T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA PROGRAMI

Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Çetin Hakan KARADAĞ

TRANSİENT RESEPTÖR POTANSİYEL VANİLLOİD 1 (TRPV1) AGONİSTİ KAPSAİSİN VE ANTAGONİSTİ KAPSAZEPİNİN FARELERDE KORKU KOŞULLANMA ÜZERİNE ETKİLERİ

(Doktora Tezi)

Dr. Murat ŞAHİN

Referans no: 10475421

EDİRNE –2022

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA PROGRAMI

Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Çetin Hakan KARADAĞ

TRANSİENT RESEPTÖR POTANSİYEL VANİLLOİD 1 (TRPV1) AGONİSTİ KAPSAİSİN VE ANTAGONİSTİ KAPSAZEPİNİN FARELERDE KORKU KOŞULLANMA ÜZERİNE ETKİLERİ

(Doktora Tezi)

Dr. Murat ŞAHİN

Destekleyen Kurum: TÜBAP-2019/121

EDİRNE –2022

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimimde ve tez çalışmalarımda sonsuz katkıları olan değerli danışman hocam Prof. Dr. Ç. Hakan KARADAĞ'a, Prof. Dr. Ahmet ULUGÖL'e, Prof. Dr. Dikmen DÖKMECİ'ye, Doç. Dr. Özgür GÜNDÜZ'e, Doç. Dr. Ruhan Deniz TOPUZ'a ve çok kıymetli merhum Prof. Dr. İsmet DÖKMECİ'ye, çalışmam boyunca yardımlarını esirgemeyen ve beni her zaman destekleyen aileme ve eşim Prof. Dr. Sevtap HEKİMOĞLU ŞAHİN'E ve TÜBAP'a teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ **1**
GENEL BİLGİLER **3**
ÖĞRENME VE BELLEK **3**
Bilginin Saklama Suresine Göre Bellek Tipleri **4**
Saklanan Bilginin Niteliğine Göre Bellek Tipleri **5**
KORKU BELLEĞİ **7**
Korku Koşullanma **7**
Bağlamsal ve İpuçlu Korku Öğrenme **9**
Korku Belleğinde Rol Alan Belirleyici Nörotransmiterler **9**
Kapsaisin **15**
Kapsazepin **15**
GEREÇ VE YÖNTEMLER **17**
BULGULAR **24**
TARTIŞMA **35**
SONUÇLAR **40**
KAYNAKLAR **43**
ŞEKİLLER **48**
TABLOLAR **51**
ÖZGEÇMİŞ **52**
EKLER

SİMGE VE KISALTMALAR

BA	Amigdalanın bazal nükleusu
BLA	Bazolateral amigdala
CeA	Amigdalanın santral nükleusu
CWS	Cold Water Stress
DG	Dentat girus
GABA	Gama aminobütirik asid
LA	Amigdalanın lateral nükleusu
LTP	Uzun Süreli Potansiyalizasyon
TRPV1	Transient Reseptör Potansiyel Vanilloid 1
mPFC	Medial prefrontal korteks
NADA	N-araşidonil-dopamin
CA1	*Cornu Ammonis* 1 alanı
CB_1	Kannabinoid 1 reseptörü
SOM	Somatostatin
NPY	Nöropeptid-Y

GİRİŞ VE AMAÇ

Transient Reseptör Potansiyel Vanilloid 1 (TRPV1) kanalları hücre membranı yerleşimli, içinde bir katyon kanalı bulunduran ve açıldığı zaman hücre içine kalsiyum girişine neden olan bir kanaldır. Bu kanallar ağrı modülasyonu ile ilgili olarak ilgi çeken kanallar arasındadır. Endojen kannabinoidlerin, kannabinoid reseptörler (CB1 ve CB2) yanında TRPV1 kanallarını da etkilemesi, endokannabinoidlerin rol oynadığı durumlarda bu kanalların da rol oynayabileceği düşüncesine yol açmaktadır.

Kapsaisin, iyi bilinen bir nörotoksik maddedir; küçük çaplı primer duyusal nöronların selektif dejenerasyonunu indükler ve sonuçta, nosisepsiyon dahil, periferde inflamatuvar yanıtın nörojenik komponentinde ve hedef dokuların eferent yolaklarında birçok kayıplara neden olur (1-8). Özellikle, septal çekirdekler, akkümbens ve interpedünküler çekirdekleri de içeren limbik yapılarda kapsaisin'e duyarlı nöronların terminallerinde dejenerasyon gözlenmiştir. Carobi ve arkadaşları (1) erişkin sıçanların neonatal tedavisinde kapsaisin'in uzaysal ve aktif sakınma görevlerinde öğrenme, bellek ve unutma üzerine etkilerini araştırmışlardır. Sonuçlar, ağrılı uyaranlara neonatal maruz kalmanın daha sonra aktif sakınma performansını artırdığını doğrulamıştır. Son çalışmalar, TRPV1 aktivasyonunun santral sinapslarda nörotransmiter salıverilmesini düzenlediğini göstermiştir (9,10). Dahası, TRPV1 geni silinmiş farelerde hipokampüs bağımlı öğrenme eksikliği ve sinaptik plastisitede azalma saptanmıştır (11).

Yakın zamanda yapılan çalışmalar, kapsaisin tarafından aktive edilen hipokampal TRPV1, stres altında uzaysal bellek geri çağırma bozukluğunu önlediğini ve stresli jüvenil sıçanların hipokampal CA1 alanında uzun süreli potansiyalizasyonu kolaylaştırdığını

göstermiştir. Ancak kapsaisinin sinaptik plastisite, yapı ve uzaysal belleği stres kaynaklı hasarlarda nasıl koruduğu bilinmemektedir (12).

Santral sinir sisteminde TRPV1; substansiya nigra, bazal gangliyonlar, hipokampal formasyon, lokus seruleus ve korteks dahil çeşitli beyin bölgelerinde ifade edilmektedir (13-15). Son zamanlarda, TRPV1'in çeşitli endojen ligandları karakterize edilebilmiştir (16). Bu intraserebral endovanilloidlerin daha yakından incelenmesi üzerine üç farklı lipit sınıfı ortaya çıkartılmıştır: [1] anandamid, [2] araşidonik asitin lipoksijenaz ürünleri ve [3] uzun zincirli, linear yağ asitli dopaminler [örn.N-araşidonil-dopamin (NADA)]. Bu endovanilloidlerin ikisi; anandamid ve NADA olup bunlar, aynı zamanda endokannabinoid aile üyesidir; kannabinoid reseptör tip 1'e (CB_1) bağlanmaktadırlar (9,16). Hem TRPV1 hem de CB1, hipokampal oluşum da dahil olmak üzere çeşitli beyin yapıları içinde kolokalize olmuştur. CB1 reseptörleri primer olarak akson terminallerinde ifade edilirken, TRPV1 postsinaptik dendritik uzantılarda ve hücre gövdesinde bulunabilmektedirler (15,17,18). CB1 aktivasyonu genellikle presinaptik terminallerde hücre içi kalsiyumda azalmaya yol açar ve böylelikle transmiter salıverilmesi azalır (19,20). Buna karşılık, anandamid tarafından TRPV1 aktivasyonu postsinaptik bölgelerde Ca^{+2} girişini artırır (21). Bu gözlemler, TRPV1 ve CB1'in duygusallık, biliş ve sinaptik plastisite de dahil olmak üzere belirli beyin fonksiyonları üzerinde zıt etki yapabileceği hipotezine yol açmıştır (15).

Kannabinoidlerin korku koşullanmada, özellikle sönme üzerine önemli bir rol oynaması nedeniyle, TRPV1 kanallarının da işe karışma olasılığının olduğunu düşünmekteyiz. Bu bilgilerden yola çıkarak çalışmamızda, TRPV1 aktivasyonu ve blokajının korku koşullanmanın herhangi bir aşamasında (edinim, konsolidasyon, geri çağırma, sönme ve rekonsolidasyon) herhangi bir rol oynayıp oynamadığının araştırılması amaçlanmaktadır.

GENEL BİLGİLER

ÖĞRENME VE BELLEK

Öğrenme ve bellek beynin türe özgü özelliklerin yansıtılması ve bağımsız hayatta kalınabilmesi için gerekli en önemli kognitif (bilişsel) fonksiyonlardandır. İki ayrı kavram olarak tanımlanmasına rağmen birbiriyle ilişkilendirilmiş tamamlayıcı bir süreçtir. Öğrenme ve bellek, çeşitli alt bileşenleri kapsar ve bu bileşenler farklı şekillerde yapılandırılabilir. Örneğin, onların zamansal boyutlarına odaklanabilir veya muhtelif bellek biçimlerini içerikleri veya edinme mekanizmaları sayesinde ayırt edebiliriz.

Öğrenme ve bellek kavramlarını açıklayacak olursak çevresel uyaranlarla kazanılmış davranış yanıtı öğrenmedir. Bu tanımda çevresel uyarana verilen yanıt değil de çevresel uyarıya karşı kazanılan tecrübelerden sonra verilen yanıtta davranış değişiminin olması öğrenmedir. Bellek ise öğrenilen bilgilerin depolanması olarak tanımlanabilir. Bellek ise öğrenilenlerin şifrelenmesi, depolanması, istemli veya istemsiz geri çağırılması ve hatırlanması mekanizmalarını içermektedir (22-24).

Öğrenme ve belleğin bilişsel yapısının karmaşık olduğu ve temel alt bileşenler arasındaki birçok etkileşim ve örtüşmeler göz önüne alındığında ne nöropsikolojik ne de nörobiyolojik modellerin tam olarak tatmin edici bir sınıflandırma sağlayamayacağı açıktır. Bellek, çalışmalarda birçok farklı gruplarda sınıflandırılmıştır. Kavramların anlaşılması karmaşık olduğu için genel olarak iki temel parametre üzerinden sınıflandırma yapılır.

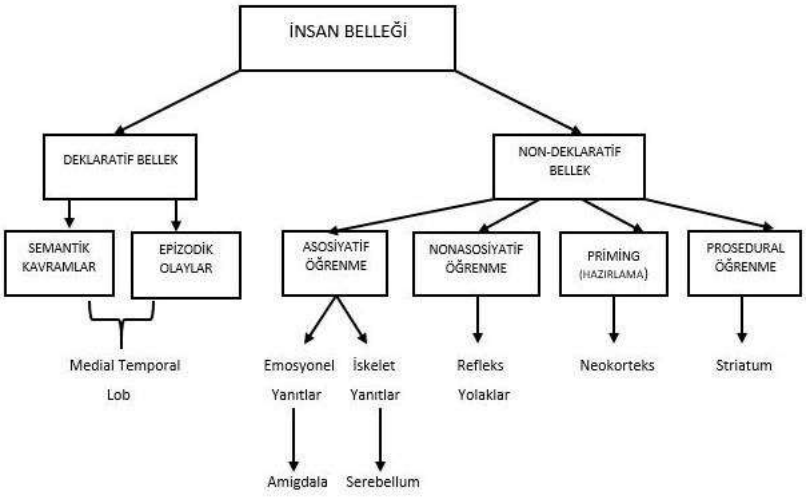
1. Bilginin saklanma süresine veya zaman parametresine göre
2. Saklanan bilginin niteliğine göre (22).

Bilginin Saklama Suresine Göre Bellek Tipleri

Kısa süreli bellek: Bazal davranışta değişikliğe sebep olan uyaranla karşılaşma sayısı veya uyaranın şiddetine bağlı olarak öğrenilen bilgi kısa süreli bellekte veya uzun süreli bellekte depolanır. Bellek tipleri kısa veya uzun süreli olabilir (23). Bilginin birkaç saniye veya dakika süresince depolandığı, sınıflandırılarak bilince ulaştırıldığı bellek fonksiyonu kısa süreli bellek olarak tanımlanabilir (23,24). Kısa süreli bellekteki bilgi, duyusal uyarılar ile yeni edinilmiş veya uzun süreli bellekten geri çağırılmış olan bilgidir. İki yönlü fonksiyon görebilen kısa süreli bellek bilgiyi alır ve bilgileri seçmeli olarak uzun süreli belleğe aktarır (23).

Kısa süreli bellek; duyusal bellek, kısa süreli depolama ve işler bellek olmak üzere üç ana bileşenden oluşabilir. Duyusal bellek ve kısa süreli depolama, yeni tanıştığınız bir kişinin yüzü gibi sadece yeni kazanılan bilgilerle ilgilidir. Ses işitme, dokunma, tat alma, görme, koklama gibi duyu organlarımızla alınan uyarılar kısa süreli belleğin duyusal kısmından geçerek bellekte yer alırlar (23). Uyarı sinyalinin işitsel (ekoik) veya görsel (ikonik) olmasına göre duyusal bellek ikiye ayrılabilir (24). Bilginin işlenmesinden ve bilince ulaşmasından kısa süre sonra bilgilerin kısa süreli tutulması kısa süreli depolamadır. Kısa süreli depolamada bilgiler, farkında olduğunuz bilgilerdir ve bu bilgiler kendiliğinden kısa süre depolanabilir. İşler belleğin ancak bilgi işleniyorsa devreye girdiği bilinir. Yeni edilen bilgi işler bellekte işlenir ve kısa süreliğine kullanılır (23,24). İşler belleğe örnek olarak telefon numarasının akılda tutulması verilebilir (25). İşler bellek, bilginin yönlendirilmesi ve geçici depolanmasını ifade eden terimdir.

Uzun dönem bellek: Kısa dönem bellekte çok kısa süreler ile bilgiler depolanırken uzun dönem bellekte uzun zaman aralıklarında hatta yaşam boyu bilgiler saklanabilir (23,26). Uzun dönem belleğin oluşması ve bilgilerin uzun süreli saklanabilmesi yeni sinapsların oluşması, sinaptik gücün artması, nörotransmiter salınması ve protein sentezi ile olmaktadır (26,27). Kısa süreli bellek, hücresel bir bileşiğin tekrar tekrar uyarılmasını sağlarken, uzun süreli bellek, hipokampal fonksiyonlara yüksek oranda bağımlı olduğu düşünülen konsolidasyon süreçlerinden önce gelen sinaptik seviyede yapısal değişikliklere yol açar. Saklanan bilginin içeriğine göre belleğin sınıflandırılması ve ilişkili olduğu alanlar Şekil 1'de gösterilmiştir.



Şekil 1. Uzun dönem bellekte saklanan bilginin niteliğine göre belleğin gruplandırılması ve ilişikli beyin bölgeleri (23)

Saklanan Bilginin Niteliğine Göre Bellek Tipleri

- Deklaratif bellek
- Non-deklaratif bellek

Deklaratif (eksplisit/açık/bildirilebilen) bellek: Yerlerin, olguların ve olayların bilinçli olarak hatırlanmasıdır (28). Müzik, sesler, fikirler, duygular, kokular, yüzler ve kelimeler deklaratif belleğe ait olan kavramlar olup bilinçli hatırlamanın ürünleridir (28,29).

Medial temporal lob uzun süreli deklaratif belleğin saklanmasında önemli rol üstlenmektedir. Nörolojik amnezi, medial temporal lob hasarının oluştuğu durumlarda deklaratif belleğin kaybına bağlı olarak gelişmektedir (29).

Deklaratif bellek kendi içinde **semantik** ve **epizodik bellek** şeklinde ikiye ayrılır. Epizodik bellek, bir mekân ve zamana ait oluşmuş bir aktiviteyi tekrar hatırlamayı içeren bellektir. Semantik bellek ise herkes için genel olarak geçerli olan bilgileri içeren bellektir (28). Örneğin, ‘geçen Salı marketin kapatıldığını hatırlamak’ epizodik bellekle, ‘marketin sorunu olduğunu bilmek’ ise semantik bellekle ilgilidir.

Bilgiler deklaratif bellekte kodlama, depolama, konsolidasyon (pekiştirme) ve geri çağırma işlemlerinden geçer. Edinilen yeni bilginin kaydedilmesi ve bellekteki başka bilgilerle ilişkisinin kurulması kodlama, edinilen bilgilerin bellekte saklanması depolama, kararsız (labil) bir bilginin gen ekspresyonu, protein sentezi ve sinapsların güçlendirilmesiyle konsolidasyon, depolanmış bilginin gerekli durumlarda hatırlanarak tekrar kullanılması geri çağırma olarak adlandırılır (22).

Deklaratif olmayan (non-deklaratif/implisit/örtük/bildirilemeyen) bellek: Bilinç dışı davranışlarla ve alışkanlık, beceri gibi bilinçli bellek yeteneğine ihtiyaç duyulmadan

kazanılan, performans yoluyla sergilenen bellek çeşididir (30). Araba kullanmak, ayakkabı bağlamak veya yazı yazmak deklaratif olmayan belleğe örnek verilebilir (24).

Deklaratif olmayan bellek dört başlıkta incelenebilir.

1. Assosiyatif öğrenme (klasik koşullanma ve edimsel koşullanma): Bu öğrenme şeklinde iki uyarı arasındaki ilişki ya da bir uyarı ile bir davranış arasındaki ilişkinin öğrenilmesi incelenir. Klasik koşullanma ve edimsel koşullanma olarak sınıflandırılmaktadır.

Klasik koşullanma refleksif süreçlere dayanır. Ivan Pavlov tarafından ilk olarak bildirilmiş olan klasik koşullanma, iki uyaranın birbiriyle eşleştirildiği ve rekleksif süreçlerle ilerleyen öğrenme biçimidir. Klasik koşullanmada temel prensip, iki uyaranı birbirine eşleştirmektir. Koşullu uyaran; zayıf ya da hiç yanıt oluşturmayan dokunma, ses, ışık gibi uyaranlardır. Koşulsuz uyaran; salivasyon, ayağını geri çekme gibi belirgin yanıt oluşturacak yiyecek ve şok gibi uyaranlardır. Pavlov'un deneyinde belirgin bir yanıt oluşturan yiyecek gibi koşulsuz uyaran ile, yanıt oluşturmayan veya zayıf yanıt oluşturan ses gibi koşullu uyaran eşleştirilir. Koşulsuz uyaran tekrarlayan uygulamalar sonrası kaldırıldığında sadece koşullu uyaranın uygulanması ile koşulsuz uyaranın neden olduğu cevabın oluştuğu görülür (22,23).

Edimsel koşullanma ödül ve ceza temeline dayanan davranış sonuç ilişkisini açıklayan öğrenme biçimidir. Bir davranışın sonucu olumluysa davranış tekrar etmeye devam eder. Ancak davranışın sonucunda rahatsızlık verici bir uyaran veriliyorsa veya sonuç olumsuzsa davranışın tekrarı yapılmaz (22).

2. Non-assosiyatif öğrenme (habituasyon ve sensitizasyon): Habituasyon (alışma) rahatsız edici olmayan bir uyarana verilen yanıtın, uyaranın ardışık verilmesi durumunda giderek azalması yani bu uyarıya verilen tepkinin azalması ya da kaybolmasıdır.

Sensitizasyon (duyarlılaşma) ise, gelişmiş bir ühabitüasyondan sonra rahatsızlık verici veya zararlı bir uyaranın uygulanmasıyla verilen yanıtta ühabitüasyonun ortadan kalkması yani yanıtın tekrar güçlenmesidir (22).

3. Prosedural öğrenme (motor öğrenme, beceri): İlk defa öğrenilen beceri ve alışkanlıklar bilinçli yapılırken, öğrenildikten sonra hatırlanarak bilinç dışı yapılır. Yürümek, bisiklete binmek, yabancı dil konuşmak örnek verilebilir (23).

