T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Çetin Hakan KARADAĞ
Prof. Dr. Ahmet ULUGÖL

GRUP II METABOTROPİK GLUTAMAT RESEPTÖRLERİNİN FARELERDE UZAYSAL BELLEK ÜZERİNE ETKİSİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Burcu ÇETİNKAYA

Referans no: 10114660

EDİRNE-2016

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Çetin Hakan KARADAĞ
Prof. Dr. Ahmet ULUGÖL

GRUP II METABOTROPİK GLUTAMAT RESEPTÖRLERİNİN FARELERDE UZAYSAL BELLEK ÜZERİNE ETKİSİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Burcu ÇETİNKAYA

Destekleyen Kurum: TÜBAP 2011/97

Tez No:

EDİRNE-2016

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğü

O N A Y

Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde ve Prof. Dr. Ç. Hakan KARADAĞ'ın danışmanlığında Yüksek Lisans öğrencisi Burcu ÇETİNKAYA'ya ait tez başlığı "Grup II Metabotropik Glutamat Reseptörlerinin Farelerde Uzaysal Bellek Üzerine Etkisi" olarak teslim edilen bu tezin tez savunma sınavı 06.06.2016 tarihinde yapılarak aşağıdaki jüri üyeleri tarafından **"Yüksek Lisans Tezi"** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ç. Hakan KARADAĞ
JÜRİ BAŞKANI

Prof. Dr. Aydın BARLAS
ÜYE

Prof. Dr. Dikmen DÖKMECİ
ÜYE

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

Doç. Dr. Tammam SİPAHİ
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimimde emeği geçen Trakya Üniversitesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı tez Danışmanım Prof. Dr. Hakan KARADAĞ'a, Prof. Dr. Ahmet ULUGÖL'e, Prof. Dr. Dikmen DÖKMECİ'ye, Yrd. Doç. Dr. Özgür GÜNDÜZ'e, Yrd. Doç. Dr. R. Deniz TOPUZ'a, tez çalışmamda azim ve motivasyonumu sağlayan değerli annem Sebahat ÇETİNKAYA'ya, varlığıyla sorumluluklarımı arttırarak hedeflerimi büyüten çok sevgili yeğenim A. İnanç BARINÇ'a, ve projemizin gerçekleşmesinde desteklerinden dolayı TÜBAP birimine sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ **1**

GENEL BİLGİLER **3**

- **BEYİN, ÖĞRENME VE BELLEK** **3**
- **BELLEK OLUŞUMUNUN HÜCRESEL MODELİ LTP** **6**
- **GLUTAMAT** **7**

GEREÇ VE YÖNTEMLER **15**

BULGULAR **18**

TARTIŞMA **31**

SONUÇLAR **35**

ÖZET **36**

SUMMARY **37**

KAYNAKLAR **38**

ŞEKİLLER LİSTESİ **46**

ÖZGEÇMİŞ **47**

EKLER

SİMGE VE KISALTMALAR

AMPA **:** α-amino- 3- hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropionil asit

