - 49) Machado CF, Nagai MH, Lyra CS, Reis-Silva TM, Xavier AM, Glezer I, Felicio LF, Malnic B. Conditional Deletion of Ric-8b in Olfactory Sensory Neurons Leads to Olfactory Impairment. *J Neurosci*. 2017 Dec 13;37(50):12202-12213. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0943-17.2017. Epub 2017 Nov 8. Erratum in: *J Neurosci*. 2018 Jan 24;38(4):1054. PMID: 29118104; PMCID: PMC6596823.
 - 50) Barnes CA. Memory deficits associated with senescence: a neurophysiological and behavioral study in the rat. *J Comp Physiol Psychol*. 1979 Feb;93(1):74-104. doi: 10.1037/h0077579. PMID: 221551.
 - 51) Bach ME, Hawkins RD, Osman M, Kandel ER, Mayford M. Impairment of spatial but not contextual memory in CaMKII mutant mice with a selective loss of hippocampal LTP in the range of the theta frequency. *Cell*. 1995 Jun 16;81(6):905-15. doi: 10.1016/0092-8674(95)90010-1. PMID: 7781067.
 - 52) Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods*. 1984 May;11(1):47-60. doi: 10.1016/0165-0270(84)90007-4. PMID: 6471907.
 - 53) Pitts MW. Barnes Maze Procedure for Spatial Learning and Memory in Mice. *Bio Protoc*. 2018 Mar 5;8(5):e2744. doi: 10.21769/bioprotoc.2744. PMID: 29651452; PMCID: PMC5891830.
 - 54) Harrison FE, Hosseini AH, McDonald MP. Endogenous anxiety and stress responses in water maze and Barnes maze spatial memory tasks. *Behav Brain Res*. 2009 Mar 2;198(1):247-51. doi: 10.1016/j.bbr.2008.10.015. Epub 2008 Oct 18. PMID: 18996418; PMCID: PMC2663577.
 - 55) Hennariikka Iivonen, Liisa Nurminen, Mikko Harri, Heikki Tanila, Jukka Puoliväli, Hypothermia in mice tested in Morris water maze, *Behavioural Brain Research*, Volume 141, Issue 2, 2003, Pages 207-213, ISSN 0166-4328, [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(02\)00369-8](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(02)00369-8).
 - 56) Othman MZ, Hassan Z, Che Has AT. Morris water maze: a versatile and pertinent tool for

- assessing spatial learning and memory. *Exp Anim*. 2022 Aug 5;71(3):264-280. doi: 10.1538/expanim.21-0120. Epub 2022 Mar 18. PMID: 35314563; PMCID: PMC9388345.
- 57) File SE, Zangrossi H Jr, Viana M, Graeff FG. Trial 2 in the elevated plus-maze: a different form of fear? *Psychopharmacology (Berl)*. 1993;111(4):491-4. doi: 10.1007/BF02253541. PMID: 7870992.
- 58) MONTGOMERY KC. The effect of activity deprivation upon exploratory behavior. *J Comp Physiol Psychol*. 1953 Dec;46(6):438-41. doi: 10.1037/h0057887. PMID: 13109068.
- 59) Handley SL, Mithani S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 1984 Aug;327(1):1-5. doi: 10.1007/BF00504983. PMID: 6149466.
- 60) Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods*. 1985 Aug;14(3):149-67. doi: 10.1016/0165-0270(85)90031-7. PMID: 2864480.
- 61) Walf AA, Frye CA. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat Protoc*. 2007;2(2):322-8. doi: 10.1038/nprot.2007.44. PMID: 17406592; PMCID: PMC3623971.
- 62) Walsh RN, Cummins RA. The Open-Field Test: a critical review. *Psychol Bull*. 1976 May;83(3):482-504. PMID: 17582919.
- 63) Seibenhener ML, Wooten MC. Use of the Open Field Maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice. *J Vis Exp*. 2015 Feb 6;(96):e52434. doi: 10.3791/52434. PMID: 25742564; PMCID: PMC4354627.
- 64) Berlyne D. E. (1950). Novelty and curiosity as determinants of exploratory behaviour. *Br. J. Psychol*. 41 68–80. 10.1111/j.2044-8295.1950.tb00262.x; <https://doi.org/10.1111/j.2044-8295.1950.tb00262.x>
- 65) Leger M, Quiedeville A, Bouet V, Haelewyn B, Boulouard M, Schumann-Bard P, Freret T. Object recognition test in mice. *Nat Protoc*. 2013 Dec;8(12):2531-7. doi: 10.1038/nprot.2013.155. Epub 2013 Nov 21. PMID: 24263092.
- 66) Ennaceur A, Delacour J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behav Brain Res*. 1988 Nov 1;31(1):47-59. doi: 10.1016/0166-4328(88)90157-x. PMID: 3228475.
- 67) Goulart BK, de Lima MN, de Farias CB, Reolon GK, Almeida VR, Quevedo J, Kapczinski F, Schröder N, Roesler R. Ketamine impairs recognition memory consolidation and prevents learning-induced increase in hippocampal brain-derived neurotrophic factor levels. *Neuroscience*. 2010 Jun 2;167(4):969-73. doi: 10.1016/j.neuroscience.2010.03.032. Epub