4. Priming (hazırlama): Kazanılan deneyimler ile aynı ya da bağlantılı bir uyarıyla daha önceden karşılaşmanın neticesi olarak, bu uyarıyla tekrar karşılaşıldığında uyarının tanınması, kategorize edilmesi ve verilen yanıtın oluşumunda değişim veya yanıtın hızlanması, veriminin artması görülebilir (31).

KORKU BELLEĞİ

Hayatta kalma çabasını sağlayan ve güçlü bir duygu olan korku, öğrenme ve bellek çalışmalarında araştırmalara yol açmıştır. Korku, organizmanın doğuştan kazanılmış veya sonradan öğrenilmiş yanıtlar oluşturarak tehlikelere karşı başa çıkmak için organizmayı hazırlayan nörofizyolojik süreçler olarak tanımlanabilir (32). Kaygı, diğer bir deyimle anksiyete ve stres korku ile bağlantılı kavramlardır. Sonuç olarak korku, kaygı ve stresi oluşturur. Korkunun bir tehdide karşı meydana gelen tepki olması onu anksiyeteden farklı tutar. Posttravmatik stres bozukluğu gibi hastalıkların iyileştirilmesinde korku belleğinin silinmesi ile ilgili yapılan bilimsel çalışmalar oldukça önem taşımaktadır (33). Korku genellikle olayla ilgili ipuçları ve bağlamlar aracılığı ile meydana gelirken, anksiyete bu tetikleyiciler olmadığında da meydana gelebilir (34). Korku belleği, travmatik olaylarla ilgili meydana geldiğinden, uzun süreli oluşu ve gücü ile bellek türleri içinde ayırt edilebilir. Farklı başka bir yönü ise neredeyse bir anda oluşup hayat boyunca bozulmadan kalabilmesidir (35).

Korku Koşullanma

Davranış psikolojisinde assosiyatif öğrenmenin biçimlerini incelemek için korku koşullanma modeli kullanılmaktadır. Bu modelde, rahatsızlık oluşturan koşulsuz bir uyaranla birlikte, rahatsızlık oluşturmayan koşullu duyusal bir uyarana maruz bırakılmak suretiyle, zamanla rahatsızlık oluşturmayan koşullu uyarandan da korkma öğrenilir (36).

Korku belleği, bağlamsal korku koşullanma ve ipuçlu korku koşullanma testlerinden oluşan iki klasik koşullanma ile değerlendirilir. Bu iki testte de hayvanda strese yol açan elektrik şoku gibi koşulsuz uyaran, rahatsızlık vermeyen duyusal bir koşullu uyaran ile eşleştirilir (33,34,37). Koşullu uyaran bağlamsal korku koşullanmada genellikle çevresel iken, ipuçlu korku koşullanmada genellikle koku, ses veya ışıktır (34,36).

Koşullu uyaranla ilişkilendirilen korku belleğinin oluşması, koşullu ve koşulsuz uyaranın tekrarlanarak bir arada verilmesi ile oluşur. Korku belleği gelişen hayvanın, koşulsuz uyaran kaldırılıp sadece koşullu uyarana maruz bırakıldığında da korku tepkileri verdiği görülür. Bu tepkiler kemirgenlere özgü savunma tepkisi olan donma gibi hareketsiz kalma davranışı ile birlikte otonomik ve endokrin yanıtlar olan defekasyon sıklığında ve stres hormon seviyelerinde, kalp atış hızı ve kan basıncında artma şeklindedir (34,36).

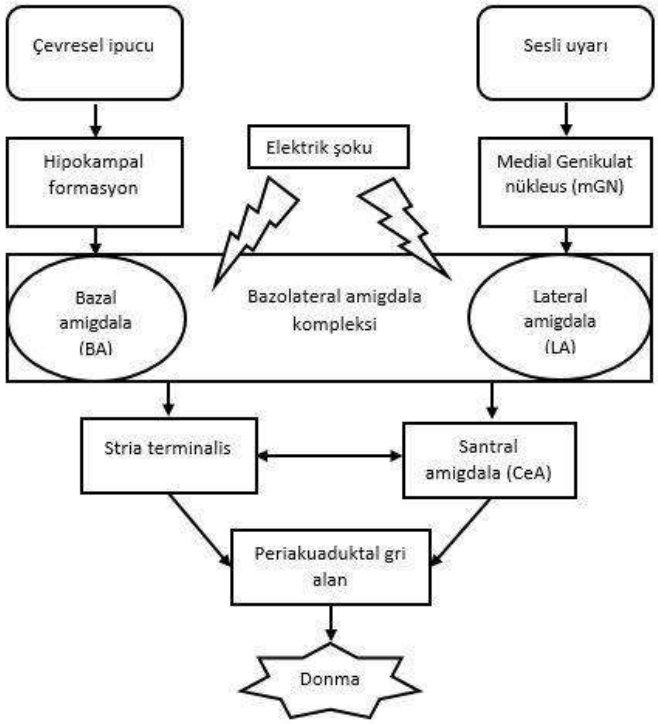
Korku belleği, korku koşullanma testleri ile incelendiğinde edinim (*acquisition*), konsolidasyon (*consolidation*) ve sönme (*extinction*) olmak üzere 3 farklı basamaktan oluşur (38,39). Korku belleği, edinim aşamasında bağlam ve şok birbiri ile eşleştirilerek oluşturulur. Edinimden sonra denekler kafeslerine geri geldiğinde konsolidasyon aşaması gerçekleşir.

Denekler aynı bağlamla şok uygulanmadan tekrar karşılaştıklarında korku belleği tekrar pekiştirilir (*reconsolidation*) veya unutulur (söner). Genellikle şok uygulamaksızın, bağlama kısa süreli maruz kalma, korku belleğinin tekrar konsolidasyonuna, uzun süreli maruz kalma ise bağlam için yeni bir bellek üreterek korku belleğinin sönmesine sebep olur (39,40).

Korku belleği oluşmasında rol oynayan ana beyin bölgesi lateral ve bazal çekirdekleri (bazolateral ve bazomedial nükleuslar) içeren bazolateral amigdala kompleksidir (32,41). Diğer öne çıkan beyin bölgeleri hipokampüs, medial genikulat nükleus (mGN), anterior singulat korteks ve ventral periakuaduktal gri bölgedir (vPAG) (41). Bağlamsal korku koşullandırmasının hipokampüs ve amigdalaya bağlı olduğuna dair güçlü kanıtlar olup, ipuçlu korku koşullanma amigdala bağımlıdır (42).

Bağlamsal korku koşullanmada, amigdalanın bazal çekirdeğinde (BA) eşleştirilmek üzere koşullu uyarana ait bilgiler hipokampal formasyon ile elektriksel şok gibi koşulsuz uyarana ait bilgiler iletilir. İpuçlu (işitsel) korku koşullanmada ise koşullu uyaran olan sesli uyaranla ilgili bilgiler, mGN aracılığı ile amigdalanın lateral çekirdeğine (LA) iletilir ve burada koşulsuz uyarandan (elektriksel şok) gelen bilgilerle eşleşir. BA ve LA'ya gelen bağlamsal ve ipuçlu korku koşullanma ile ilgili bilgiler, bazolateral amigdala kompleksinde işlenir ve filtrelenir. Daha sonra stria terminalis'e ve amigdalanın korku yanıtını kontrol eden çıkış çekirdeği olan santral nükleusuna (CeA) iletilir (41). LA, CeA ile doğrudan veya arada bulunan interkalat hücreleri aracılığıyla ve hipokampüsten gelen bağlama ait bilgilerin eşleştirildiği BA aracılığı ile bağlantı kurar (38). CeA'ya gelen bilgi korkunun sempatik yanıtlarını düzenleyen lateral hipotalamusa ve donma yanıtını düzenleyen orta beyindeki periakuaduktal gri alana yansıtmayı yapar (33). Sonuç olarak periakuaduktal gri alan yönetiminde korku yanıtı olan donma oluşur (33,41; Şekil 2).

Bağlamsal korku koşullanmada, hayvanda koşullu uyaran ve koşulsuz uyaranın beraber uygulanması ile oluşan yanıtın diğer bir deyişle korku tepkilerinin, koşulsuz uyaran olmadan koşullu uyaranın tek olarak günlerce veya haftalar boyunca tekrar edilerek uygulanması ile yanıtın azalması veya ortadan kalkması, korkunun sönmesi olarak nitelendirilir (33). Hipokampüs, bazolateral amigdala ve/veya infralimbik mPFC'de glutamat N-metil D-aspartat (NMDA) reseptörü aracılı plastisite korkunun sönmesi için gereklidir (33,42,43). Aynı bölgelerde test sonrası protein sentezi, sönmenin bellekte konsolidasyonu için gereklidir (33).



Şekil 2. Klasik korku koşullanmanın basitleştirilmiş sinirsel devreleri (40).

Bağlamsal ve İpuçlu Korku Öğrenme

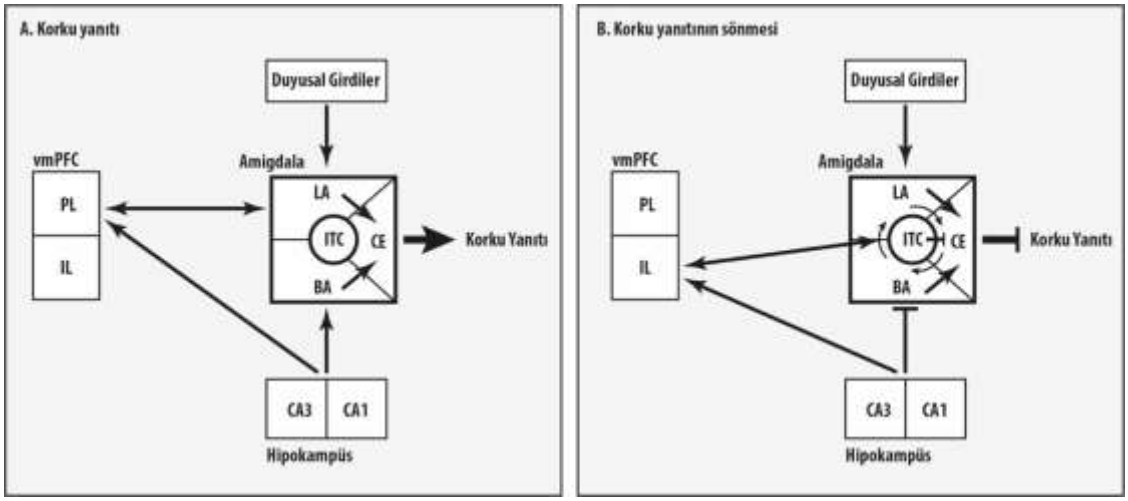
Bağlamsal korku öğrenme, hipokampüs ve amigdala gerektiren bir öğrenme görevidir ve bir öznenin hoş olmayan bir uyaranı belirli bir ortamla ilişkilendirme yeteneğini test eder (44). Öğrenme, farenin ayak şokunu aldığı ortama tekrar konduğunda gösterdiği donma davranışıyla ölçülür. İpuçlu korkuyla öğrenme, farelerin belirli bir işaretten (ses, ışık vb.) sonra bir ayak şoku aldığı, amigdala bağımlı bir öğrenme aktivitesidir. Öğrenme, ayak şokuyla ilişkilendirilen ipucuna verilen donma davranışıyla ölçülür. Bağlamsal korku koşullandırması hipokampal ve amigdalanın aracılık ettiği bir bellek iken, ipuçlu korku koşullandırmasının gerçekleşmesinde sadece amigdala rol oynamaktadır.

Korku Belleğinde Rol Alan Belirleyici Nörotransmiterler

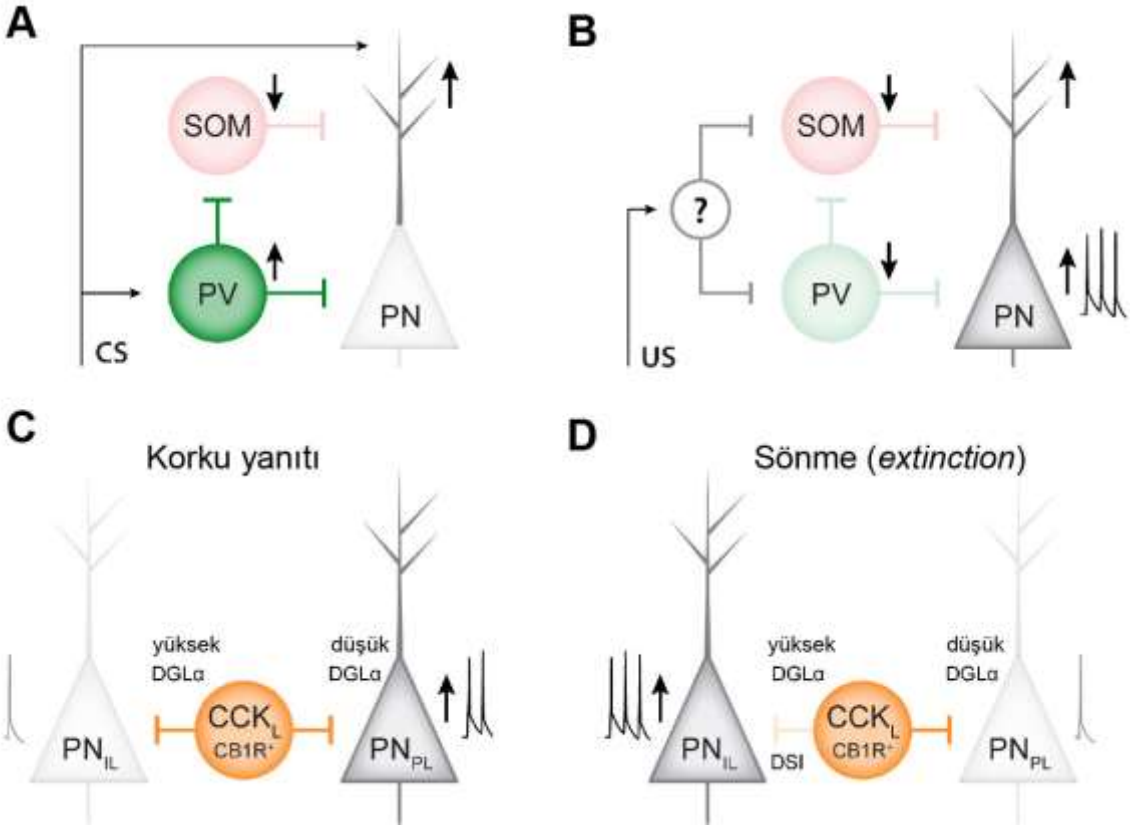
Korku belleğinin oluşması, sönmesi ve yeniden oluşmasında görev alan glutamat temel eksitatör nörotransmiter, gama aminobütirik asit (GABA) ise temel inhibitör nörotransmiterdir (33). Korku belleğinin edinilmesi ve konsolide edilmesinde amigdala ve hipokampüsteki $GABA_A$ reseptörleri görev almaktadır. Korku belleği eğitimleri öncesi veya sonrası GABAerjik transmisyonu artıran ilaçlar uygulandığında korku yanıtlarının azalmasına neden olmaktadır (33).

Bazolateral amigdala'daki (BLA) nöronların %80'i eksitatör temel nöronlar (*principal neurons, PN*) olup nöromediyatör olarak glutamat içerirler.-BLA'daki nöronların %20'sini ise

inhibitör GABAerjik ara nöronlar oluşturmaktadır. GABAerjik inhibitör ara nöronlar kalbindin (CB) ve kalretinin ekspresyonlarına dayanarak CB ve kalretinin nöronları şeklinde 2 ana alt tipe ayrılırlar. CB ara nöronları BLA'daki ara nöronların yaklaşık %60'ını oluşturmaktadır ve eksprese ettikleri maddelere dayanarak 4 alt tipe ayrılırlar: 1. Parvalbümin- (PV), 2. Somatostatin- (SOM), 3. Nöropeptid Y- (NPY) ve 4. Kolesistokinin- (CCK) eksprese eden ara hücreler. Parvalbümin eksprese eden hücreler başlıca, temel nöronların perisomatik bölgesini hedeflemektedir ve ayrıca SOM eksprese eden hücreler üzerine de sinyal gönderirler. SOM-eksprese eden hücreler ise temel nöronların dendritleri üzerinde inhibitör bir etkinliğe sahiptir. Koşullu uyaran (CS) PV-eksprese eden ara nöronları aktive ederek temel nöronların hücre gövdesinde ve SOM-eksprese eden hücreler üzerinde inhibitör etki oluşturur. SOM-eksprese eden hücrelerin inhibe edilmesi, temel hücrelerin dendritleri üzerindeki inhibitör etkinliği ortadan kaldırır (disinhibisyon). Böylelikle, temel nöronların dendritleri üzerine ulaşan CS'nin güçlü bir postsinaptik depolarizasyona neden olmasına ve bunun sonucu olarak CS uyarılarının uzun süreli potansiyalizasyon (LTP) oluşturmasına neden olur (45,46). Bazolateral amigdala'daki temel nöronların bazıları medial prefrontal korteks'in (mPFC) prelimbik (PL) kısmına projeksiyon yapar; bu nöron tipine CS-up veya *fear expression* nöronu (PN_{PL}) adı verilir (Şekil 3 ve 4). Buna karşılık BLA'daki bazı temel nöronlar ise mPFC'nin infralimbik (IL) kısmına projeksiyon yapar; bu nöron tipi de *extinction* nöronu (PN_{IL}) olarak adlandırılır. PN_{IL} ve PN_{PL} nöronu üzerinde sinaps oluşturan inhibitör bir ara nöron tipi bu iki nöronun aktivitesini düzenlemektedir ve korku öğrenme ve korku *extinction*'ı (sönme) arasındaki geçişi kontrol etmektedir. Bu ara nöron tipi kolesistokinin eksprese etmektedir (CCK_L) ve PN üzerine olan uzantılarında kannabinoid reseptör tip 1 (CB1R) eksprese ederler. Bu reseptörler presinaptik uçtan mediyatör salıverilmesinin baskılanmasına neden olmaktadır. Kannabinoid reseptörlerini uyaran endokannabinoidin kaynağı PN olup, bunu diasilgliserol lipaz α (DGLα) tarafından üretilen 2 araşidonil gliserol (2-AG) ile gerçekleştirirler. DGLα enzim aktivitesi PN_{IL}'de yüksek, PN_{PL}'de düşüktür. PN_{IL} aktive edildiğinde fazla üretilen 2-AG, CB_1 reseptörleri uyararak kendisi üzerine olan inhibitör etkiyi baskılayacaktır; buna karşılık PN_{PL} nöronlarda DGLα ekspresyonu daha düşük olduğundan, aktive edildiklerinde üretilen 2-AG miktarı düşük olmaktadır ve kendisi üzerine olan inhibitör tonusu ortadan kaldıramamaktadır. Net etki, PN_{IL} ile PN_{PL} arasında aktivitenin PN_{IL} yönüne kaymasıdır, bu kayma korku yanıtının baskılanması, yani sönme (*extinction*) mekanizması olarak kabul edilmektedir. Ayrıca, kannabinoid agonistlerinin sönme üzerindeki artırıcı etkilerinin bir mekanizması olarak da (Şekil 3 ve 4) görülmektedir (46,47).