ATP **:** Adenozin trifosfat

BDNF **:** Brain derived neurotrophic factor

CaMKII **:** Kalsiyum- kalmodulin bağımlı protein kinaz

cAMP **:** Siklik adenozin monofosfat

cGMP **:** Siklik guanozin mono fosfat

CREB **:** cAMP- response element-binding protein

EAA **:** Eksitatör amino asit

EPSP **:** Eksitatör postsinaptik potansiyel

GPCR **:** G-protein ile kenetli reseptör

GRIP **:** Glutamat reseptör etkileyici protein

iGluR **:** İyonotropik glutamat reseptörü

KA **:** Kainik asit

LTP **:** Long term potentiation

MAPK **:** Mitojenle aktive edilen protein kinaz

mGluR **:** Metabotropik glutamat reseptörü

NMDA **:** N-metil D- aspartat

NO **:** Nitrik oksit

PKA **:** Protein kinaz A

VGLUT **:** Veziküler glutamat taşıyıcılar

GİRİŞ VE AMAÇ

Hipokampüsteki sinirsel faaliyet uzaysal öğrenme ve bellekte önemli bir rol oynamaktadır. Santral sinir sistemindeki en yaygın eksitatör nörotransmiter olmasının yanısıra, öğrenme ve bellekte rol oynadığı öne sürülen hipokampal mediyatörler incelendiğinde, glutamat ön plana çıkmaktadır. Glutamat reseptörleri iyonotropik ve metabotropik reseptörler olmak üzere iki ana başlık altında ele alınmaktadır. İyonotropik reseptörlerin işlevleri hakkında çok sayıda araştırma yapılmış olup, özellikle N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptörleri üzerindeki çalışmalar giderek artmaya devam etmektedir. Diğer taraftan metabotropik glutamat reseptörleri hakkındaki bilgilerimiz, iyonotropik reseptörlere oranla oldukça azdır. Grup II metabotropik reseptörlerin hipokampüste bulunduğu bilinmektedir. Bu çalışmada, söz konusu reseptörlerin hipokampüs tarafından düzenlenen uzaysal öğrenme ve bellek fonksiyonlarında herhangi bir rol oynayıp oynamadığının araştırılması amaçlanmaktadır.

H.M. adlı vakanın 1957 yılında tanımlanmasıyla mediyal temporal lobun bellekte önemli bir rol oynadığının anlaşılmasından sonra, mediyal temporal lob yapıları ve özellikle hipokampüs üzerinde kapsamlı araştırmalar yapılmış ve bu yapıların uzaysal bellekteki rolü aydınlatılmaya çalışılmıştır. Hipokampüste uzun süreli potansiyalizasyonun (*long term potentiation* [LTP]) tanımlanması ve LTP gelişiminde glutamatın önemli bir rol oynadığının anlaşılması dikkatleri glutamat üzerine çekmiştir (1). Glutamatın iyonotropik reseptörleri üzerinde kapsamlı araştırmalar yürütülmüş ve halen yürütülmektedir. Diğer taraftan, glutamatın 8 adet metabotropik reseptörü tanımlanmış olup, bu reseptörler, iyonotropik reseptörler kadar kapsamlı bir şekilde araştırılabilmiş değildir. Grup I (mGluR1 ve mGluR5), Grup II (mGluR2 ve mGluR3) ve Grup III (mGluR4, mGluR6, mGluR7 ve mGluR8) şeklinde

sınıflandırılan metabotropik glutamat reseptörlerinin beyindeki dağılımı incelenmiş olup, grup II reseptörlerin limbik sistem, assosiyasyon korteksleri, hipokampüsün dentat girus ve CA1 bölgelerinde, amigdalanın lateral ve bazolateral çekirdeklerinde yüksek derecede eksprese edildiği saptanmıştır (2,3). Hipokampüsün uzaysal bellek işlevi ile ilişkili önemli bir bölge olması ve glutamatın bellekte rol oynayan önemli bir mediyatör olması nedeniyle, bu reseptörleri uyaran veya bloke eden ajanların uzaysal belleği etkileyip etkilemeyecekleri sorusu araştırılması gereken bir konudur.

Sonuç olarak bu çalışmada Grup II metabotropik reseptörlerin farelerdeki uzaysal öğrenme ve bellek süreçlerine etkisinin araştırılması planlanmış olup, Morris su labirenti düzeneğinde farelerin saklı platformun yerini öğrenmeleri için uygulanan eğitimlerle, öğrenme ve bellek işlevlerinin test edilmesi ve Grup II metabotropik reseptör agonist ve antagonistlerinin bu işlevler üzerine etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

GENEL BİLGİLER

BEYİN, ÖĞRENME VE BELLEK

Beyin yaklaşık 1,5 kg ağırlığında, evrende keşfedile gelmiş en karmaşık malzemelerden biridir. Nöron ve glia adı verilen yüz milyarlarca hücreden oluşur. Her hücre, saniyede 100 defaya varabilen bir hızla diğer hücrelere elektrik sinyalleri gönderir. Genel olarak tek bir nöron, komşu nöronlarla yaklaşık 10.000 bağlantı kurmuş durumdadır. Milyarlarca nöron olduğu düşünülürse, beynin etkileyici bir ağ örüntülerinden oluştuğunu söylemek yanlış olmayacaktır. Beyindeki bu ağ örüntülerinde gerçekleşen kimyasal elektriksel olaylar, öğrenme ve bellek olayları üzerine etkilidir. Öğrenme, bellek, biliş ve beyin kavramları insanlık tarihinin en eski konularından biridir. Bilimsel değer açısından bakıldığında ise beynin işlevi olan öğrenme ve bellek birçok fizyolog, nörolog ve hatta filozof tarafından çalışma konusu olarak ele alınmıştır (4-7).