2010 Mar 22. PMID: 20338225.

- 68) Silvers JM, Harrod SB, Mactutus CF, Booze RM. Automation of the novel object recognition task for use in adolescent rats. *J Neurosci Methods*. 2007 Oct 15;166(1):99-103. doi: 10.1016/j.jneumeth.2007.06.032. Epub 2007 Aug 23. PMID: 17719091; PMCID: PMC3184886.
- 69) Gaskin S, Tardif M, Cole E, Piterkin P, Kayello L, Mumby DG. Object familiarization and novel-object preference in rats. *Behav Processes*. 2010 Jan;83(1):61-71. doi: 10.1016/j.beproc.2009.10.003. Epub 2009 Oct 27. PMID: 19874876.
- 70) Hammond RS, Tull LE, Stackman RW. On the delay-dependent involvement of the hippocampus in object recognition memory. *Neurobiol Learn Mem*. 2004 Jul;82(1):26-34. doi: 10.1016/j.nlm.2004.03.005. PMID: 15183168.
- 71) Antunes M, Biala G. The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. *Cogn Process*. 2012 May;13(2):93-110. doi: 10.1007/s10339-011-0430-z. Epub 2011 Dec 9. PMID: 22160349; PMCID: PMC3332351.
- 72) Roger D. Porsolt, Guy Anton, Nadine Blavet, Maurice Jalfre, Behavioural despair in rats: A new model sensitive to antidepressant treatments, *European Journal of Pharmacology*, Volume 47, Issue 4, 1978, Pages 379-391, ISSN 0014-2999, [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(78\)90118-8](https://doi.org/10.1016/0014-2999(78)90118-8).
- 73) Detke MJ, Lucki I. Detection of serotonergic and noradrenergic antidepressants in the rat forced swimming test: the effects of water depth. *Behav Brain Res*. 1996;73(1-2):43-6. doi: 10.1016/0166-4328(96)00067-8. PMID: 8788475.
- 74) Bogdanova OV, Kanekar S, D'Anci KE, Renshaw PF. Factors influencing behavior in the forced swim test. *Physiol Behav*. 2013 Jun 13;118:227-39. doi: 10.1016/j.physbeh.2013.05.012. Epub 2013 May 14. PMID: 23685235; PMCID: PMC5609482.
- 75) T. Lomo Frequency potentiation of excitatory synaptic activity in the dentate area of the hippocampal formation *Acta Physiol. Scand.*, 68 (1966), p. 128
- 76) Lomo, Terje. (2003). The discovery of long-term potentiation. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*. 358. 617-20. doi: 10.1098/rstb.2002.1226.
- 77) Nicoll RA, Schmitz D. Synaptic plasticity at hippocampal mossy fibre synapses. *Nat Rev Neurosci*. 2005 Nov;6(11):863-76. doi: 10.1038/nrn1786. PMID: 16261180.
- 78) De Xing Zhang, William B. Levy, Ketamine blocks the induction of LTP at the lateral entorhinal cortex-dentate gyrus synapses, *Brain Research*, Volume 593, Issue 1, 1992, Pages