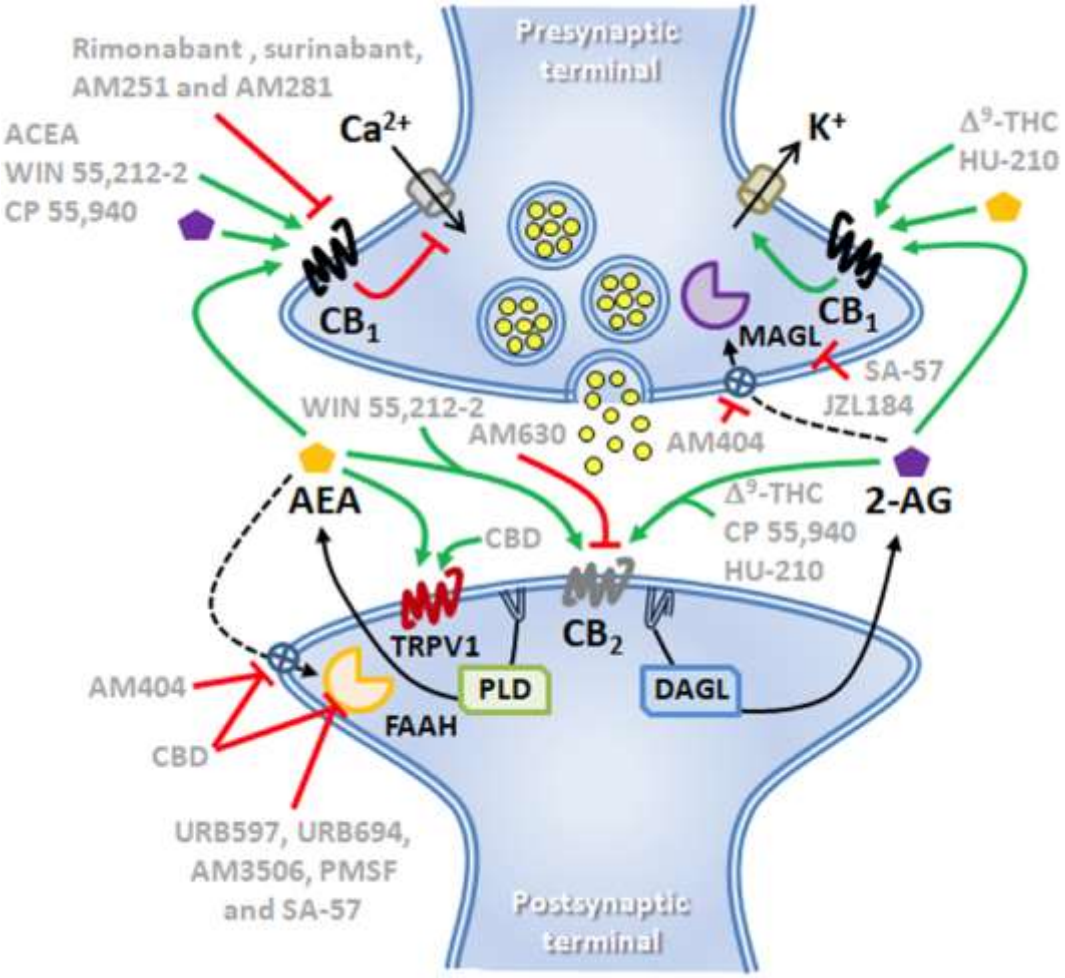


Şekil 3. Korku yanıtının oluşmasında rol oynayan genel mekanizma (A) ve sönme (extinction) sürecindeki genel mekanizma (B) (47).



Şekil 4. Korku yanıtının düzenlenmesi. A. Koşullu uyaran (CS) ve B. Koşulsuz uyaran (US) ile temel nöron (PN) uyarımı. C. Korku ekspresyonu ve D. Sönme sırasında infralimbik (IL) ve prelimbik (PL) medial prefrontal kortekse (mPFC) projeksiyon yapan PN'ler arasındaki aktivite kaymasını sağlayan GABAerjik ara nöron (CCK_L) aktivitesi (46).

Endojen kannabinoidler: Endokannabinoid (ECS) sistemi, çeşitli davranışsal ve beyin işlevlerindeki rolü ve anksiyete bozuklukları da dahil olmak üzere nöropsikiyatrik hastalık durumlarında terapötik bir hedef olarak dikkatleri üzerine çekmiştir. Endokannabinoid sistemi (ECS), kannabinoid reseptörleri (CB_1 ve CB_2), endojen lipid ligandları (endokannabinoidler) ve bu bileşikleri sentezleyen ve parçalayan enzimlerden oluşur. Anandamid (AEA) ve 2-araşidonoilgliserol (2-AG) en iyi çalışılan endokannabinoidlerdir, ancak kimyasal olarak benzer diğer bileşikler, endokannabinoidler veya N-araşidonoil-dopamin (NADA), noladin eter dahil olmak üzere endojen kannabinoid benzeri bileşikler olarak önerilmiştir. CB_1 ve CB_2 reseptörleri, kannabinoidler için tek farmakolojik hedef değildir, aynı zamanda aktivite gösteren transient reseptör potansiyel vanilloid 1 (TRPV1) kanalları, GPR55, PPARα ve PPARy da mevcuttur (48).



Şekil 5. Beyin endokannabinoid (eCB) sistemi ve burada tartışılan ilaçların etki etmesi önerilen ana farmakolojik hedefleri (49).

Şekil 5'te görülebileceği gibi, ECB'ler, postsinaptik terminallerde talep üzerine üretilirler; anandamid (AEA), fosfolipaz-D (PLD) tarafından üretilirken ve 2-araşidonoilgliserol (2-AG), diasilgliserol lipaz (DAGL) tarafından üretilir. AEA ve 2-AG, sinaptik aralığa doğru difüze olur. Fitokanabinoid Δ^9-tetrahidrokannabinol (Δ^9-THC) ve sentetik kannabinoidlere (WIN 55,212-2, CP 55,940, HU-210) benzer olarak metabotropik presinaptik CB_1 reseptörlerini ve postsinaptik CB_2 reseptörlerini aktive edebilirler. Presinaptik CB_1 reseptörlerinin uyarılması K^+ kanallarını açarak ve Ca^{2+} kanallarını kapatarak depolanmış nörotransmiterlerin salıverilmesini azaltır. AEA ve 2-AG, muhtemelen AM404 tarafından bloke edilebilen özel bir taşıyıcı aracılığıyla post- veya presinaptik sinir terminallerine yeniden girebilir, ardından sırasıyla yağ asidi amid hidrolazı (FAAH) ve monoasilgliserol lipaz (MAGL) tarafından katabolize edilirler. URB597, URB694, AM3506 ve PMSF, FAAH inhibitörleridir. JZL184, MAGL'yi inhibe eder. SA-57 ise, ikili bir FAAH/MAGL inhibitörüdür. Yağ asidi bağlayıcı proteinler (gösterilmemiştir), hidroliz için AEA ve ilgili N-asilletanolaminleri FAAH'a ileten hücre içi taşıyıcılardır. Rimonabant (SR141716), surinabant, AM251 ve AM281; CB_1 reseptör antagonistleri/ters agonistleridir. Hem AM630 hem de SR144528 (gösterilmemiştir); CB_2 reseptör antagonistleri/ters agonistlerdir. Kannabidiol (CBD), FAAH aktivitesinin inhibisyonu ve AEA'nın geri alımının (uptake) blokajı, geçici reseptör potansiyel vanilloid 1 (TRPV1) kanallarının aktivasyonu ve serotonin tip-1 A reseptörleri (gösterilmemiştir) dahil olmak üzere birçok etki mekanizması aracılığıyla hareket eder (49).

Endojen kannabinoidlerin CB_1 ve CB_2 etkileri yanında TRPV1 kanallarını da etkilemesi, endokannabinoidlerin rol oynadığı durumlarda bu kanalların da rol oynayabileceği düşüncesine yol açmaktadır.

Transient receptor potential vanilloid receptor 1 **(TRPV1)**: TRPV1 ilk olarak arka kök, trigeminal ve nodos gangliyonlarda eksprese edilmiş seçici olmayan bir iyon kanal proteinidir. Vanilloid reseptörlerin aktifleşmesi farklı uyaranlarla ve bunların uyarım aralıklarındaki farlılıklarla gerçekleşmektedir. Reseptörlerin aktivasyonu ısı, protonlar, lipidler, forboller, fosforilasyon, ekstraselüler osmolarite ve basıncın değişmesi ve hücrelerarası kalsiyum iyon miktarının tükenmesi ile değişmektedir. Ayrıca kapsaisin gibi vanilloidler kanalları aktive eder.

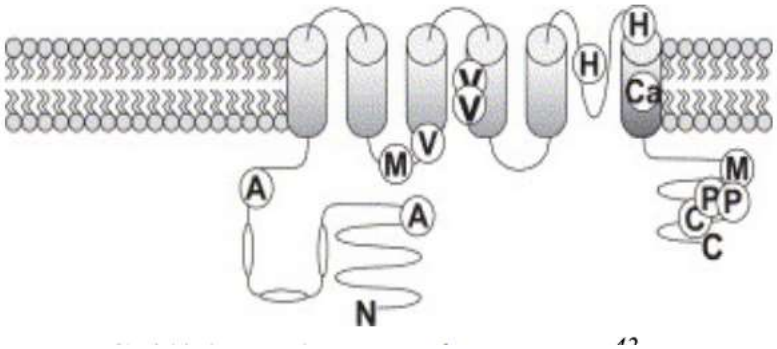
Vanilloidler eksojen ve endojen olarak ikiye ayrılırlar. Organizmada bunların bağlandıkları reseptörlere vanilloid reseptör adı verilir. Endojen vanilloidlere anandamid, ekzojen vanilloidlere ise kaktüste bulunan rezinferatoksin ve acı kırmızı biberin etken maddesi olan kapsaisin örnek olarak gösterilebilir. Rezinferotoksin ve kapsaisin'in ortak vanilloid özelliklerine dayanılarak yapılan çalışmalar, bu iki bileşiğin yapısal olarak ilişkili olduklarını

ortaya koymuştur. Yapılan çalışmalar ile, deneysel olarak rezinferotoksin'in kapsaisin'e benzer şekilde eksitasyon ve desensitizasyona yol açtığı, fakat bu etkisinin kapsaisin'den bin kat daha zayıf şiddette olduğu saptanmıştır (50). Kapsaisin'in spesifik olarak bağlandığı reseptöre kapsaisin reseptörü ya da vanilloid reseptör 1 (TRPV1 ya da VR1) adı verilmiştir (7,51). VR1, yaklaşık 95 kDa ağırlığında ve 426 aminoasit içeren bir proteindir. İyon kanal reseptörü olan VR1, TRP (*Transient Receptor Potential*) ailesinde yer alır. TRP ailesi en az 6 alt familyadan oluşmaktadır (51).

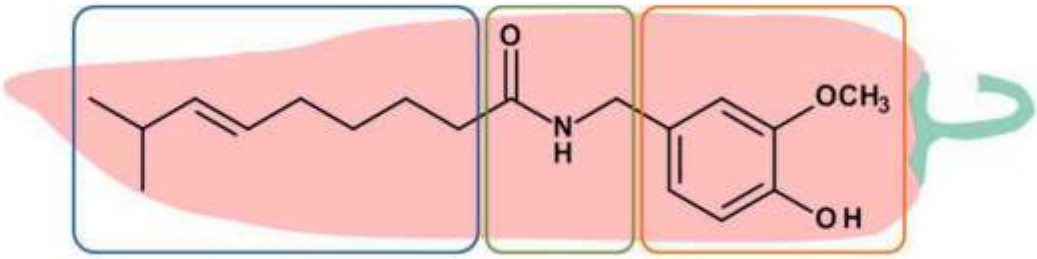
Transient Reseptör Potansiyel Vanilloid 1 (TRPV1) kanalları, hücre membranında yerleşik, içinde katyon kanalı bulunan, açıldığı zaman hücre içine kalsiyum girişi sağlayan bir reseptör olup ağrı modülasyonunu sağlar (9-10).

Son çalışmalar, TRPV1 aktivasyonunun santral sinapslarda nörotransmiter salıverilmesini düzenlediğini göstermiştir (9,10). TRPV1 geni silinmiş farelerde hipokampüs bağımlı öğrenme eksikliği ve sinaptik plastisitede azalma saptanmıştır (11). Yakın zamanda yapılan çalışmalar, kapsaisin tarafından aktive edilen hipokampal TRPV1'in, stres altında uzaysal bellek geri çağırma bozukluğunu önlediğini, stresli jüvenil sıçanların hipokampal CA1 alanında uzun süreli potansiyalizasyonu (LTP) kolaylaştırdığını göstermiştir. Ancak kapsaisin'in sinaptik plastisite, yapı ve uzaysal belleği stres kaynaklı hasarlarda nasıl koruduğu bilinmemektedir (12).

Hem TRPV1 hem de CB_1, hipokampal oluşum da dahil çeşitli beyin yapıları içinde kolokalizedir; CB1 reseptörleri primer olarak akson terminallerinde, TRPV1 postsinaptik dendritik uzantılarda ve hücre gövdesinde bulunur (15,17,18).



Şekil 6. VR1 reseptörünün yapısı (51).



Şekil 7. Kapsaisin'in yapısı (52,53).

CB_1 aktivasyonu presinaptik terminallerde hücre içi kalsiyumda azalmaya yol açar (19) bu nedenle transmiter salıverilmesi azalır (20). Buna karşılık, anandamid tarafından TRPV1 aktivasyonu postsinaptik bölgelerde Ca^{2+} girişini artırır (21).

Kapsaisin

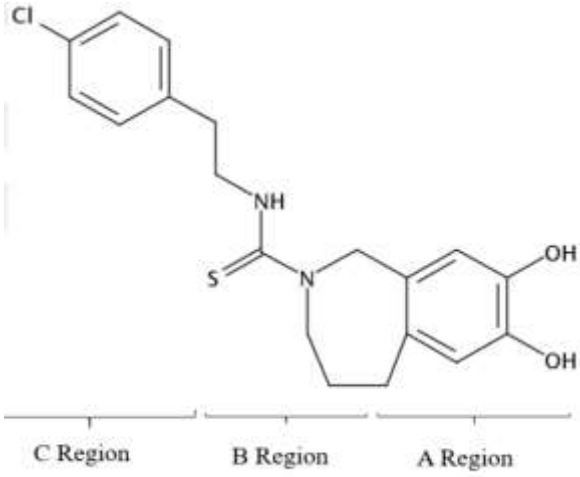
Kırmızı acı biber, *Capsicum annuum* olarak isimlendirilir ve *Solanacea* familyasına ait bir bitkidir. Acı biberin etken maddesi olan **kapsaisin**; yakıcı, acı, beyaz ve kokusuz özellikte bir alkaloid ($C_{18}H_{17}NO_3$) bir maddedir. Kapsaisin'in kuru ağırlığı biberde ortalama 0,83-1,32 mg/g'dır. 1919 yılında kapsaisin'in kimyasal yapısının vanilloid olduğu tespit edilmiştir (52).

Kapsaisin, küçük çaplı birincil duyu nöronlarının seçici dejenerasyonunu indükleyen ve sonuç olarak nosisepsiyon, inflamatuvar yanıtın nörojenik bileşeni ve periferik hedef dokularda eferent eylemler dahil olmak üzere birçok defisitlere neden olan, iyi bilinen bir nörotoksik maddedir (1-8).

Carobi ve arkadaşları (1), erişkin sıçanların neonatal tedavisinde kapsaisin'in uzaysal ve aktif sakınma görevlerinde öğrenme, bellek ve unutma üzerine etkilerini araştırmışlardır. Sonuçlar, ağrılı uyaranlara neonatal maruz kalmanın daha sonra aktif sakınma performansını artırdığını doğrulamıştır

Kapsazepin

Kapsazepin, TRPV1'in tanımlanan ilk antagonistidir. Kapsaisin'in kimyasal omurgasını değiştirerek elde edilen sentetik bir analogdur. Hayvanlarda anti-hiperaljezik ve anti-inflamatuvar etki gösterir (53).



Şekil 8. Kapsazepin 2 boyutlu yapısı. A Bölgesi hidrofilik aromatik bir halkadır, B Bölgesi tiyoüredir ve C Bölgesi bir R grubudur.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışma Trakya Üniversitesi Hayvan deneyleri Yerel Etik Kurulu Tarafından 25.05.2018 tarih ve 5 no'lu oturumda 2018.05.05 karar no'su ve TÜHADYEK-2018/22 protokol no'su ile onaylandı (EK 1). Çalışmamız İyi Laboratuvar Uygulamaları Kılavuzu ve Hayvan Etiği ve Evrensel İlkelerine uygun gerçekleştirildi. Bu çalışma Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi tarafından TÜBAP 2019/121 kayıt numarası ile desteklenmiştir.

Bu çalışmada Balb/c türü 2-3 aylık, 20-30 gram ağırlığında erkek ve dişi fareler kullanıldı. Deney prosedüründen bir hafta önce deney hayvanları, ortama uyum sağlamaları için deneyin gerçekleştirildiği Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'na getirildi. Hayvanlar ısıtma-soğutma, havalandırma sistemine sahip olan, 12 saat aydınlık/12 saat karanlık dönüşümünün otomatik olarak ayarlandığı ve nem takibi yapılan bir odada, her kafeste 5 fare olacak şekilde yerleştirildi. Farelerin beslenmeleri için miktarında herhangi kısıtlama olmadan standart fare yemi ve içme suyu kullanıldı. Deney aşaması tamamlanan farelere yüksek doz anestezi altında ötanazi uygulandı.

Çalışmada kullanılan fareler her bir grup 5 dişi ve 5 erkek olup toplam 10 fareden oluşacak şekilde 30 grupta toplandı. Tedavi grupları Tablo 1'de gösterilmiştir.

Farelerde rota-rod performans testi, denge ve lokomotor fonksiyonun değerlendirilmesi için kullanıldı. Bağlamsal korku koşullanma ve ipuçlu korku koşullanma testleri ise korku belleğinin değerlendirilmesi için uygulandı.