Öğrenme - Bellek Tanım ve Sınıflandırma

Öğrenme, yeni bilgilerin elde edilmesi ve yaşanılan tecrübeler sonucunda canlının davranışında oluşan değişimleri tanımlamak için kullanılır. Bellek ise öğrenilen bu bilgi ve tecrübeleri saklayabilme ve belli bir zaman sonra geri çağırabilme yeteneği olarak bilinir (8). Farklı memeli türlerinde kapasite oranları değişse de, genel ifade ile memeli santral sinir sistemi (SSS)'nin en önemli özelliklerinden biri de büyük miktarda bilgi depolama ve işlem yeteneğinin olmasıdır. Modern davranışsal ve biyolojik çalışmalar öğrenme ve belleğin tek bir işlemden oluşmadığını göstermiştir. Sinir sistemimiz kompleks mekanizmalarla çalışmaktadır ve sinir sisteminin bir çok elemanı öğrenme ve bellek sürecinde etkilidir. Öğrenme ve bellek birbiriyle yakın ilişkilidir ve bir arada ele alınmalıdır.

Belleğin Tipleri

Bilginin depolanması anlamına gelen bellek, birçok farklı parametrenin değerlendirilmesi sonucunda sınıflandırılmıştır. Bellek, bölünmez bir fenomen olmadığı gibi tek bir psikolojik işleve hizmet etmez. Olaylar, yüzler, duyular, farklı işlemler, müzik, sembol sistemleri, kelimeler ve bağlamlar için farklı belleğimiz olduğu düşünülmektedir. Bellek tiplerinin özelliklerini göstermek üzere kullanılan popüler ve klinik olarak yararlanılan ve Squire tarafından öne sürülen bir şema mevcuttur. Bellek zaman parametresine (kısa süreli, uzun süreli), içeriğine (epizodik, semantik) ve işlem düzeyine (kodlama, geri çağırma) göre farklı başlıklar altında ele alınabilir. Bellek işlevlerinde beynin birçok alanının işlevsel olabileceği düşünülmektedir. Farklı bellek işlevlerinin beyinde farklı yolakları içermesi mümkündür (1).

Zaman Parametresine Göre Bellek Tipleri

Olayların hatırlanma sürelerine göre bellek, kısa süreli bellek, orta süreli bellek ve uzun süreli bellek olarak sınıflandırabilir (1).

Kısa süreli bellek: Nöroloji alanındaki klinisyenlerin çoğu için son 1-2 günde meydana gelen olayların hatırlanıp hatırlanmaması anlamına gelmektedir. Nöropsikolojik terminoloji açısından kısa süreli bellek, sadece birkaç saniye süren bellek anlamına gelir. Değerlendirmeler yapılırken sayı uzamı (*digit span*) ve harf testi gibi birçok farklı testler kullanılır. Farklı kaynaklarda ise birkaç saniye veya birkaç dakika süre boyunca, ortalama 10 rakamı hatırda tutmak gibi kişinin bu rakamları veya olayları sürekli düşünerek hatırlayabilmesini sağlayan bellektir. Kısa süreli bellek nöronlardaki presinaptik fasilitasyon veya inhibisyon ile oluşur. Kısa süreli bellek oluşumu, postsinaptik nöron ya da bir sonraki nöron üzerinde değil presinaptik uçlar üzerinde yer alan sinapslarda gerçekleşir. Presinaptik bölgeden salınan nörotransmitterler çoğu zaman saniyelerce hatta dakikalarca süren bir fasilitasyona veya inhibisyona neden olurlar (9,11).