- 124-127,ISSN 0006-8993,[https://doi.org/10.1016/0006-8993\(92\)91273-H](https://doi.org/10.1016/0006-8993(92)91273-H).
- 79) McBride,K.; Slotnick, B.; Margolis,F.L. Does Intranasal Application of Zinc Sulfate Produce Anosmia in the Mouse?An Olfactometric and Anatomical Study . *Chem. Senses*. 2003,28: 659–670. DOI: 10.1093/chemse/bjg053.
 - 80) Hüttenbrink,K.B.; Hummel,T.H.; Berg,D.; Gasser,T.; Hähner,A. Olfactory Dysfunction: Common in Later Life and Early Warning of Neurodegenerative Disease . *Dtsch Arztebl Int* 2013; 110(1–2): 1–7.
 - 81) Jung ,A.Y.; Kim,Y.H. Reversal of Olfactory Disturbance in Allergic Rhinitis Related to OMP Suppression by Intranasal Budesonide Treatment. *Allergy Asthma Immunol Res*. 2020 Jan;12(1):110-124.
 - 82) Cleiton F. Machado,Thiago M. Reis-Silva, Cassandra S. Lyra, Luciano F. Felicio, and Bettina Malnic.Buried Food-seeking Test for the Assessment of Olfactory Detection in Mice. *Bio Protoc*. 2018 Jun 20; 8(12): e2897. Published online 2018 Jun 20. doi: 10.21769/BioProtoc.2897 .PMCID: PMC8275211.PMID: 34286006.
 - 83) Yang, M.; Crawley,J.N.; Simple Behavioral Assessment of Mouse Olfaction. *Curr Protoc Neurosci*. 2009 July ; CHAPTER: Unit–8.24. doi:10.1002/0471142301.ns0824s48.
 - 84) <https://randomizer.org/#randomize>
 - 85) Kaba,H.; Huang,G.Z. Long-term Potentiation in the Accessory Olfactory Bulb: A Mechanism for Olfactory Learning *Chem. Senses* .2005, 30 (suppl 1):150–151.doi:10.1093/chemse/bjh158.
 - 86) Heiko Braak, Kelly Del Tredici, Udo Rüb, Rob A.I de Vos, Ernst N.H Jansen Steur, Eva Braak, Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson’s disease, *Neurobiology of Aging*, Volume 24, Issue 2, 2003, Pages 197-211, ISSN 0197-4580, [https://doi.org/10.1016/S0197-4580\(02\)00065-9](https://doi.org/10.1016/S0197-4580(02)00065-9)).
 - 87) Thor, D.H., Flannelly, K.J. Anosmia and toxicity of topical intranasal zinc. *Psychobiology* 5, 261–269 (1977). <https://doi.org/10.3758/BF03335328>
 - 88) Peters JM, Hummel T, Kratzsch T, Löttsch J, Skarke C, Frölich L. Olfactory function in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: an investigation using psychophysical and electrophysiological techniques. *Am J Psychiatry*. 2003 Nov;160(11):1995-2002. doi: 10.1176/appi.ajp.160.11.1995. PMID: 14594747.
 - 89) Sohrabi HR, Bates KA, Weinborn MG, Johnston AN, Bahramian A, Taddei K, Laws SM, Rodrigues M, Morici M, Howard M, Martins G, Mackay-Sim A, Gandy SE, Martins RN. Olfactory discrimination predicts cognitive decline among community-dwelling older adults. *Transl Psychiatry*. 2012 May 22;2(5):e118. doi: 10.1038/tp.2012.43. PMID:

22832962; PMCID: PMC3365262.

90) Kelly JP, Wrynn AS, Leonard BE. The olfactory bulbectomized rat as a model of depression: an update. *Pharmacol Ther.* 1997;74(3):299-316. doi: 10.1016/s0163-7258(97)00004-1. PMID: 9352586.

91) The Role of the Amygdala and Olfaction in Unconditioned Fear in Developing Rats

Sean W. C. Chen, Alexei Shemyakin, Christoph P. Wiedenmayer; *Journal of Neuroscience* 4 January 2006, 26 (1) 233-240; DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2890-05.2006



EK 1: Etik Kurul Onayı



1993
BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KARARI		
TOPLANTI SAYISI	KARAR SAYISI	KARAR TARİHİ
07	20/13	14/09/2020

Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalında görev yapmakta olan Prof. Dr. Ş. Remzi Erdem tarafından yürütülecek olan DA20/16 nolu “Sıçanlarda anosmi ile bilişsel işlev bozulması arasındaki ilişkinin mekanizmalarının araştırılması: Ön çalışma” başlıklı araştırma projesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu tarafından incelendi ve etik açıdan uygun olduğuna oybirliği ile karar verildi.