Tablo 1. Çalışmadaki tedavi grupları

Grup No	Grup Kodu	Grup Adı
İpuçlu Korku Koşullanma (*cued fear conditioning*)		
Edinim (*acquisition*)		
1	ACQ-CTRL	Edinim - kontrol grubu
2	ACQ-CAP	Edinim - kapsaisin grubu
3	ACQ-CPZ	Edinim - kapsazepin grubu
Konsolidasyon (*consolidation*)		
4	CON-CTRL	Konsolidasyon - kontrol grubu
5	CON-CAP	Konsolidasyon - kapsaisin grubu
6	CON-CPZ	Konsolidasyon - kapsazepin grubu
Geri Çağırma (*retrieval*)		
7	RET-CTRL	Geri Çağırma - kontrol grubu
8	RET-CAP	Geri Çağırma - kapsaisin grubu
9	RET-CPZ	Geri Çağırma - kapsazepin grubu
Sönme (*extinction*)		
10	EXT-CTRL	Sönme - kontrol grubu
11	EXT-CAP	Sönme - kapsaisin grubu
12	EXT-CPZ	Sönme - kapsazepin grubu
Rekonsolidasyon (*reconsolidation*)		
13	RCON-CTRL	Rekonsolidasyon - kontrol grubu
14	RCON-CAP	Rekonsolidasyon - kapsaisin grubu
15	RCON-CPZ	Rekonsolidasyon - kapsazepin grubu
Bağlamsal Korku Koşullanma (*contextual fear conditioning*)		
Edinim (*acquisition*)		
16	ACQ-CTRL	Edinim - kontrol grubu
17	ACQ-CAP	Edinim - kapsaisin grubu
18	ACQ-CPZ	Edinim - kapsazepin grubu
Konsolidasyon (*consolidation*)		
19	CON-CTRL	Konsolidasyon - kontrol grubu
20	CON-CAP	Konsolidasyon - kapsaisin grubu
21	CON-CPZ	Konsolidasyon - kapsazepin grubu
Geri Çağırma (*retrieval*)		
22	RET-CTRL	Geri Çağırma - kontrol grubu
23	RET-CAP	Geri Çağırma - kapsaisin grubu
24	RET-CPZ	Geri Çağırma - kapsazepin grubu
Sönme (*extinction*)		
25	EXT-CTRL	Sönme - kontrol grubu
26	EXT-CAP	Sönme - kapsaisin grubu
27	EXT-CPZ	Sönme - kapsazepin grubu
Rekonsolidasyon (*reconsolidation*)		
28	RCON-CTRL	Rekonsolidasyon - kontrol grubu
29	RCON-CAP	Rekonsolidasyon - kapsaisin grubu
30	RCON-CPZ	Rekonsolidasyon - kapsazepin grubu

KULLANILAN İLAÇLAR

Otuz gruba, deney için bildirilen çalışma planına uygun olarak, çalışmanın ilk 2 günü; aynı dozlarda TRPV1 agonisti kapsaisin (Tocris 0462) 1 mg/kg i.p veya TRPV1 antagonisti kapsazepin (Tocris 0464) 1 mg/kg i.p ya da çözücü (Tween 80: etanol:serum fizyolojik [1:1:8 i.p]) uygulanarak deneyler tamamlandı.

TESTLER

Rota-rod treadmill

Deneklerin motor koordinasyon ve denge fonksiyonları rota-rod performans testi ile değerlendirildi. Rota-rod cihazında elektrik enerjisine bağlı olarak sabit hızda dönen bir mil, zeminden belli bir yükseklikte yer almaktadır. Çalışmamızda May 972-A Rota Rod (COMMAT, Türkiye) cihazını kullanıldık (Şekil 9).

Yan yana dört kabinden oluşan düzenek deney hayvanlarının birbirlerini göremeyecekleri şekilde tasarlanmıştır. Her bir kabinin zeminden yüksekliği 27 cm, genişliği 9 cm'dir. Silindir şeklinde yatay mil her kabinin içinden geçmektedir. Hayvan yere düşmemek için milin döndüğü yönün tersi yönünde yürümeye çalışır.

Hayvanlara önce kayıt alınmaksızın deney düzeneğine ve ortama alışabilmesi için deneme testleri uygulandı. Her bir deney hayvanı toplam olarak en fazla 3 kere dönen milin üzerine konularak, mil üzerinde dengede kalarak 180 saniye dönen mil üzerinde yürüyebilmeleri beklendi. 180 saniyeyi tamamlayan hayvan düzenekten alınarak elde edilen veriler ile hayvanların denge fonksiyonları değerlendirildi. Düzeneğin tabanı yeni deney hayvanları yerleştirilmeden önce her seferinde %10'luk etanol ile silinerek temizlik sağlandı.



Şekil 9. Rota-rod cihazı



Şekil 10. Korku koşullanma cihazının kapak kapalı dış görünümü (solda), korku koşullanma cihazı kapak açık iç görünüm (sağda).

Korku Koşullanma Testi Düzeneği

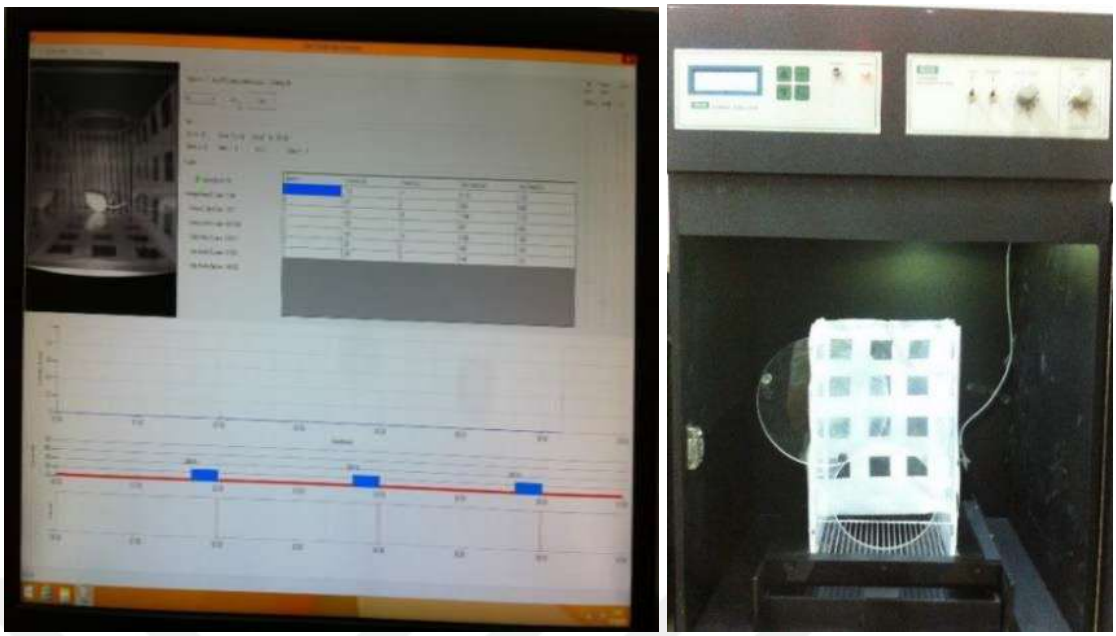
Farelerdeki donma davranışları FCS 21200-R (COMMAT, Türkiye) sistemi kullanılarak incelendi ve toplam donma süreleri saptandı (Şekil 10).

Düzeneğin genişliği 27 cm, derinliği 27 cm ve yüksekliği 34 cm olup dış kısmı siyah mat pleksiglas malzemeden iç kısmı şeffaf pleksiglas malzemeden üretilmiştir. Şeffaf pleksiglas iç bölümünde, ön yüzdeki duvara 16 cm çapında daire şeklinde kapı bulunmaktadır. Kafesin tabanında şok cihazına bağlı ve tabanda birbirine paralel dizilmiş çelik ızgara bulunmakta ve yan ve arka duvarlarında görsel öğeler yer almaktadır. Tavan beyaz ışık ile aydınlatılmaktadır. Farelerin dışkılarının toplandığı çıkarılabilir çekmece, düzeneğin tabanında yer almaktadır.

İpuçlu korku koşullanma testi ile korku belleğinin değerlendirilmesi

İpuçlu korku koşullanma testi ve bağlamsal korku koşullanma testi çok benzer testlerdir. Bu davranış testinde elektrik şoku gibi rahatsız edici bir uyaran olan koşulsuz uyaran kullanılırken, koşullu uyaran olarak ise genellikle ses kullanılmaktadır. Korku belleğinin test edildiği amigdala bağımlı bir deneydir.

İlk gün deney hayvanı, duvarlarına desenli kâğıt (beyaz zemin üzerinde yuvarlak şekiller) ile çevresel ipucu oluşturulmuş şeffaf kafese alınarak 260 saniye süresince izlendi. Testin ilk 3 dakikasının tamamlanmasından sonra 20 saniye süreyle 9 kHz, 80 dB şiddetinde sinüs dalgası sesli uyaranı verildi ve sesli uyaranın son iki saniyesinde tabandaki çelik ızgaradan 0,7 mA ayak şoku verildi (Şekil 11). Ardından hayvan 30 saniye daha kafeste bırakıldıktan sonra düzenekten çıkarılarak tekrar kafesine yerleştirildi.



Şekil 11. İpuçlu korku koşullanma testlerden alınan kayıtlar (solda) ve deney düzeneği (sağda)

İkinci gün deney hayvanı desenli kâğıt (beyaz zemin üzerinde üçgen şekiller) ile çevresel ipucu oluşturulmuş şeffaf kafese alınarak 360 saniye boyunca izlendi; öğrenme, konsolidasyon, geri çağırma ve sönme gruplarında testin ilk 180 saniyesinde herhangi bir uyaran verilmedi. Testin son 180 saniyesinde 9 kHz, 80 dB, sinüs dalgası sesli uyaranı verildi. Sadece rekonsolidasyon grubuna 360 saniyelik testin son 20 saniyesinde sesli uyaran ve son iki saniyesinde tabandaki çelik ızgaradan 0,7 mA ayak şoku verildi.

Beşinci gün sönme ve rekonsolidasyon grubundaki deney hayvanları, desenli kağıt (beyaz zemin üzerinde kareli şekiller) ile çevresel ipucu oluşturulmuş şeffaf kafese alınarak 360 saniye boyunca izlendi; testin ilk 180 saniyesinde elektrik şoku ve ses verilmedi. Testin son 180 saniyesinde 9 kHz, 80 dB, sinüs dalgası sesli uyaranı verildi.

Dokuzuncu gün sönme ve rekonsolidasyon grubundaki deney hayvanları, içteki şeffaf kafesin duvarları desensiz kâğıt ile kaplanmış, şeffaf kafese alınarak 360 saniye boyunca izlendi; testin ilk 180 saniyesinde elektrik şoku ve ses verilmedi. Testin son 180 saniyesinde 9 kHz, 80 dB, sinüs dalgası sesli uyaranı verildi.

Düzeneğin alt kısmındaki çekmecede biriken fare dışkıları her deney hayvanından sonra temizlenerek zemin %10'luk etanol ile silinerek kurutuldu.

Bağlamsal korku koşullanma testleri ile korku belleğinin değerlendirilmesi

Bu davranış testinde elektrik şoku gibi rahatsız edici bir uyaran olan koşulsuz uyaran kullanılırken, koşullu uyaran olarak ise çevresel ipucu kullanılmaktadır; bu amaçla test boyunca

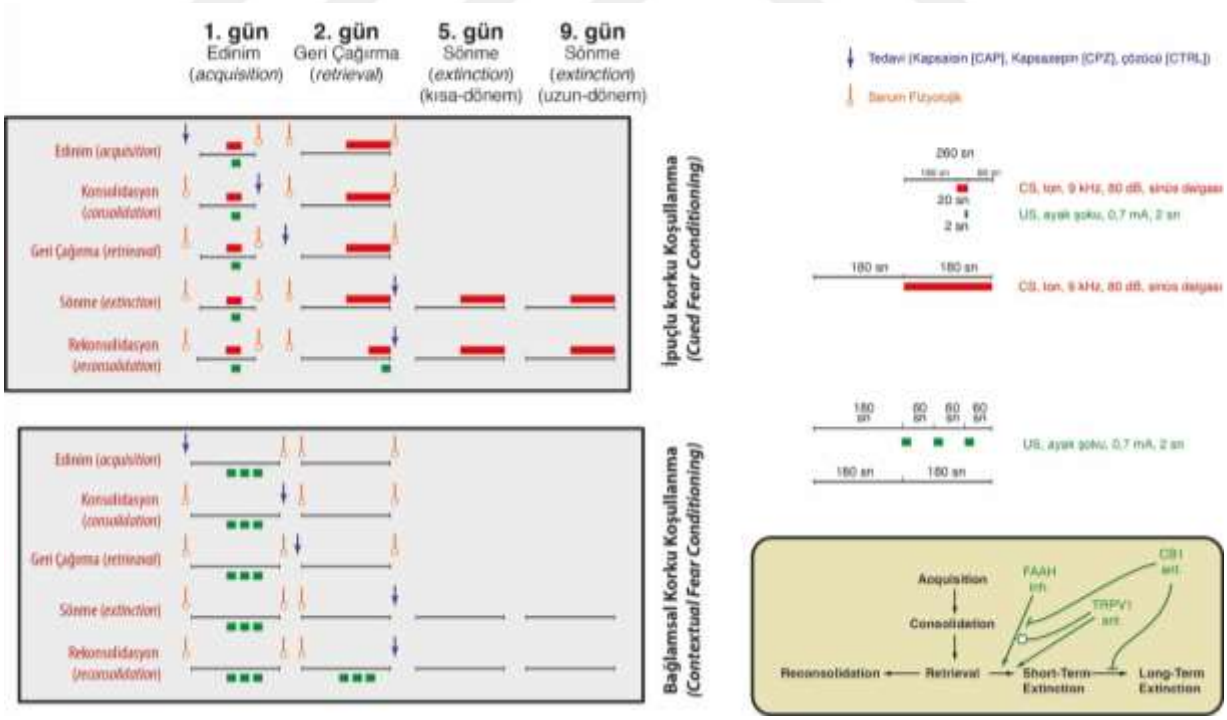
şeffaf odanın duvarlarında aynı desen yer almaktadır, yani hayvan bulunduğu ortamı ipucu olarak kullanmaktadır.

Deneyin ilk gününde fareler kafeste 360 saniye boyunca 3., 4. ve 5. dakikalarda 0,7 mA şiddetinde ve 2 sn süre ile elektrik şoku verildi. Deneyin ilk günü bir hayvanın testi toplam 6 dakika sürdü.

Testin ikinci gününde deney hayvanı, yine grubuna uygun olarak, enjeksiyon yapılarak veya yapılmaksızın, önceki gün teste alındığı saatte tekrar teste alınarak rekonsolidasyon grubu hariç diğer gruplara korku koşullanma cihazında şok verilmeden 6 dakika boyunca izlendi. Rekonsolidasyon grubuna 1. günde uygulanan işlemler uygulandı. Testi tamamlayan deney hayvanı tekrar kafesine alındı.

Testin 5. ve 9. günlerinde sadece sönme ve rekonsolidasyon grubuna şok verilmeden donma süreleri kaydedildi. Diğer gruplara hiçbir işlem yapılmadı.

Çalışmanın genel tasarımı aşağıdaki şekilde görselleştirilmiştir (Şekil 12).



Şekil 12. Çalışma planı

İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Çalışmada elde edilen verilerin normal dağılıma uygun olup olmadığı test edildi. Veriler normal dağılıma uygun olduğundan grup içi tekrarlanan ölçümlerin karşılaştırılması ve gruplar arası karşılaştırmalar için çift yönlü tekrarlanan ölçümler (RM) varyans analizi (ANOVA) ve *post hoc* Bonferroni testi kullanıldı. Alfa önem seviyesi %5 olarak belirlendi. İstatistiksel analizler Graphpad Prism for Mac sürüm 8.4.3 (Graphpad Software) kullanılarak gerçekleştirildi.

BULGULAR

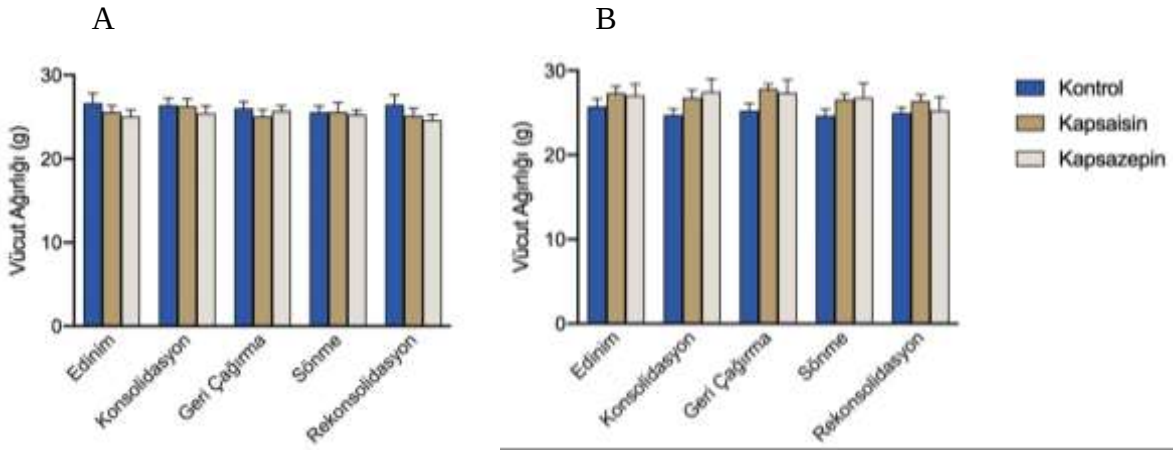
Hayvanlara gruplarına göre sırasıyla rota-rod performans testi, bağlamsal ve ipuçlu korku koşullanma testleri uygulandı. Otuz gruba, deney planında belirtildiği şekilde, grubuna uygun olarak, çalışmanın ilk 2 günü; aynı dozlarda TRPV1 agonisti kapsaisin veya TRPV1 antagonisti kapsazepin ya da çözücü (Tween 80:etanol:serum fizyolojik [1:1:8 i.p]) uygulanarak deneyler tamamlandı. Çalışmamızda elde edilen bulgular ipuçlu ve bağlamsal korku koşullanma testindeki yanıtlar olarak iki bölüm halinde, toplam donma süreleri üzerinden değerlendirildi.

Ağırlık

Gruplarda yer alan hayvanların ağırlıkları Şekil 13'te gösterilmiştir. Gruplar arasında hayvanların ağırlığı açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamaktadır (p=0,9876; 2 yönlü ANOVA) (Şekil 13).

Rota-Rod Testi

Gerek ipuçlu gerekse bağlamsal korku koşullanma testlerine tabi tutulan hayvanlarda rota-rod testinde hayvanların dönen mil üzerinde kalma süreleri açısından gruplar arasında istatistiksel yönden anlamlı fark bulunmadı (sırasıyla 0.4391 ve 0,7870, 2 yönlü ANOVA) (Şekil 14).

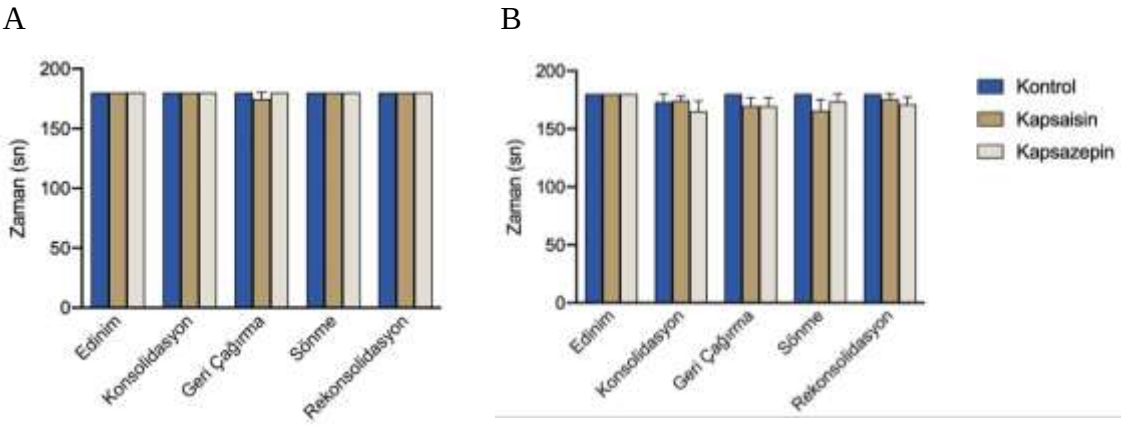


Şekil 13. İpuçlu (A) ve bağlamsal korku koşullanma (B) testleri uygulanan gruplarda vücut ağırlıkları (Dikey çubuklar ortalamanın standart hatasını göstermektedir).