Orta uzun süreli bellek: Kısa süreli bellek ile uzun süreli bellek arasında bir geçiş durumudur ve bazen kısa süreli bellekteki bilgiler gibi kaybolur ya da uzun süreli belleğe dönüşür. Orta uzun süreli bellekteki veri izleri sürekli hale getirilemezse zamanla kaybolur; sürekli hale getirilirse uzun süreli bellek olarak sınıflandırılırlar. İlkel hayvanlardan *Aplysia* üzerinde yapılan çalışmalar, bu tür belleklerin ya presinaptik uçlarda ya da postsinaptik zarda yer alan ve birkaç dakikadan birkaç haftaya kadar sürebilen geçici kimyasal veya fiziksel değişikliklerden veya her ikisinden kaynaklanabileceğini göstermiştir (12-13).

Uzun süreli bellek: Orta uzun süreli bellek ile uzun süreli bellek arasında kesin çizgiler yoktur. Aralarındaki fark, dereceleri açısındandır. Genel değerlendirmeye göre, uzun süreli bellek, daha çok yapısal değişikliklerin ürünüdür. Nöronların sinyal iletiminde eksitatör veya inhibitörlere yol açan sinapslardaki kimyasal değişiklikler yerine yapısal değişikliklerin sonucudur. Yapılan bazı çalışmalar uzun süreli belleklerin gelişmesi esnasında sinaps yapısında pek çok fiziksel değişikliğin yer aldığını göstermiştir. Uzun süreli belleğin gelişmesi, sinapsların sinyal iletimindeki duyarlılıklarını artıran fiziksel yeniden yapılanmaya bağlıdır. Bu fiziksel değişikliklerin birçok sonucu vardır, bazı fiziksel değişikliklere örnek olarak; nörotransmitter salgılanmasında vezikül boşaltma bölgelerinin sayısındaki artış, transmiter taşıyan veziküllerin sayısında artış, presinaptik uç sayısında artış ve dendritlerde yapısal değişiklik söylenebilir (10,14).

İçeriğine Göre Bellek

İçeriğine göre bellek tipleri denildiğinde aslında uzun süreli bellek tipleri akla gelir. Uzun süreli bellek klasik olarak deklaratif (semantik, epizodik, leksikal) ve nondeklaratif (refleksif, prosedürel, implicit) olarak ikiye ayrılır. Deklaratif bellek oluşan olayların ve gerçeklerin bilinçli olarak hatırlanması anlamına gelir. O yüzden bilinçli bellek de denir. Bazı kaynaklarda bildirime dayalı bellek olarak da isimlendirilmektedir. Uzun süreli bellek tipi esnek olup çoklu alanlar ve bilgi parçalarının ilişkisini içerir. Medial temporal lob ve hipokampüsle ilgilidir (10).

Deklaratif belleği, Endel Tulving (15) epizodik (olaylar ve kişisel deneyimlerle ilgili bellek) ve semantik (gerçekler için bellek tipi) olarak ikiye ayırmıştır; Squire (16) ise deklaratif belleği üçe ayırır: Semantik bellek (kavramlar), Epizodik bellek (olaylar) ve Leksikal bellek (kelimeler). Epizodik bellek bireysel olarak olaylar veya nerede, ne zaman, ne olduğunun bilinmesi için gerekli olan bir bellek tipidir. Epizodik bellek bireysel olarak deneyimlenen olayları otobiyografik olarak hatırlamaya yarar. Uzaysal (*spatial*) ve temporal bilgileri gerektirir (16).

Semantik bellek, kişisel olmayan enformasyon deposunu yansıtır. Semantik belleğin spatiotemporal ve otobiyografik özelliği yoktur. Epizodik ve semantik bellekten anatomik olarak beynin farklı sistemleri sorumludur. Epizodik ve semantik bellek fazları: kodlama (*encoding*), pekiştirme (*consolidation*), depolama (*storage*), geri çağırma (*retrieval*) şeklindedir. Yapılan çalışmalara göre epizodik bellek hasarı varsa semantik bilgi elde edilebilir. Fakat epizodik bellek, semantik bilgi olmadan ortaya çıkamaz. Bu yüzden semantik sistemin hasarı hem semantik hem epizodik belleği bozar. Ancak epizodik sistem semantik

sistem için gerekmez. Çalışan bellek (*working memory*) ise, deklaratif bilginin kodlanıp hatırlanmasını gerektiren kısa süreli bir bellektir (15,16).

Nondeklaratif bellek klasik koşullanma, beceri, ödüllendirme ve alışkanlıkları kapsar ve çoğunlukla bilinç dışıdır. Belli bir süre önce deneyimlenen aynı veya benzer bir uyaranın sonucu olarak, bir uyaranın tanımlanması ya da gruplandırılmasında değişim veya gelişim olarak tanımlanır. Deklaratif ve nondeklaratif bellek tipleri farklı şekillerde ve beynin farklı kısımlarında işleme tabi tutulsalar da, deklaratif bellek devamlı tekrarlamayla refleksif belleğe çevrilebileceği için, birbirleriyle ilişkilidirler (16).

BELLEK OLUŞUMUN HÜCRESEL MODELİ LTP

Farklı bellek tipleri söz konusu olsa da, tümünün sinapslarda aynı mekanizma ile oluştuğu düşünülmektedir. Öğrenmenin gerçekleşebilmesi için nöronlarda LTP'nin oluşması gerekmektedir. LTP ilk kez Bliss ve Lomo tarafından 1973 yılında tanımlanmıştır. Bellek sırasında sinapslarda meydana gelen değişimleri belirten ve açıklayan ve bugün en çok kabul gören model uzun süreli potansiyalizasyon (long term potentiation, LTP) modelidir (14).

LTP iki fazda gerçekleşmektedir; bunlar erken LTP (*early* LTP, E-LTP) ve geç LTP (*late* LTP, L-LTP)'dir**.** E-LTP, presinaptik nörondan postsinaptik nörona ya güçlü bir tetanik uyarının ya da daha zayıf çok sayıda uyarının ulaşması ile başlar. LTP fazının başlangıcı da normal sinaptik transmisyonun başlangıcı gibidir, presinaptik nörondan sinaptik boşluğa nöromediyatör salgılanması ile gerçeklesir. LTP mekanizmasında kullanılan nörotransmiter glutamattır**.** Glutamat, sinaptik boşluğa salındıktan sonra postsinaptik membrandaki iyonotropik reseptör olan NMDA (N-Metil-DAspartat) ve AMPA (Amino–3-hidroksi–5-metil–4-isoksazolpropiyonik asit) reseptörlerine bağlanır**.** İlk olarak glutamat ile AMPA reseptörü etkileşir ve hücre içine sodyum (Na^+) iyonunun, hücre dışına da potasyum (K^+) iyonunun akışı oluşur. Glutamat ile NMDA reseptörünün etkileşimi NMDA reseptörü üzerinde bulunan Mg^{2+} iyonu sebebiyle engellenmektedir, Mg^{2+} iyonunun varlığı NMDA reseptörü üzerinde iyon akışına engel oluşturmaktadır. NMDA reseptörünün açılabilmesi için, glutamat ile olan etkileşimine ek olarak Mg^{2+} iyonunun da iyon kanalından ayrılması gerekir. Glutamat ile etkileşen AMPA reseptörü aracılığı ile hücre içine Na^+ iyonu girer ve böylece membran potansiyelinin depolarizasyonu ile membranın hücre içi tarafı pozitif yüklenir, hücre içi pozitif yüklenmesiyle Mg^{2+} iyonunun iyon kanalından ayrılması gerçekleşir. Sonrasında kalsiyum (Ca^{2+}) iyonları ile Na^+ iyonları hücre içine, K^+ iyonları hücre dışına hareket ederler (18).