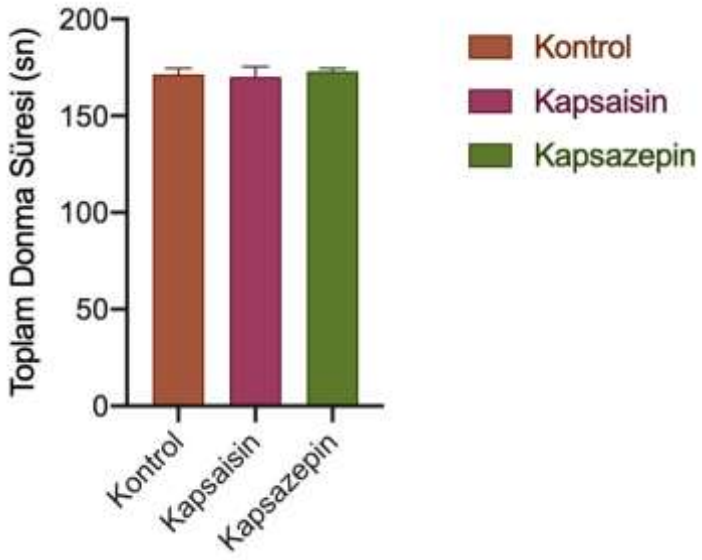
İpuçlu korku koşullanma testi sonuçları

Edinim

İpuçlu korku koşullanma edinim testinde kontrol, kapsaisin veya kapsazepin grupları arasında donma süreleri yönünden istatistiksel anlamlı bir fark görülmedi (p=0,8566; ANOVA, Şekil 15).



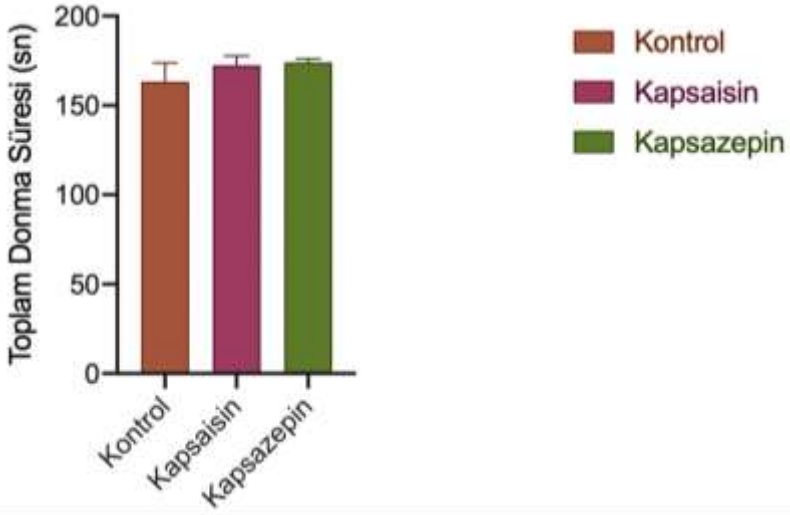
Şekil 14. İpuçlu (A) ve bağlamsal korku koşullanma (B) testleri uygulanan gruplarda rota-rod testinde dönen mil üzerinde kalma süreleri (Dikey çubuklar ortalamanın standart hatasını göstermektedir).



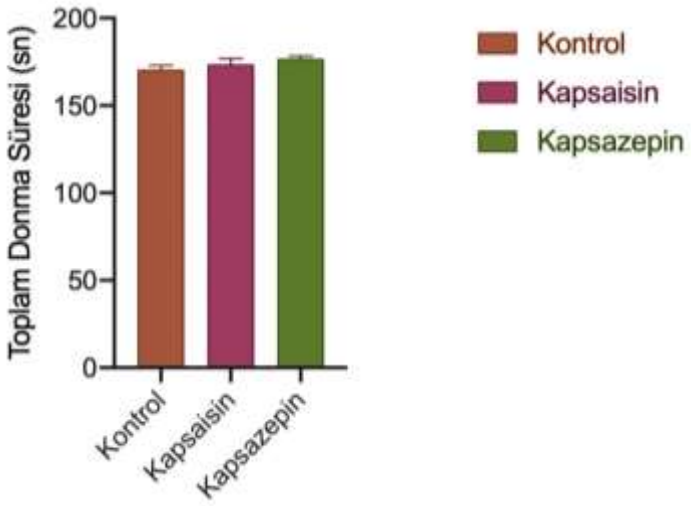
Şekil 15. İpuçlu korku koşullanma edinim testinde kontrol, kapsaisin veya kapsazepin gruplarında donma süreleri (Dikey çubuklar ortalamanın standart hatasını göstermektedir).

Konsolidasyon

İpuçlu korku koşullanma konsolidasyon testinde kontrol, kapsaisin veya kapsazepin grupları arasında donma süreleri yönünden istatistiksel anlamlı bir fark görülmedi (p=0,4985; ANOVA, Şekil 16).



Şekil 16. İpuçlu korku koşullanma konsolidasyon testinde kontrol, kapsaisin veya kapsazepin gruplarında donma süreleri (Dikey çubuklar ortalamanın standart hatasını göstermektedir).



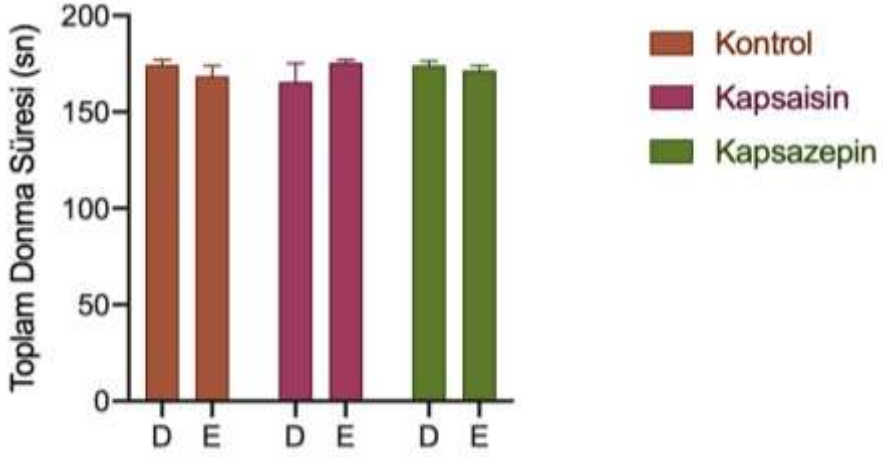
Şekil 17. İpuçlu korku koşullanma geri çağırma testinde kontrol, kapsaisin veya kapsazepin gruplarında donma süreleri (Dikey çubuklar ortalamanın standart hatasını göstermektedir).

Geri çağırma

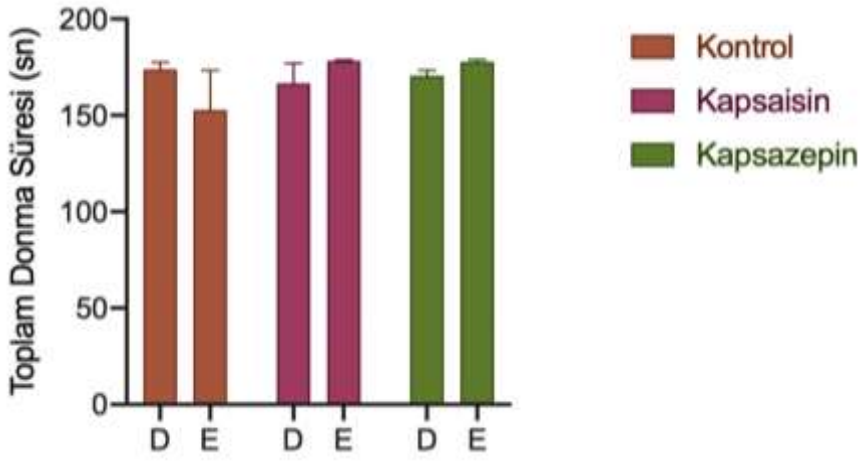
İpuçlu korku koşullanma geri çağırma testinde kontrol, kapsaisin veya kapsazepin grupları arasında donma süreleri yönünden istatistiksel anlamlı bir fark yoktu (p=0,2446; ANOVA, Şekil 17).

Edinim-Cinsiyet

İpuçlu korku koşullanma edinim testinde cinsiyet bakımından; kontrol, kapsaisin veya kapsazepin grupları arasında donma süreleri yönünden istatistiksel anlamlı bir fark bulunmadı (p=0,2941; 2 yönlü ANOVA, Şekil 18).

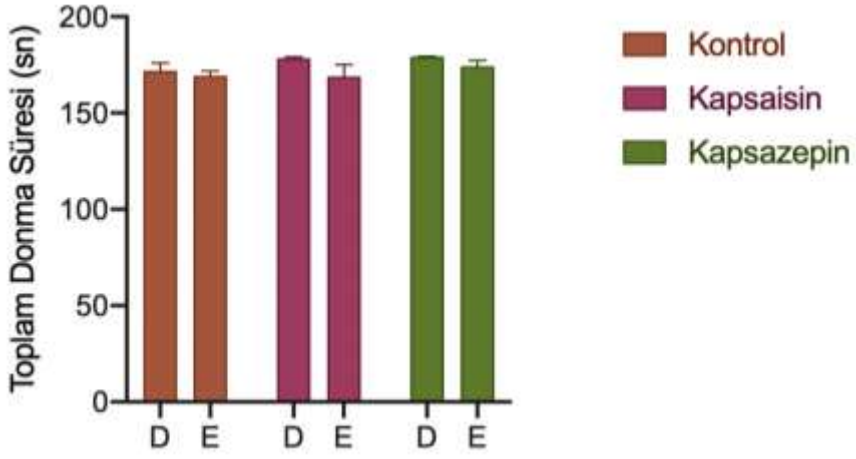


Şekil 18. İpuçlu korku koşullanma edinim testinde cinsiyet bakımından; kontrol, kapsaisin veya kapsazepin gruplarında donma süreleri (Dikey çubuklar ortalamanın standart hatasını göstermektedir).

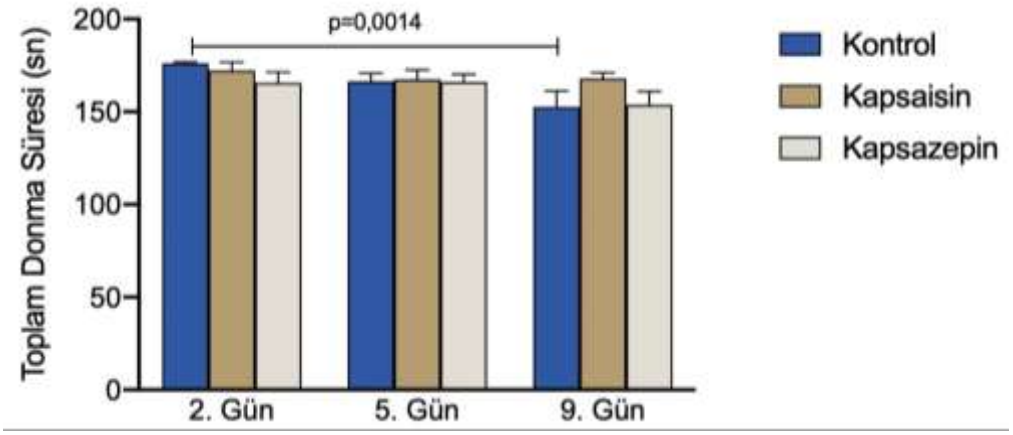


Şekil 19. İpuçlu korku koşullanma konsolidasyon testinde cinsiyet bakımından; kontrol, kapsaisin veya kapsazepin gruplarında donma süreleri (Dikey çubuklar ortalamanın standart hatasını göstermektedir).

İpuçlu korku koşullanma konsolidasyon testinde cinsiyet bakımından; kontrol, kapsaisin veya kapsazepin grupları arasında donma sürelerinde istatistiksel anlamlı bir fark görülmedi (p=0,2036; 2 yönlü ANOVA, Şekil 19). Benzer şekilde, geri çağırma testinde de cinsiyet bakımından; kontrol, kapsaisin veya kapsazepin grupları arasında donma sürelerinde istatistiksel anlamlı bir fark bulunmadı (p=0,5899; 2 yönlü ANOVA, Şekil 20).



Şekil 20. İpuçlu korku koşullanma geri çağırma testinde cinsiyet bakımından; kontrol, kapsaisin veya kapsazepin gruplarında toplam donma süreleri (Dikey çubuklar ortalamanın standart hatasını göstermektedir).



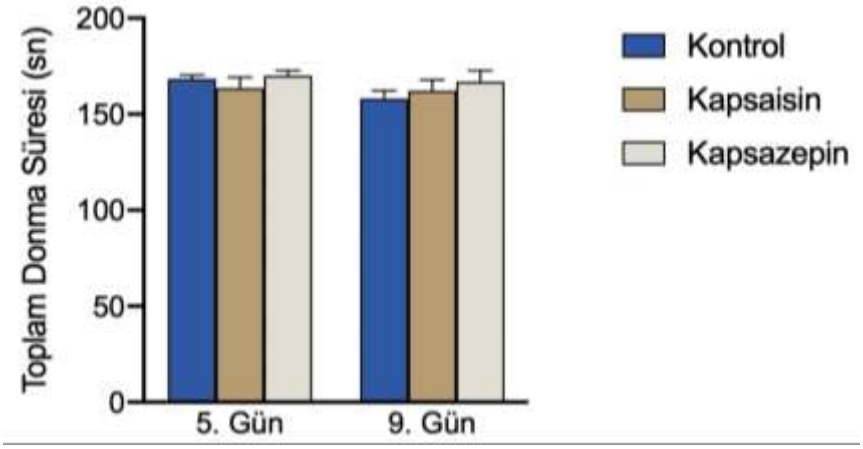
Şekil 21. İpuçlu korku koşullanma sönme testinde 2., 5. ve 9. günlerde kontrol, kapsaisin veya kapsazepin gruplarında toplam donma süreleri (İstatistiksel anlamlılık 2 yönlü ANOVA *post hoc* Bonferroni testi sonucunu, dikey çubuklar ise ortalamanın standart hatasını göstermektedir).

Sönme

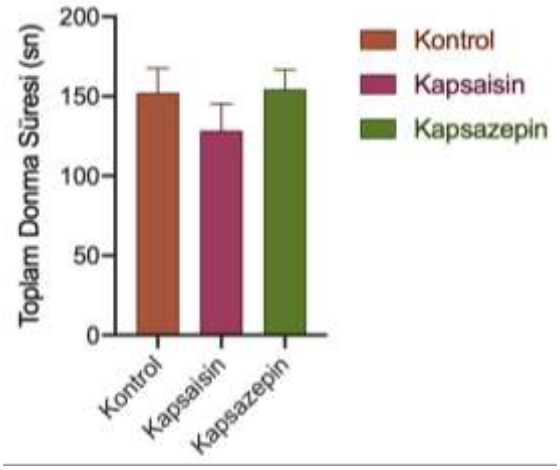
İpuçlu korku koşullanma sönme testinde kontrol grubunda 9. günde donma süresi 2. gün değerine kıyasla istatistiksel anlamlı derecede azaldı (p=0,0014; 2 yönlü ANOVA *post hoc* Bonferroni testi, Şekil 21), diğer karşılaştırmalarda istatistiksel yönden anlamlı bir fark yoktu.

Rekonsolidasyon

İpuçlu korku koşullanma rekonsolidasyon testinde 5. ve 9. günlerde kontrol, kapsaisin veya kapsazepin grupları arasında toplam donma sürelerinde istatistiksel anlamlı fark saptanmadı (p=0,3763; 2 yönlü ANOVA, Şekil 22).



Şekil 22. İpuçlu korku koşullanma rekonsolidasyon testinde 5. ve 9. günlerde kontrol, kapsaisin veya kapsazepin gruplarında toplam donma süresi (Dikey çubuklar ortalamanın standart hatasını göstermektedir).

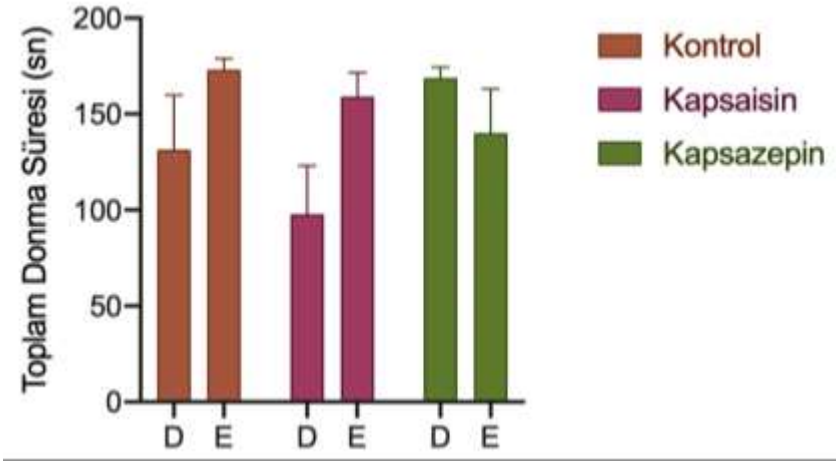


Şekil 23. Bağlamsal korku koşullanma edinim testinde kontrol, kapsaisin veya kapsazepin gruplarında donma süreleri (Dikey çubuklar ortalamanın standart hatasını göstermektedir).

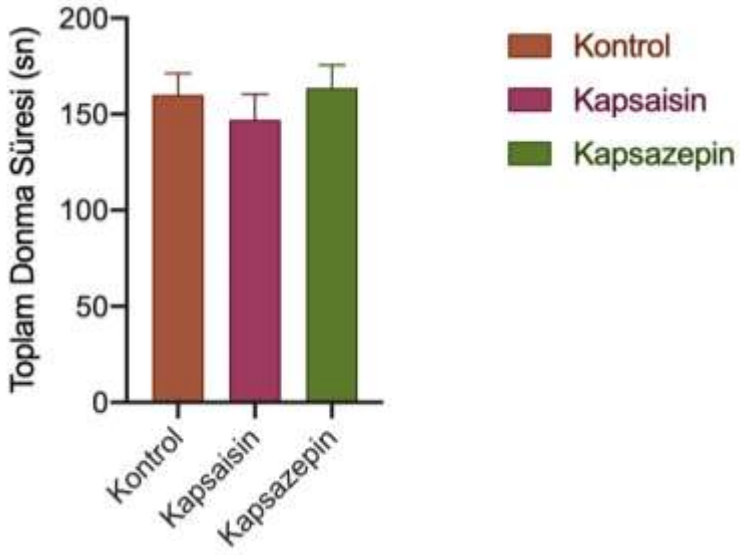
Bağlamsal korku koşullanma testi sonuçları

Edinim

Bağlamsal korku koşullanma edinim testinde kontrol, kapsaisin veya kapsazepin grupları arasında donma süreleri yönünden istatistiksel anlamlı bir fark görülmedi (p=0,4047; ANOVA, Şekil 23). Benzer şekilde, edinim testinde de cinsiyet bakımından; kontrol, kapsaisin veya kapsazepin gruplarındaki donma süreleri arasındaki farklar istatistiksel yönden anlamlı değildi (p=0,0657; 2 yönlü ANOVA, Şekil 24).