Kalsiyum, E-LTP oluşumunda ve devamlılığında rol oynayan birçok molekülün etkinliklerinin düzenlenmesinde oldukça önemlidir. Ca^{+2} hücre içine girince kalmodulin tarafından yakalanır ve oluşan bileşik kalsiyum-kalmodulin bağımlı protein kinaz (CaMKII) molekülünü aktive eder. CaMKII, postsinaptik membranında mevcut NMDA ve AMPA reseptörlerini fosforile eder ve etkinliklerini artırır. Presinaptik terminallerin stimülasyonuna bağlı olarak EPSP (eksitatör postsinaptik potansiyel)'lerin oluşumuna neden olur. Hücre içinde yoğunluğu artış gösteren kalsiyum, adenilat siklaz 1 ile etkileşime girer ve siklik adenozin monofosfat (cAMP) konsantrasyonunu artırır, protein kinaz A (PKA) aktifleşir. PKA, CaMKII molekülüne benzer etkiler oluşturur**.** CaMKII, nitrik oksit (NO) sentaz enzimini aktive eder ve NO sentezlenir. NO, postsinaptik bölgeden presinaptik bölgeye geçip burada guanilat siklazı aktive eder. Guanilat siklaz etkinliği sonucunda da siklik guanozinmonofosfat (cGMP) sentezlenir. cGMP sinaptik vezikül sekresyonunu artırır. E-LTP esnasında presinaptik uçlarda sinaptik vezikül sekresyonu artar**.** L-LTP fazı E-LTP fazından bazı farklılıklar ile ayrılır ki bunlar L-LTP'nin gen ekspresyonu ve protein sentezine bağlı olmalarıdır. L-LTP sırasında gen ekspresyonu düzenleyicileri kalsiyum-kalmodulin bağımlı protein kinaz (CaMKIV), PKA ve PKA'nın aktifleştirdiği mitojenle aktive edilen protein kinaz (MAPK) molekülleridir. Bu moleküllerin oluşumu ile oluşan esas transkripsiyon faktörü olarak, cAMP yanıt elementine bağlanan protein (cAMP-response element-binding protein, CREB) gösterilmektedir**.** Gen ekspresyonu ile gerçekleşen protein sentezi sonucunda sinaptik devrelerde uzun süreli değişimleri oluşturan moleküllerin sentezi gerçekleşir**.** LTP'nin oluşabilmesi için belirli eşik üzerinde beyin kökenli nörotrofik faktör (*brain derived neurotrophic factor,* BDNF) gerektiği ve fazla miktarda BDNF'nin, LTD'yi baskıladığı bulunmuştur (17-20).