Şekil 24. Bağlamsal korku koşullanma edinim testinde cinsiyet bakımından; kontrol, kapsaisin veya kapsazepin gruplarında donma süreleri (Dikey çubuklar ortalamanın standart hatasını göstermektedir).

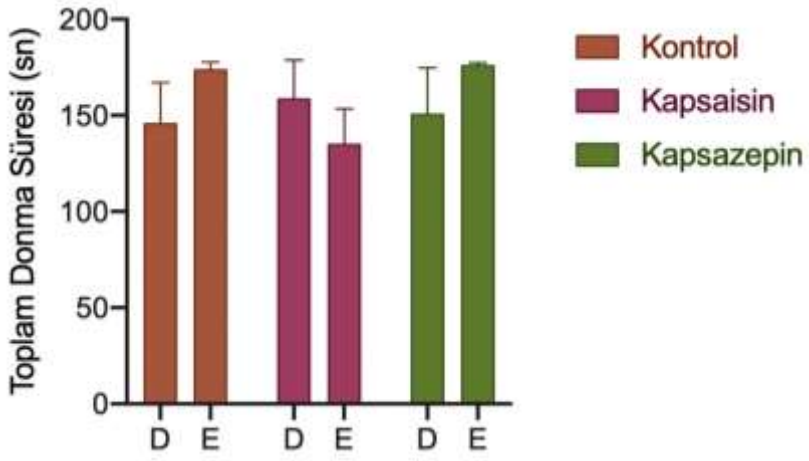


Şekil 25. Bağlamsal korku koşullanma konsolidasyon testinde kontrol, kapsaisin veya kapsazepin gruplarında donma süreleri (Dikey çubuklar ortalamanın standart hatasını göstermektedir).

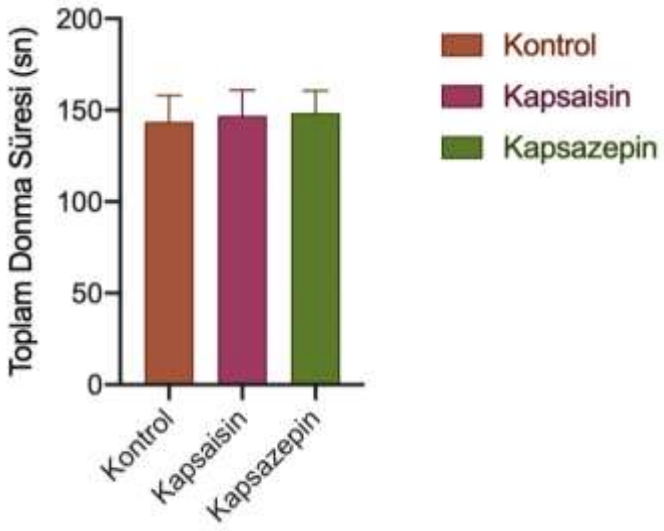
Konsolidasyon

Bağlamsal korku koşullanma konsolidasyon testinde kontrol, kapsaisin veya kapsazepin grupları arasında donma süreleri yönünden istatistiksel anlamlı bir fark görülmedi (p=0,6068; ANOVA, Şekil 25).

Bağlamsal korku koşullanma konsolidasyon testinde cinsiyet bakımından; kontrol, kapsaisin veya kapsazepin grupları arasında donma sürelerinde istatistiksel anlamlı bir fark saptanmadı (p=0,2556; 2 yönlü ANOVA, Şekil 26).



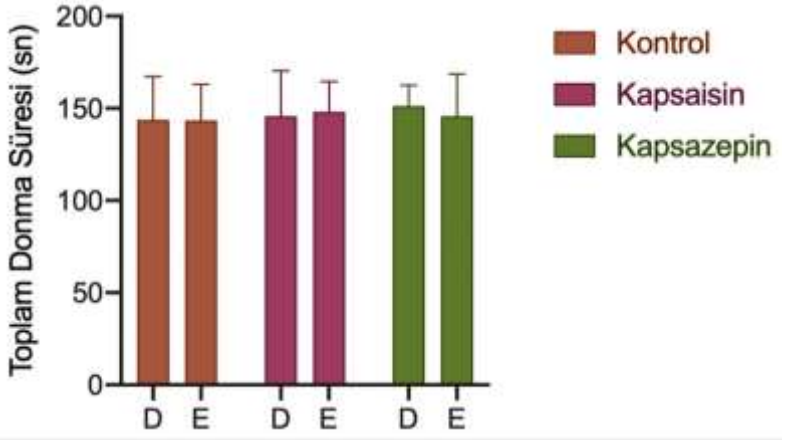
Şekil 26. Bağlamsal korku koşullanma konsolidasyon testinde cinsiyet bakımından; kontrol, kapsaisin veya kapsazepin gruplarında donma süreleri (Dikey çubuklar ortalamanın standart hatasını göstermektedir).



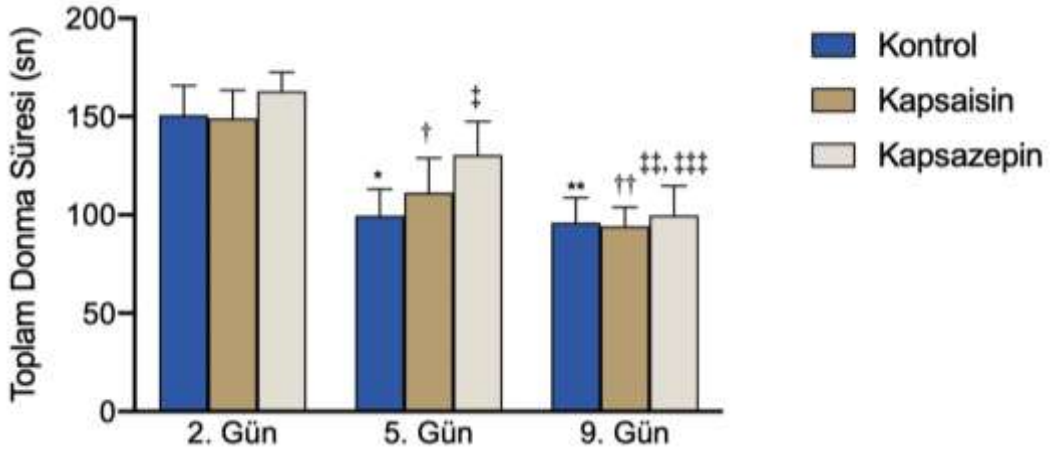
Şekil 27. Bağlamsal korku koşullanma geri çağırma testinde kontrol, kapsaisin veya kapsazepin gruplarında donma süreleri (Dikey çubuklar ortalamanın standart hatasını göstermektedir).

Geri çağırma

Bağlamsal korku koşullanma geri çağırma testinde kontrol, kapsaisin veya kapsazepin grupları arasında donma süreleri yönünden istatistiksel anlamlı bir fark görülmedi (p=0,9664; ANOVA, Şekil 27). Benzer şekilde, geri çağırma testinde cinsiyet bakımından; kontrol, kapsaisin veya kapsazepin grupları arasında donma sürelerinde istatistiksel anlamlı bir fark bulunmadı (p=0,9799; 2 yönlü ANOVA, Şekil 28).



Şekil 28. Bağlamsal korku koşullanma geri çağırma testinde cinsiyet bakımından; kontrol, kapsaisin veya kapsazepin gruplarında toplam donma süreleri (Dikey çubuklar ortalamanın standart hatasını göstermektedir).



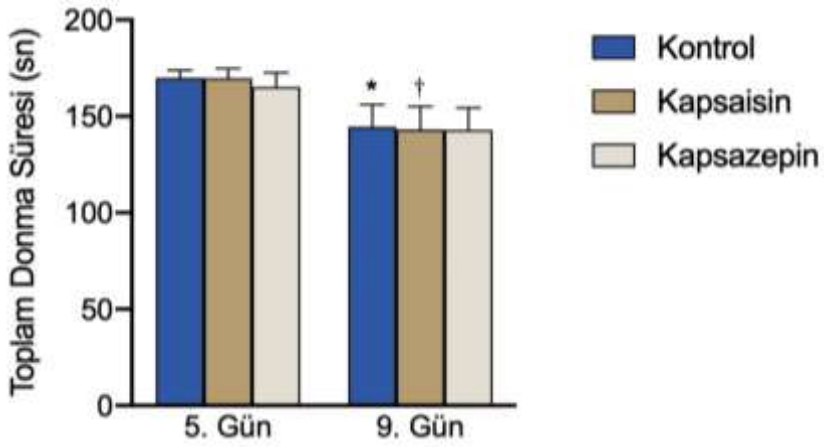
Şekil 29. Bağlamsal korku koşullanma sönme testinde 2., 5. ve 9. günlerde kontrol, kapsaisin veya kapsazepin gruplarında toplam donma süreleri (Dikey çubuklar ortalamanın standart hatasını göstermektedir. *2. gün değerine karşı p=0,0005; **2. gün değerine karşı p=0,0002; †2. gün değerine karşı p=0,0118; ††2. gün değerine karşı p=0,0002; ‡2. gün değerine karşı p=0,0341; ‡‡2. gün değerine karşı p<0,0001; ‡‡‡5. gün değerine karşı p=0,0482; 2 yönlü RM ANOVA, *post hoc* Bonferroni testi).

Sönme

Bağlamsal korku koşullanma sönme testinde kontrol, kapsaisin ve kapsazepin gruplarında 5. gün ve 9. günlerde toplam donma süreleri 2. gün kaydedilen donma süresine kıyasla istatistiksel anlamlı azalma gösterdi (kontrol grubu için sırasıyla p=0,0005 ve p=0,0002; kapsaisin grubu için sırasıyla p=0,0118 ve p=0,0002; kapsazepin grubu için sırasıyla p=0,0341 ve p<0,0001; 2 yönlü RM ANOVA, *post hoc* Bonferroni testi, Şekil 29), ancak gruplar arasında aynı günlerde kaydedilen donma süreleri yönünden istatistiksel anlamlı bir fark yoktu.

Rekonsolidasyon

Bağlamsal korku koşullanma rekonsolidasyon testinde 5. ve 9. günlerde kontrol, kapsaisin veya kapsazepin grupları arasında toplam donma süreleri yönünden istatistiksel anlamlı fark saptanmadı (p=0,9574; 2 yönlü RM ANOVA, Şekil 30), ancak kontrol ve kapsaisin gruplarında 9. gün kaydedilen donma süreleri 5. gün kaydedilen donma sürelerine göre istatistiksel anlamlı derecede düşüktü (kontrol grubu için p=0,0357; kapsaisin grubu için sırasıyla p=0,0258; 2 yönlü RM ANOVA, *post hoc* Bonferroni testi).



Şekil 30. Bağlamsal korku koşullanma rekonsolidasyon testinde 5. ve 9. günlerde kontrol, kapsaisin veya kapsazepin gruplarında toplam donma süresi (Dikey çubuklar ortalamanın standart hatasını göstermektedir. *5. gün değerine karşı p=0,0357; †5. gün değerine karşı p=0,0258; 2 yönlü RM ANOVA, *post hoc* Bonferroni testi).

TARTIŞMA

Bu çalışmada TRPV1 agonisti kapsaisin ve antagonisti kapsazepin'in bağlamsal ve ipuçlu korku koşullanmanın herhangi bir aşamasında (edinim, konsolidasyon, geri çağırma, sönme ve rekonsolidasyon) rol oynayıp oynamadığını araştırmayı amaçladık. Uygulanan ilaçların korku belleğinin edinimine, konsolidasyonuna, geri çağırılmasına, sönme ve rekonsolidasyonuna etkisi değerlendirildi. TRPV1 agonisti kapsaisin veya TRPV1 antagonisti kapsazepin ya da çözücü uygulanmasının bağlamsal ve ipuçlu korku koşullanma testlerinde edinim, konsolidasyon, geri çağırma, sönme ve rekonsolidasyon süreçlerini etkilemediği bulundu. Bu sonuçlar, normal (bellek bozukluğu oluşturulmamış) farelerde TRPV1 reseptörlerin agonist ile uyarılmasının veya antagonist ile bloke edilmesinin korku koşullanma üzerine gözlenebilir bir etkisi olmadığına işaret etmektedir.

Hipokampüs, belirli bellek türlerinde önemli bir rol oynar. Transient reseptör potansiyel vanilloid 1 (TRPV1), kalsiyum geçirgen bir katyon kanalıdır. Periferik sinir sisteminde, TRPV1, örneğin ağrılı uyaranlar veya endojen ligandlar tarafından aktive edilen polimodal bir sinyal dedektörü olarak iyi tanınır. Ancak TRPV1, postsinaptik dendrit spinleri ve hipokampal nöronların hücre gövdesi dahil olmak üzere beyin bölgelerinde yaygın olarak eksprese edilir (52). TRPV1, kırmızı biberlerin keskin içeriği olan kapsaisin gibi vanilloidler ve ayrıca H^+, ısı, lipoksijenaz ürünleri ve anandamid dahil olmak üzere endojen uyarıcılar tarafından aktive edilebilir. Merkezi sinir sisteminde (MSS), TRPV1, substantia nigra, bazal gangliyonlar, hipokampal oluşum, lokus seruleus ve korteks dahil olmak üzere çeşitli beyin bölgelerinde ifade edilir. TRPV1, insan ve sıçan beyninde hipokampus, striatum, hipotalamus ve beyincikte tanımlanmıştır (54,55). Son çalışmalar, TRPV1 aktivasyonunun, merkezi sinapslarda nörotransmiter salıverilmesini düzenlediğini göstermiş ve TRPV1 geni silinmiş farelerde

hipokampüse bağlı öğrenme eksiklikleri ve sinaptik plastisitede azalma bulunmuştur (9,10,11). Acı biberlerdeki keskin içerikli kapsaisin (8-metil-N-vanililtrans-6-nonenamid, CAP), TRPV1 için oldukça seçici bir agonisttir. Yakın zamanda TRPV1'in uzaysal bellekte akut stresin etkisine karşı koruduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte, vanilloid sistemin bilişsel işlevdeki rolü hakkında çok az şey bilinmektedir (52). Uzun vadeli potansiyalizasyon (LTP) ve uzun vadeli depresyon (LTD) biçimlerinin çoğu, N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptörleri tarafından indüklenirken, TRPV1'in farklı sinaptik plastisite türlerinde; hipokampüs, nükleus akkümbens ve üst kollikulusu etkilediği veya gerekli olduğu gösterilmiştir. Hipokampüste sinaptik güçte uzun süreli bir artış olan LTP, öğrenme ve bellek oluşumuna katılabilecek hücresel mekanizmaların araştırılmasında çekici bir modeldir.

TRPV1 polimodal bir sinyal dedektörü olup ısı ve protonlarla aktive edilebilir. Sentetik TRPV1 agonistleri, hızlı reseptör desensitizasyonunu başlattıkları için güçlü analjezik etkiler gösterirler. MSS'de TRPV1, substantia nigra, bazal gangliyonlar, hipokampal oluşum, lokus seruleus ve korteks dahil olmak üzere çeşitli beyin bölgelerinde eksprese edilir. Son zamanlarda, TRPV1'in birkaç endojen ligandı saptanmıştır. Bu intraserebral "endovanilloidler"in daha yakından incelenmesi üzerine, üç farklı lipit sınıfı ortaya çıkmıştır: (1) anandamid, (2) araşidonik asidin lipoksijenaz ürünleri ve (3) uzun zincirli, lineer yağ asidi dopaminleri [örn., N-araşidonil- dopamin (NADA)]. Bu "endovanilloidler"den ikisi, anandamid ve NADA, aynı zamanda kannabinoid reseptör tip 1'e (CB_1) bağlandıkları için endokannabinoid ailesinin üyeleridir. Hem TRPV1 hem de CB_1, hücresel düzeyde yakın çevrede bulunabildikleri hipokampal oluşum da dahil olmak üzere çeşitli beyin yapılarında ortak lokalizedir, CB_1 öncelikli olarak akson terminallerinde ve TRPV1 postsinaptik dendritik dikenlerde ve hücre somasında eksprese edilir (18). CB_1'in aktivasyonu genellikle presinaptik terminallerde hücre içi kalsiyumda bir azalmaya ve dolayısıyla azaltılmış bir transmiter salıverilmesine yol açar. TRPV1'in anandamid tarafından aktivasyonu, aksine, postsinaptik bölgelerde Ca^{2+} girişini teşvik eder. Bu gözlemler, TRPV1 ve CB_1'in duygusallık, biliş ve sinaptik plastisite dahil olmak üzere belirli beyin işlevleri üzerinde zıt etkiler gösterebileceği hipotezine yol açmıştır. Bununla birlikte, intraserebral CB_1'in fizyolojik önemi ortaya çıkmaya başlarken, TRPV1'in beyindeki fizyolojik rolleri hakkında çok az şey bilinmektedir. Bu nedenle, çalışmamızda TRPV1 etkisinin korku koşullanma ile ilişkisi kapsaisin ve kapzasepin ile değerlendirildi (11, 18).

Endojen kannabinoidlerin kannabinoid reseptörleri (CB_1 ve CB_2) yanında TRPV1 kanallarını da etkilemesi, endokannabinoidlerin rol oynadığı durumlarda bu kanalların da rol

oynayabileceğini düşündürmüştür. Shiri ve ark. (55) kannabinoid ve vanilloid sistemlerinin kombine uyarımının öğrenme ve bellek üzerindeki etkilerini pasif sakınma öğrenme (PAL) testleri kullanarak incelemişlerdir. Sonuç olarak, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, TRPV1 agonisti ile tedavi edilen grubun PAL edinim ve retansiyon testinde daha iyi puanlara sahip olduğunu saptamışlardır. Öte yandan, CB_1/CB_2 agonisti ile tedavinin test puanlarını düşürdüğünü, TRPV1 agonistinin ise, CB_1/CB_2 agonisti ile PAL ve bellek üzerinde oluşturulan etkileri kısmen azalttığını bildirmişlerdir. Bir TRPV1 agonistinin akut uygulanmasının, farelerin PAL görevlerindeki bilişsel performansı iyileştirdiği ve WIN55,212-2'nin öğrenme ve bellek üzerindeki agonistik etkisinin altında vanilloid ile ilgili bir mekanizmanın yatabileceği sonucuna varmışlardır. Kannabinoid ve vanilloid sistemlerinin öğrenme ve bellek üzerindeki etkilerine dair önceki bulgulara rağmen, bu iki sistemin agonist ile uyarılması ve antagonist ile bloke edilmesinin öğrenme ve bellek üzerindeki etkileri çalışılmamıştır. Çalışmamızda TRPV1 agonisti kapsaisin ve TRPV1 antagonisti kapsazepin uygulanmasının bağlamsal ve ipuçlu korku koşullanma testlerinde öğrenme ve geri çağırma süreçleri üzerine etkilerini değerlendirdik ve incelenen dozlarda bu süreçler üzerinde gözlenebilir bir etki oluşturmadıklarını bulduk.

Carobi ve Garinei (1) kapsaisin ile tedavi edilen sıçanların iştaha dayalı karmaşık bir labirentte öğrenmede (edinim) belirgin bir bozulma oluşturduğunu; buna karşılık bu testte bellek retansiyonunu ve sönmeyi etkilemediğini bildirmişlerdir. Ancak, 8-kollu labirentte aynı besin maddesi kullanılarak test edildiğinde, kapsaisin verilen hayvanlar ile kontrol hayvanları arasında herhangi bir fark saptayamamışlardır. Biz de çalışmamızda kapsaisin'in bellek üzerinde etkisinin olmadığını bulduk.

Jiang ve ark. (54) kapsaisin'in soğuk su stresine (*cold water stress*, CWS) maruz kalan sıçanlarda bilişsel ve patolojik değişiklikleri hafifletme potansiyelini belirlemek için yaptıkları çalışmada, hayvanlara, stresten bir saat önce intragastrik infüzyon yoluyla kapsaisin (10 mg/kg) uygulamasının soğuk su stresi ile oluşturulan uzaysal bellek kaybını azalttığı ve aynı anda perforan yolak-dentat girus'un (*perforant pathway-dentate gyrus*, PP-DG) uzun süreli potansiyalizasyonunu bastırdığı sonucuna varmışlardır. Stresin neden olduğu dendritik gerilemenin azaldığı ve CWS ile azaltılmış olan bellekle ilişkili bazı proteinlerin (sinapsin I ve PSD93) de yükseldiği saptanmıştır. Kapsaisin'in ayrıca protein fosfataz 2A'nın inhibisyonunu ortadan kaldırarak, CWS'nin neden olduğu tau hiperfosforilasyonunu da engellediği belirlenmiştir. Bütün bu sonuçlara dayanarak, TRPV1 aktivasyonunun CWS'nin neden olduğu Alzheimer benzeri nöropatolojik değişiklikleri ve bilişsel hasarı azaltabileceği sonucuna

varılmış ve TRPV1'in Alzheimer hastalığı tedavisinde etkili bir tedavi hedefi olabileceği öne sürülmüştür (54,56). Bizim çalışmamızda kapsaisin ve kapsazepin bellek üzerinde gözlenebilir bir etki oluşturmadı. Bu farklılığın çeşitli nedenleri olabilir. Şöyle ki Jiang ve ark. (54) tarafından yapılan çalışma sıçanlar üzerinde yapılmış, Morris su labirentinde uzaysal belleğin retansiyon fazının test edildiği bir çalışmadır ve kullanılan kapsaisin dozu bizim çalışmamızdaki dozun 10 katıdır. Ayrıca, kapsaisin verilmeden önce soğuk su stresi uygulanarak sıçanların bellek performansları bozulmuştur; oysa bizim çalışmamız normal sağlıklı fareler üzerinde gerçekleştirilmiştir.

Bağlamsal korku koşullandırma veya kademeli aktif sakınma görevinde güçlü bir eğitim protokolü (fakat zayıf olmayan değil) varlığında TRPV1 antagonisti kapsazepin'in eğitim sonrası infüzyonunun bellek konsolidasyonunu bozduğu gösterilmiştir (57). Genro ve ark. (57) bağlamsal korku koşullanma ve inhibitör sakınma (*step-down inhibitory avoidance*) testlerinde, hipokampal endovanilloid sistemin bellek konsolidasyonu üzerindeki rolünü incelemişler ve TRPV1 antagonisti kapsazepin'in, yalnızca güçlü şok durumunda bellek konsolidasyonunu bozabildiğini göstermişlerdir. Buna karşılık, zayıf bir koşullandırma protokolü altında böyle bir etki bulunmamıştır. Bu sonuçların, endovanilloidlerin yalnızca güçlü bir duygusal deneyim mevcut olduğunda hipokampal bellek konsolidasyonunu modüle etmek için gerekli olduğunu gösterdiğini, ayrıca, TRPV1 agonisti kapsaisin'in, ne korku koşullandırmada ne de kademeli olarak önleyici kaçınma görevinde herhangi bir etki göstermediğini bildirmişlerdir. Son araştırmalar, endokannabinoid sistemin, güçlü bir korku eğitimi protokolü altında belleği modüle etmek için hipokampüste çalıştığını, ancak bu durumun zayıf veya daha az caydırıcı görev altında gerçekleşmediği, bellek üzerindeki etkisini uygulamak için belirli bir düzeyde caydırıcılık veya duygusal durumun gerekli olduğunu düşündürmektedir. Ayrıca, stres, glukokortikoidler veya duygusal anılara yanıt olarak anandamid salıverilmesinin arttığını bildiren sonuçlar da bulunmaktadır. Anandamidler, hem CB_1 hem de TRPV1 reseptörlerinin endojen ligandı olduğundan, kannabinoid araştırmalarından elde edilen bazı sonuçların kısmen vanilloid çalışmalarına aktarılabileceği gösterilmiştir (58-61). Genro ve ark.'nın (57) çalışması da kapsazepin'in belleğin konsolidasyonu üzerindeki amnezik etkisini göstermesi nedeniyle bu kannabinoid bildirimlerini doğrulamaktadır. Bu bulgular, önemli ölçüde stresli/rahatsızlık verici bir öğrenme sürecinde, anandamid gibi endovanilloidlerin TRPV1 reseptörleri üzerinde modülatör bir etkisi olduğunu düşündürmektedir (57, 62-68).

TRPV1 reseptörü eksikliği olan fareler, diğer fareler ile karşılaştırıldığında, bağlamsal korku koşullandırma testinde ve hipokampüs dilimlerinde LTP indüksiyonunda bozulma sergilemiştir (69,70,50). Mevcut sonuçlara göre, TRPV1 ablasyonunun etkisinin ancak güçlü

bir şartlandırma prosedüründen sonra belirgin olduğu gösterilmiştir (69). Li ve ark. (12), TRPV1 agonisti kapsaisin'in, bellek geri çağırmada tek başına bir etkisinin olmadığını, ancak uzaysal belleğin geri çağırılması üzerine akut stresin yaptığı etkiyi önlediğini bildirmişlerdir.

Çalışmamızda gerek ipuçlu korku koşullanma testinde gerekse bağlamsal korku koşullanma testinde kapsaisin ve kapsazepin'in bellek üzerine herhangi bir etkisi saptanmadı. Çalışmamız belleği bozulmamış hayvanlar üzerinde gerçekleştirilmiştir. Belleği bozulmuş hayvanlarda kapsaisin ve kapsazepin'in etkilerinin sonuçları bilinmemektedir. Sonuçlarımıza dayanarak kapsaisin ve kapsazepin'in belleği etkilemediği sonucuna varmak hatalı bir çıkarım olabilir. Herhangi bir yöntemle bellek bozukluğu oluşturulmuş hayvanlarda yapılacak testlerin sonucu daha farklı çıkabilir.

Çalışmada kapsaisin ve kapsazepin'in tek doz olarak kullanılması çalışmamızın bir başka kısıtlılığıdır. Çalışmamızda hem bağlamsal hem de ipuçlu korku koşullanmayı, bunun yanında öğrenme ve bellek sürecinin farklı aşamalarını (edinim, konsolidasyon, geri çağırma, sönme ve rekonsolidasyon) test ettiğimiz için çok sayıda grup üzerinde, çok sayıda hayvan kullanılarak testler gerçekleştirilmiştir. Bu ajanların farklı dozlarını da test etmeyi planlasaydık kullanılacak hayvan sayısı, kullanılacak doz düzeyine bağlı olarak en az 3 veya 5 kat daha fazla olacaktı. Bunun yerine, bu çalışmada elde edilecek sonuçlara bakarak öğrenme ve bellek sürecinin daha sınırlı bir aşaması üzerinde daha ileri doz çalışmaları yapmayı uygun gördük.

Sonuç olarak çalışmamızda TRPV1 agonisti kapsaisin ve antagonisti kapsazepin'in bağlamsal ve ipuçlu korku koşullanmanın herhangi bir aşamasında (öğrenme, konsolidasyon, geri çağırma, sönme ve rekonsolidasyon) bellek üzerinde etkisi olmadığı gösterildi. Bu sonuç literatürdeki verilerle sağlam bellek üzerinde yapılan çalışmalarla genel olarak uyuşmaktadır. Bozulmuş bellek üzerinde bu sonuçların etkilerini test etmek gerektiği düşünmekteyiz.

SONUÇLAR

Çalışmamızda transient reseptör potansiyel vanilloid 1 (TRPV1) agonisti kapsaisin ve antagonisti kapsazepinin farelerde korku koşullanma üzerine etkileri incelendi. Deneklere gruplarına göre sırasıyla rota-rod performans testi, bağlamsal ve ipuçlu korku koşullanma testleri uygulandı.

Kapsaisin ve kapsazepin gerek bağlamsal gerek ipuçlu korku koşullanma testinde öğrenme ve bellek sürecinin hiçbir aşamasında (edinim, konsolidasyon, geri çağırma, sönme ve rekonsolidasyon) istatistiksel anlamlı bir değişiklik oluşturmadı. Elde ettiğimiz sonuçlar kapsaisin ve kapsazepin'in ve dolayısı ile TRPV1 reseptörlerinin farelerde bağlamsal ve ipuçlu korku koşullanma testi ile incelenen belleğin bazal durumu üzerine herhangi bir etkisi olmadığını göstermektedir. Bununla birlikte, yapılan testlerin sağlıklı genç erişkin farelerde gerçekleştirildiğinin mutlaka göz önünde bulundurulması gereklidir. Bu sonuçlar, yaşlı farelerde, belleği herhangi bir şekilde bozulmuş farelerde, daha yüksek dozun uygulandığı testlerde, bellek başka bir test ile değerlendirildiğinde veya diğer hayvan türlerinde de aynı şekilde sonuç alınacağı anlamına gelmemektedir. Daha kesin bir sonuca varmak için, yukarıda sözü edilen koşullar altında yapılacak çalışmalara gereksinim duyulacağı sonucuna varılmıştır.

ÖZET

Transient Reseptör Potansiyel Vanilloid 1 (TRPV1) kanalları hücre membranı yerleşimli, içinde bir katyon kanalı bulunduran ve açıldığı zaman hücre içine kalsiyum girişine neden olan bir kanaldır. Bu çalışmada TRPV1 agonisti kapsaisin ve antagonisti kapsazepin'in korku koşullanma üzerine etkisinin araştırılması amaçlanmaktadır.

Çalışmada her grupta 10 hayvan olacak şekilde Balb/c türü toplam 300 adet fare kullanıldı. Davranış deneylerinde deneklere gruplarına uygun olarak TRPV1 agonisti kapsaisin (1 mg/kg, i.p.) veya TRPV1 antagonisti kapsazepin (1 mg/kg, i.p.) veya çözücü (1:1:8) uygulandı. Tüm gruplara rota-rod performans testi bağlamsal korku koşullanma testi ve ipuçlu korku koşullanma testi yapıldı.

Kapsaisin ve kapsazepin gerek bağlamsal gerek ipuçlu korku koşullanma testinde öğrenme ve bellek sürecinin hiçbir aşamasında (edinim, konsolidasyon, geri çağırma, sönme ve rekonsolidasyon) istatistiksel anlamlı bir değişiklik oluşturmadı. Elde ettiğimiz sonuçlar kapsaisin ve kapsazepin'in ve dolayısı ile TRPV1 reseptörlerinin farelerde bağlamsal ve ipuçlu korku koşullanma testi ile incelenen belleğin bazal durumu üzerine herhangi bir etkisi olmadığını göstermektedir. Bununla birlikte, yapılan testlerin sağlıklı genç erişkin farelerde gerçekleştirildiğinin mutlaka göz önünde bulundurulması gereklidir.

Elde ettiğimiz sonuçlar kapsaisin ve kapsazepin'in ve dolayısı ile TRPV1 reseptörlerinin farelerde bağlamsal ve ipuçlu korku koşullanma testi ile incelenen belleğin bazal durumu üzerine herhangi bir etkisi olmadığını göstermektedir.

Anahtar kelimeler: Transient Reseptör Potansiyel Vanilloid 1, kapsazepin, kapsaisin, hipokampüs, amigdala, korku koşullanma, korku belleği.

THE EFFECTS OF TRANSIENT RECEPTOR POTENTIAL VANILLOID 1 (TRPV1) AGONIST CAPSAICIN AND ANTAGONIST CAPSAZEPINE ON FEAR CONDITIONING IN MICE

SUMMARY

Transient Receptor Potential Vanilloid 1 (TRPV1) channels are located in the cell membrane, contain a cation channel, and when opened, cause calcium entry into the cell. The aim of this study was to investigate the effects of transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) agonist capsaicin and antagonist capsazepine on fear conditioning in mice.

In total 300 Balb/c mice were divided into 30 groups (n= 10 animals for each group). In the behavioral experiments, the TRPV1 antagonist capsazepine (1 mg/kg, i.p.) or TRPV1 agonist capsaicin (1 mg/kg, i.p.) or solvent (1:1:8) were administered to subjects according to their groups. Rota-rod performance test, contextual and cued fear conditioning test were performed in all groups.

Capsaicin and capsazepine were not statistically significant at any stage (acquisition, consolidation, retrieval, extinction, and reconsolidation) of the learning and memory process in the contextual and cued fear conditioning test. Our results show that capsaicin and capsazepine, and thus TRPV1 receptors, have no effect on the basal state of memory examined by contextual and cued fear conditioning testing in mice. However, it must be considered that the tests were performed in healthy young adult mice.

The results show that capsaicin and capsazepine, and thus TRPV1 receptors, have no effect on the basal state of memory examined by the contextual and cue fear conditioning test in mice.

Key words: Transient Receptor Potential Vanilloid 1, capsaicin, capsazepine, hippocampus, amygdala, fear conditioning, fear memory.

KAYNAKLAR

1. Carobi C, Garinei G. Effect of capsaicin on learning, retention and extinction of spatial and active avoidance tasks in adult rats neonatally treated. Cognitive Brain Res1995; 2:221-7.
2. Bevan S, Szolcsanyi, J. Sensory neuron-specific actions of capsaicin:mechanisms and applications. Trends Pharmacol Sci 1990; 11:330-3.
3. Buck SH, Burks TF. The neuropharmacology of capsaicin: review of some recent observations. Pharmacol Reu 1986; 38:179-226.
4. Fitzgerald M. Capsaicin and sensory neurons. A review. Pain 1983; 15:109-30.
5. Holzer P. Local effector functions of capsaicin-sensitive sensory nerve endings: involvement of tachykinins, calcitonin gene-related peptide and other neuropeptides. Neuroscience 1988; 24:739-68.
6. Holzer P. Capsaicin: cellular targets, mechanisms of action, and selectivity for thin sensory neurons, Pharmacol Rev 1991;43:143-201.
7. Jancso G, Kiraly E, Such G, Joo F and Nagy A. Neurotoxic effect of capsaicin in mammals. Acta Physiol Hung 1987;69: 295-313.
8. Kumazawa T. Functions of the nociceptive primary neurons. Jpn J Physiol 1990; 40: 1-14.
9. Huang SM, Bisogno T, Trevisani M, Al-Hayani A, De Petrocellis L, Fezza F, et al. An endogenous capsaicin-like substance with high potency at recombinant and native vanilloid VR1 receptors. Proc Natl Acad Sci USA 2002; 99:8400-5.
10. Gibson HE, Edwards JG, Page RS, Van Hook MJ, Kauer JA. TRPV1 channels mediate long-term depression at synapses on hippocampal interneurons. Neuron 2002;57:746-59.
11. Marsch R, Foeller E, Rammes G, Bunck M, Kössl M, Holsboer F, et al. Reduced anxiety, conditioned fear, and hippocampal long-term potentiation in transient receptor potential vanilloid type 1 receptor deficient mice. J Neurosci 2007; 27:832-9.
12. Li HB, Mao RR, Zhang JC, Yang Y, Cao J, Xu L. Antistress effect of TRPV1 channel on synaptic plasticity and spatial memory. Biol Psychiatry 2008; 64:286-92.

13. Mezey E, Toth ZE, Cortright DN, Arzubi MK, Krause JE, Elde R, et al. Distribution of mRNA for vanilloid receptor subtype 1 (VR1), and VR1-like immunoreactivity, in the central nervous system of the rat and human. Proc Natl Acad Sci USA 2000; 97:3655–60.

14. Roberts JC, Davis JB, Benham CD. [3H] resiniferatoxin autoradiography in the MSS of wild-type and TRPV1 null mice defines TRPV1 (VR-1) protein distribution. Brain Res 2004; 995:176–83.

15. Cristino L, De Petrocellis L, Pryce G, Baker D, Guglielmotti V, Di Marzo V. Immunohistochemical localization of cannabinoid type 1 and vanilloid transient receptor potential vanilloid type 1 receptors in the mouse brain. Neuroscience 2006; 139:1405–15.

16. De Petrocellis L, Di Marzo V. Lipids as regulators of the activity of transient receptor potential type V1 (TRPV1) channels. Life Sci 2005;77:1651–66.

17. Wilson RI, Nicoll RA. Neuroscience: endocannabinoid signaling in the brain. Science 2002; 296:678–82.

18. Toth A, Boczan J, Kedei N, Lizanecz E, Bagi Z, Papp Z, et al. Expression and distribution of vanilloid receptor 1 (TRPV1) in the adult rat brain. Mol Brain Res 2005;135:162–8.

19. Mackie K, Hille B. Cannabinoids inhibit N-type calcium channels in neuroblastoma glioma-cells. Proc Natl Acad Sci USA 1992; 89:3825–9.

20. Freund TF, Katona I, Piomelli D. Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. Physiol Rev 2003; 83:1017–66.

21. Van der Stelt M, Trevisani M, Vellani V, De Petrocellis L, Moriello AS, Campi B, et al. Anandamide acts as an intracellular messenger amplifying Ca^{2+} influx via TRPV1 channels. EMBO J 2005;24:3517–8.

22. Schacter DL WA. Learning and Memory. In: Kandel ER SJ, Jessell, TM SS, Hudspeth AJ.(Eds), editors. Principles of Neural Science. 5th ed. New York: The McGraw-Hill Companies; 2013. p. 1441-60.

23. Sweatt JD. The Basics of Psychological Learning and Memory Theory. In: Sweatt JD, editor. Mechanism of Memory. 2nd ed. USA: Elsevier; 2010. p. 2-23.

24. Roediger HLI, Zaromb FM, Goode MK. A Typology of Memory Terms. In: Byrne jH, editor. Concise Learning and Memory: The Editor's Selection. 1st ed. Slovenia: Elsevier; 2009. p. 1-13

25. Gathercole SE. Working Memory. In: Byrne JH, editor. Concise Learning and Memory: The Editor's Selection. Slovenia: Elsevier; 2008. p. 149-67.

26. Bailey CH, Bartsch D, Kandel ER. Toward a molecular definition of long-term memory storage. Proc Natl Acad Sci U S A 1996; 93:13445-52.

27. Guyton AC. Beyin Korteksi, Beynin Zihinsel İşlevleri, Öğrenme ve Bellek (çeviri: Peker G.Ö.). Yeğen BÇ (Editor). Guyton ve Hall Tıbbi Fizyoloji. 12. baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi; 2013. s.697-709.

28. Squire LR. Declarative and nondeclarative memory: multiple brain systems supporting learning and memory. J Cogn Neurosci 1992; 4:232-43.

29. Squire LR, Dede AJ. Conscious and unconscious memory systems. Cold Spring Harb Perspect Biol 2015;7(3): a021667.

30. Squire LR, Shrager Y. Declarative Memory System: Amnesia. In: Byrne JH, editor. Concise Learning and Memory: The Editor's Selection. Slovenia: Elsevier; 2008. p. 15-26.