GLUTAMAT

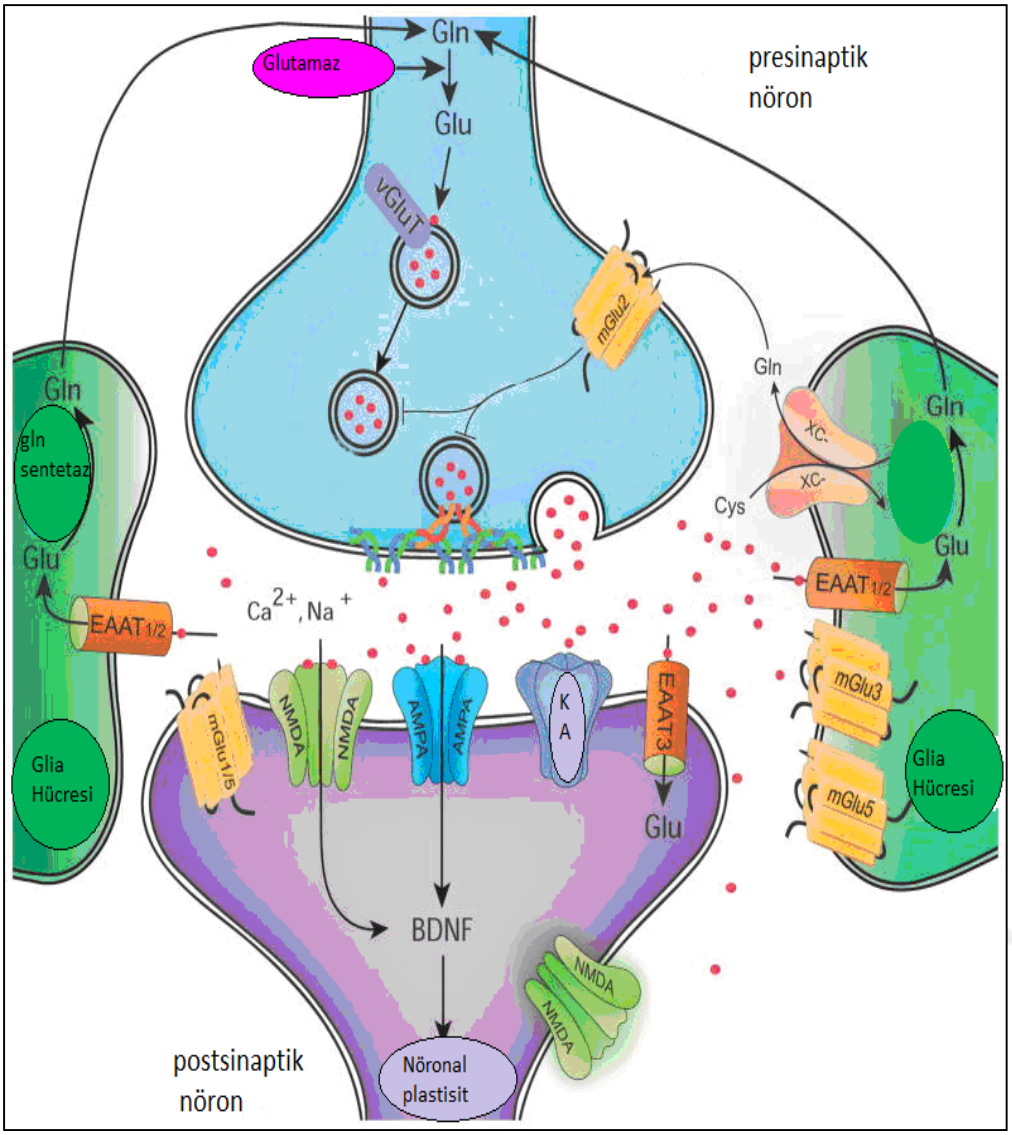
Glutamat memeli santral sinir sisteminde temel eksitatör nörotransmitterdir (21). Nörotransmiter olarak glutamatla ilişkili birçok nöron, beyinde serebral korteks, subkortikal alanlar ve diğer kortikal alanlarla birlikte anatomik yol oluşturur ve bu anatomik yolda piramidal nöronlar (CA1,CA3 vs.), somatik primer afferent nöronlar ve retinal ganglion nöronları gibi nöron tipleri mevcuttur. Glutamaterjik internöronlar serebral granül hücrelerini, hipokampustaki granül hücrelerini ve retinadaki iki kutuplu hücreleri içerir. Bellek oluşumunda önemli rol oynayan glutamaterjik nöronlar, hipokampusta bol miktarda bulunur.

Glutamaterjik nöronların sinapsları çoğunlukla hedef nöronların dendritik alanlarında oluşur. Tek bir postsinaptik nöron birçok değişik glutamaterjik nöronlarla binlerce sinaptik

bağlantı yapabilir. Her bir sinapsta oluşan eksitatör postsinaptik potansiyel (EPSP) ve depolarizasyon, hücre gövdesi üzerinde dendrite doğrudur. Hücrede aksiyon potansiyeli depolarizasyon voltaj-kapılı Na^+ kanallarını aktive edecek kadar yüksekse akson aktivasyon başlar. Aksiyon potansiyelleri her nöronda akson üzerinde başlamaz, bazılarında aksiyon potansiyelleri nöronun dendritlerde başlar ve hücre gövdesinde membran depolarizasyonunun geçişini kolaylaştırır. Beyinde oluşan sinapsların büyük bir çoğunluğu glutamaterjiktir, fazla sayıdaki glutamaterjik sinaptik bağlantıları, postsinaptik nörondaki eksitatör etki sağlar (22).