31. Stevens W.D. WGS, Schacter D.L. Implicit Memory and Priming. In: Byrne JH, editor. Concise Learning and Memory:The Editor's Selection. Slovenia: Elsevier; 2009. p. 65-83.

32. Keifer OP Jr, Hurt RC, Ressler KJ, Marvar PJ. The Physiology of Fear: Reconceptualizing the Role of the Central Amygdala in Fear Learning. Physiology (Bethesda) 2015; 30:389- 401.

33. Izquierdo I, Furini CR, Myskiw JC. Fear Memory. Physiol Rev 2016; 96:695-750.

34. Pape HC, Pare D. Plastic synaptic networks of the amygdala for the acquisition, expression, and extinction of conditioned fear. Physiol Rev 2010; 90:419-63.

35. Bergstrom HC. The neurocircuitry of remote cued fear memory. Neurosci Biobehav Rev 2016;71409-17.

36. Schafe GE, Doux JEL. Neural and Molecular Mechanisms of Fear Memory. In: Byrne JH, editor. Concise Learning and Memory: The Editor's Selection. Slovenia: Elsevier; 2008. p. 430-64.

37. Sarinana J, Kitamura T, Kunzler P, Sultzman L, Tonegawa S. Differential roles of the dopamine 1-class receptors, D1R and D5R, in hippocampal dependent memory. Proc Natl Acad Sci USA 2014; 111:8245-50.

38. Sotres-Bayon F, Cain CK, LeDoux JE. Brain mechanisms of fear extinction: historical perspectives on the contribution of prefrontal cortex. Biol Psychiatry 2006; 60:329-36.

39. Yamauchi R, Wada E, Kamichi S, Yamada D, Maeno H, Delawary M, et al. Neurotensin type 2 receptor is involved in fear memory in mice. J Neurochem 2007;102:1669-76.

40. Abel T, Lattal KM. Molecular mechanisms of memory edinim, consolidation and retrieval. Curr Opin Neurobiol 2001; 11:180-7.

41. Poulos AM, Christian KM, Thompson RF. Procedural Learning: Classical Conditioning. In: Byrne JH, editor. Concise Learning and Memory: The Editor's Selection. Slovenia: Elsevier; 2008. p. 403-27.

42. Sweatt JD. Rodent Behavioral Learning and Memory Models. In: Sweatt D, editor. Mechanism of Memory. USA: Elsevier; 2010. p. 78-103.

43. Fiorenza NG, Rosa J, Izquierdo I, Myskiw JC. Modulation of the extinction of two different fear-motivated tasks in three distinct brain areas. Behav Brain Res 2012;232:210-6.

44. Phillips RG, LeDoux JE. Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. Behav Neurosci. 1992;106:274-85.

45. Jia YF, Li YC, Tang YP, Cao J, Wang LP, Yang YX, et al. Interference of TRPV1 function altered the susceptibility of PTZ-induced seizures. Front Cell Neurosci 2015;10:1-8.

46. Krabbe S, Gründemann J, Lüthi A. Amygdala inhibitory circuits regulate associative fear conditioning. Biol Psychiatry 2018;83:800–9.

47. King EC, Pattwell SS, Glatt CE, Lee FS. Sensitive periods in fear learning and memory. Stress 2014;17(1):13-21.

48. Hind WH, Tufarelli C, Neophytou M, Anderson SI, England TJ, O'Sullivan SE. Endocannabinoids modulate human blood-brain barrier permeability in vitro. Br J Pharmacol 2015;172:3015-27.

49. Stern CAJ, de Carvalho CR, Bertoglio LJ, Takahashi RN. Effects of Cannabinoid Drugs on Aversive or Rewarding Drug-Associated Memory Extinction and Reconsolidation. Neuroscience 2018;370:62-80.

50. Caterina MJ, Leffler A, Malberg AB, Martin WJ, Trafton J, Petersen-Zeitz KR, et al. İmpaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. Science 2000;288: 306-13.

51. Nagy I, Santha P, Jancso G, Urban L. The role of the vanilloid (capsaicin) receptor (TRPV1) in physiology and pathology. Eur J Pharmacol 2004;500: 351-69.

52. Szallasi A, Blumberg PM. Vanilliod (capsaicin) receptors and mechanisms. Pharmacological Rev 1999;51:159-211.

53. Basith S, Cui M, Hong S, Choi S. Harnessing the Therapeutic Potential of Capsaicin and Its Analogues in Pain and Other Diseases. Molecules 2016;21:966.

54. Jiang X, Jia LW, Li XH, Cheng XS, Xie JZ, Ma ZW, Xu WJ, Liu Y, Yao Y, Du LL, Zhou XW. Capsaicin ameliorates stress-induced Alzheimer's disease-like pathological and cognitive impairments in rats. J Alzheimers Dis 2013; 35:91-105.

55. Shiri M, Komaki A, Oryan S, Taheri M , Komaki H, Etaee F. Effects of cannabinoid and vanilloid receptor agonists and their interaction on learning and memory in rats. Can J Physiol Pharmacol 2017;95(4):382-87.

56. Tyagi S, Shekhar N, Thakur AK. Protective Role of Capsaicin in Neurological Disorders: An Overview. Neurochem Res In press 2022.

57. Genro BP, de Oliveira Alvares L, Quillfeldt JA. Role of TRPV1 in consolidation of fear memories depends on the averseness of the conditioning procedure. Neurobiol Learn Mem 2012; 97: 355–60.

58. Roozendaal B, McEwen BS, Chattarji S. Stress, memory and the amygdala. Nat Rev Neurosci 2009;10:423–33.

59. Suzuki A, Josselyn SA, Frankland PW, Masushige S, Silva AJ, Kida S. Memory reconsolidation and extinction have distinct temporal and biochemical signatures. J Neurosci 2004;24:4787–95.

60. Robinson HA, Pozzo-Miller L. The role of MeCP2 in learning and memory. Learn Mem 2019; 26:343-50.

61. Gathercole SE. Working Memory. In: Byrne JH, editor. Concise Learning and Memory: The Editor's Selection. Slovenia: Elsevier; 2008. p. 149-67.

62. de Oliveira Alvares L, de Oliveira LF, Camboim C, Diehl F, Genro BP, Lanziotti VB, et al. Amnestic effect of intrahippocampal AM251, a CB1-selective blocker, in the inhibitory avoidance, but not in the open field habituation task, in rats. Neurobiol Learn Mem 2005;83:119–24.

63. de Oliveira Alvares L, Engelke DS, Diehl F, Scheffer-Teixeira R, Haubrich J, de Freitas Cassini L, et al. Stress response recruits the hippocampal endocannabinoid system for the modulation of fear memory. Learn Mem 2010;17:202–9.

64. de Oliveira Alvares L, Genro BP, Diehl F, Quillfeldt JA. Differential role of the hippocampal endocannabinoid system in the memory consolidation and retrieval mechanisms. Neurobiol Learn Mem 2008;90:1–9.

65. de Oliveira Alvares L, Genro BP, Vaz Breda R, Pedroso MF, Da Costa JC, Quillfeldt J A. AM251, a selective antagonist of the CB1 receptor, inhibits the induction of long-term potentiation and induces retrograde amnesia in rats. Brain Res 2006;1075:60–7.

66. Kulisch C, Albrecht D. Effects of single swim stress on changes in TRPV1 mediated plasticity in the amygdala. Behav Brain Res 2013;236:344-9.

67. Laricchiuta D, Centonze D, Petrosini L. Effects of endocannabinoid and endovanilloid systems on aversive memory extinction. Behav Brain Res 2013; 256:101-7.

68. Frankland PW, Josselyn SA, Anagnostaras SG, Kogan JH, Takahashi E, Silva AJ. Consolidation of CS and US representations in associative fear conditioning. Hippocampus 2004; 14:557–69.

69. Marsch R, Foeller E, Rammes G, Bunck M, Kössl M, Holsboer F, et al. Reduced anxiety, conditioned fear, and hippocampal long-term potentiation in transient receptor potential vanilloid type 1 receptor-deficient mice. J Neurosci 2007; 27: 832–39.

70. Blanchard DC, Blanchard RJ. Innate and conditioned reactions to threat in rats with amygdaloid lesions. J Comp Physiol Psychol 1972; 81:281-90.

ŞEKİLLER

Şekil 1. Uzun dönem bellekte saklanan bilginin niteliğine göre belleğin gruplandırılması ve ilişikli beyin bölgeleri (29) 5

Şekil 2. Klasik korku koşullanmanın basitleştirilmiş sinirsel devreleri (47) 9

Şekil 3. Korku yanıtının oluşmasında rol oynayan genel mekanizma (A) ve sönme (extinction) sürecindeki genel mekanizma (B) (46). 11

Şekil 4. Korku yanıtının düzenlenmesi. A. Koşullu uyaran (CS) ve B. Koşulsuz uyaran (US) ile temel nöron (PN) uyarımı. C. Korku ekspresyonu ve D. Sönme sırasında infralimbik (IL) ve prelimbik (PL) medial prefrontal kortekse (mPFC) projeksiyon yapan PN'ler arasındaki aktivite kaymasını sağlayan GABAerjik ara nöron (CCK_L) aktivitesi (24). 11

Şekil 5. Beyin endokannabinoid (eCB) sistemi ve burada tartışılan ilaçların etki etmesi önerilen ana farmakolojik hedefleri (52). 12

Şekil 6. VR1 reseptörünün yapısı (54). 14

Şekil 7. Kapsaisin'in yapısı (55,56). 15

Şekil 8. Kapsazepin 2 boyutlu yapısı. A Bölgesi hidrofilik aromatik bir halkadır, B Bölgesi tiyoüredir ve C Bölgesi bir R grubudur. 16

Şekil 9. Rota-rod cihazı 19

Şekil 10. Korku koşullanma cihazının kapak kapalı dış görünümü (solda), korku koşullanma cihazı kapak açık iç görünüm (sağda). 20

Şekil 11. İpuçlu korku koşullanma testlerden alınan kayıtlar (solda) ve deney düzeneği (sağda) 21

Şekil 12. Çalışma planı. 22

Şekil 13. İpuçlu (A) ve bağlamsal korku koşullanma (B) testleri uygulanan gruplarda vücut ağırlıkları (Dikey çubuklar ortalamanın standart hatasını göstermektedir). 25

Şekil 14. İpuçlu (A) ve bağlamsal korku koşullanma (B) testleri uygulanan gruplarda rota-rod testinde dönen mil üzerinde kalma süreleri (Dikey çubuklar ortalamanın standart hatasını göstermektedir). 25

Şekil 15. İpuçlu korku koşullanma edinim testinde kontrol, kapsaisin veya kapsazepin gruplarında donma süreleri (Dikey çubuklar ortalamanın standart hatasını göstermektedir). 26

Şekil 16. İpuçlu korku koşullanma konsolidasyon testinde kontrol, kapsaisin veya kapsazepin gruplarında donma süreleri (Dikey çubuklar ortalamanın standart hatasını göstermektedir). 26

Şekil 17. İpuçlu korku koşullanma geri çağırma testinde kontrol, kapsaisin veya kapsazepin gruplarında donma süreleri (Dikey çubuklar ortalamanın standart hatasını göstermektedir). 27

Şekil 18. İpuçlu korku koşullanma edinim testinde cinsiyet bakımından; kontrol, kapsaisin veya kapsazepin gruplarında donma süreleri (Dikey çubuklar ortalamanın standart hatasını göstermektedir). 27

Şekil 19. İpuçlu korku koşullanma konsolidasyon testinde cinsiyet bakımından; kontrol, kapsaisin veya kapsazepin gruplarında donma süreleri (Dikey çubuklar ortalamanın standart hatasını göstermektedir). 28

Şekil 20. İpuçlu korku koşullanma geri çağırma testinde cinsiyet bakımından; kontrol, kapsaisin veya kapsazepin gruplarında toplam donma süreleri (Dikey çubuklar ortalamanın standart hatasını göstermektedir). 28

Şekil 21. İpuçlu korku koşullanma sönme testinde 2., 5. ve 9. günlerde kontrol, kapsaisin veya kapsazepin gruplarında toplam donma süreleri (İstatistiksel anlamlılık 2 yönlü ANOVA *post hoc* Bonferroni testi sonucunu, dikey çubuklar ise ortalamanın standart hatasını göstermektedir). 29

Şekil 22. İpuçlu korku koşullanma rekonsolidasyon testinde 5. ve 9. günlerde kontrol, kapsaisin veya kapsazepin gruplarında toplam donma süresi (Dikey çubuklar ortalamanın standart hatasını göstermektedir). 29

Şekil 23. Bağlamsal korku koşullanma edinim testinde kontrol, kapsaisin veya kapsazepin gruplarında donma süreleri (Dikey çubuklar ortalamanın standart hatasını göstermektedir). 30

Şekil 24. Bağlamsal korku koşullanma edinim testinde cinsiyet bakımından; kontrol, kapsaisin veya kapsazepin gruplarında donma süreleri (Dikey çubuklar ortalamanın standart hatasını göstermektedir). 30

Şekil 25. Bağlamsal korku koşullanma konsolidasyon testinde kontrol, kapsaisin veya kapsazepin gruplarında donma süreleri (Dikey çubuklar ortalamanın standart hatasını göstermektedir). 31

Şekil 26. Bağlamsal korku koşullanma konsolidasyon testinde cinsiyet bakımından; kontrol, kapsaisin veya kapsazepin gruplarında donma süreleri (Dikey çubuklar ortalamanın standart hatasını göstermektedir). 31

Şekil 27. Bağlamsal korku koşullanma geri çağırma testinde kontrol, kapsaisin veya kapsazepin gruplarında donma süreleri (Dikey çubuklar ortalamanın standart hatasını göstermektedir). 32

Şekil 28. Bağlamsal korku koşullanma geri çağırma testinde cinsiyet bakımından; kontrol, kapsaisin veya kapsazepin gruplarında toplam donma süreleri (Dikey çubuklar ortalamanın standart hatasını göstermektedir). 32

Şekil 29. Bağlamsal korku koşullanma sönme testinde 2., 5. ve 9. günlerde kontrol, kapsaisin veya kapsazepin gruplarında toplam donma süreleri (Dikey çubuklar ortalamanın standart hatasını göstermektedir. *2. gün değerine karşı p=0,0005; **2. gün değerine karşı p=0,0002; †2. gün değerine karşı p=0,0118; ††2. gün değerine karşı p=0,0002; ‡2. gün değerine karşı p=0,0341; ‡‡2. gün değerine karşı p<0,0001; ‡‡‡5. gün değerine karşı p=0,0482; 2 yönlü RM ANOVA, *post hoc* Bonferroni testi). 33

Şekil 30. Bağlamsal korku koşullanma rekonsolidasyon testinde 5. ve 9. günlerde kontrol, kapsaisin veya kapsazepin gruplarında toplam donma süresi (Dikey çubuklar ortalamanın standart hatasını göstermektedir. *5. gün değerine karşı p=0,0357; †5. gün değerine karşı p=0,0258; 2 yönlü RM ANOVA, *post hoc* Bonferroni testi). 34

TABLOLAR

Tablo 1. Çalışmadaki tedavi grupları. 18

ÖZGEÇMİŞ

İlk, Orta ve Lise öğrenimimi İstanbul'da tamamladıktan sonra 1988 yılında Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesinde eğitimime başladım. 1994 yılında Tıp Fakültesinden mezun oldum. 1994 yılında Zonguldak ili Devrek ilçesi Karacaören Sağlık Ocağında mecburi hizmet görevime başladım. Daha sonrasında Zonguldak ili 3 Nolu Merkez Sağlık Ocağında sorumlu hekim olarak göreve başladım. 1997 yılında İstanbul ili Ümraniye ilçesi Merkez Sağlık Ocağına başladım. 1999 yılında Marmara üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsünde Sağlık Kurumları Yöneticiliğinde tezli yüksek lisansa başladım ve 2003 yılında bu eğitimimi tamamladım. 2006 yılında; Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Farmakoloji doktora programına başladım. 2007 yılına kadar Ümraniye merkez Sağlık Ocağı sorumlu hekimliği görevini yürüttükten sonra, 2007 yılından 2010 yılına kadar Ümraniye İlçesi Eğitim Araştırma Sağlık Grup Başkanlığı'nda Sağlık grup Başkanı olarak görevinde bulundum. 2010 yılı başında, Edirne İl Sağlık Müdürlüğü Merkez Toplum Sağlığı sorumlu hekimi olarak görevlendirildim. Daha sonrasında Edirne İl Sağlık Müdür Yardımcılığı görevine atandım. Bu görevin akabinde sırasıyla Havsa ilçe Toplum Sağlığı Merkezi Sorumlu Hekimliği ve Edirne Devlet Hastanesi Havsa Ünitesi Birim Sorumlusu olarak görev yaptım. 2014 yılından itibaren de, Edirne Sultan 1.Murat Devlet Hastanesinde Başhekim Yardımcısı olarak görevime devam etmekteyim.

EKLER

Ek 1

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
(Trakya University, Local Ethics Committee of Animal Experiments)

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARLARI

Oturum Sayısı: 2018/05
Karar No: 2018.05.05
Karar Tarihi: 25.05.2018
Hayvan Sayısı ve Cinsi: 300 fare

Yürütücülüğünü Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi Prof. Dr. Çetin Hakan KARADAĞ'ın yaptığı, Dr. Murat ŞAHİN'in doktora tezi olarak planlanan TÜHADYEK-2018/22 protokol nolu "**Transient reseptör potansiyel vanilloid 1 (TRPVI) agonisti kapsaisin ve antagonisti kapsazepinin farelerde korku koşullanma üzerine etkileri**" başlıklı çalışma görüşüldü. Araştırmanın amaç, yaklaşım, gereç ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmesi sonucunda; Hayvan deneyleri etik kurullarının çalışma usul ve esaslarına dair yönetmelik ve Trakya Üniversitesi hayvan deneyleri yerel etik kurulu yönergesinde belirtilen ilke ve kurallara uygun bulunarak, çalışmanın yapılabileceğine mevcudun oy birliği ile karar verilmiştir.

Prof. Dr. Enis ULUÇAM
Başkan
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☐yok
Toplantı Katılım: ☐evet ☐ hayır

Vet. Hekim Ziya ÇUKUR
Vet. Hek. Üye
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☐yok
Toplantı Katılım: ☐ evet ☐ hayır

Yrd. Doç. Dr. Hayati ARDA
Fen Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☐yok
Toplantı Katılım: ☐ evet ☐ hayır

Yrd. Doç. Dr. Beytullah ÖZKAN
Fen Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☐yok
Toplantı Katılım: ☐ evet ☐ hayır

Prof. Dr. Y. Atakan SEZER
Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☐yok
Toplantı Katılım: ☐ evet ☐ hayır

Prof. Dr. Tevfik AKTOZ
Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☐yok
Toplantı Katılım: ☐ evet ☐ hayır

Doç. Dr. Hakan GÜRKAN
Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☐yok
Toplantı Katılım: ☐evet ☐ hayır

Doç. Dr. Elvan BAKAR
Eczacılık Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☐yok
Toplantı Katılım: ☐ evet ☐ hayır

Ecz. F. Uygar GÜLER
Sivil Toplum Kuruluşu Sivil Üye
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☐yok
Toplantı Katılım: ☐ evet ☐ hayır

Ayhan [illegible]AZ
Sivil Üye
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☐yok
Toplantı Katılım: ☐ evet ☐ hayır