Glutamatın Sentezi ve Düzenlenmesi

Glutamat, sinaptik terminalleri içeren nöronal yapılardaki glukozdan sentezlenir. Glukozdan sentezlenmesi glutamatın enerji metabolizmasında rol aldığını gösterir. Ayrıca mitokondride ATP oluşumuna aracılık eder. Nörotransmiter veziküllerinin oluşumunda kullanılan biyokimyasallar astroitlerden salgılanan ve yine glutamaterjik sinaptik bölgeye alınan ve glutamata dönüşen glutamat öncülerinin oluşumunu içerir. Alfa-ketoglutarat (bir TCA siklusu ara ürünü) ve malat da bu amaçla kullanılır. Glutamat ve gaba-aminobütirik asitin (GABA) nörotransmiter fonksiyonları ile bazı kimyasal olaylar ilişkilidir. Presinaptik terminallerden salgılanan glutamat ve GABA moleküllerinin çoğu astrositler içerisine taşınır, burada glutamine dönüştürülür ve trikarboksilik asit siklusuna sokulur ve sonra tekrar glutamat ve GABA'ya dönüştürülmek ve salgılanmak üzere sinir terminallerine taşınır. Glutamatın transmiter havuzu sinaptik veziküllerde depolanan moleküller olarak bilinir. Glutamat, veziküler taşıyıcılar VGLUT (1,2,3) ile vezikül içinde granüler halde ve yoğun bir şekilde bulunur. Glutamat veziküller içerisinde, glutamata spesifik ATP bağımlı bir taşıyıcı ile tutulur ve sadece glutamaterjik uçlarda veziküllerin membranında bulunur. Glutamata spesifik ATP bağımlı taşıyıcılar vezikül membranına iletilir ve sitoplazma düzeyinde daha çok oranda glutamatı yoğunlaştırır. Sodyum iyon (Na^+) -bağımlı taşıyıcılar glutamatın transmiter fonksiyonunun düzenlenmesinde rol alırlar. Glutamat spesifik taşıyıcıları nöronların hücre membranında ve glutamaterjik sinaptik terminallerin yakınındaki astrositlerde yoğundurlar. Glutamat taşıyıcıları VGLUT1, EEAT-1 (GLAST), EEAT-2 (GLT-1), EAAT-3 (EAAC-1), EAAT-4 ve EAAT-5'tir. Bu taşıyıcılar nörotransmiterde farklı lokalizasyonda ve farklı işlevlerde görev alırlar. Sinapstik alanda düşük ekstraselüler konsantrasyonda bulunarak nörotransmiter inaktivasyonuna yardımcı olurlar. Bu konuda taşıyıcılar genellikle alım inhibisyonu olarak fonksiyon göstermelerine rağmen aynı zamanda membran depolarizasyonu sırasında dışarı salıverme işlevi de gösterebilirler. Glutamat ayrıca amonyağın detoksifikasyonunda da rol alır (22).



Şekil 1. Glutamatın sentez, salıverilme, sinaptik aralıktan uzaklaştırılması ve reseptör taşıyıcılarının (22 lokalizasyonu uyarlanmıştır).

Glutamat Reseptörlerinin Sınıflandırılması

Glutamat reseptörleri beyin ve omurilikte nöron membranında sinaptik ve non-sinaptik alanlarda bulunur. Bazı glutamat reseptörleri ayrıca astrosit ve oligodendrositlerin membranında da bulunur. Glutamat reseptörleri aspartat ile de aktive olur; bu yüzden glutamat reseptörlerine eksitatör amino asid (EAA) reseptörleri de denir. Glutamat reseptörleri temelde iki ana sınıfa ayrılır. Bunlar iyonotropik reseptörler ve metabotropik reseptörler şeklindedir (22,23).

İyonotropik glutamat reseptörler (iGluR) katyonlara seçici olarak geçirgen iyon kanalları içerirler. Metabotropik reseptörler ise G-protein ile kenetli reseptörler (GPCR) süper

ailesinin üyesidir. İyonotropik glutamat reseptörler kendi içinde üç alt-tipe ayrılır. Bu ayrım farmakolojik yapılarından kaynaklanır (22,23).

1) NMDA (N-metil-D-aspartat)
2) AMPA (alfa-amino-3-hidroksi-5-metilisoksazol-4-propiyonik asit)
3) KA (kainat, kainik asit)

AMPA ve kainat reseptörleri bazı kaynaklarda non-NMDA reseptörleri şeklinde adlandırılmaktadır. Metabotropik glutamat reseptörler (mGlu) 3 alt gruba ayrılmaktadır (24-26).

1) Grup I ($mGlu_1$ ve $mGlu_5$)
2) Grup II ($mGlu_2$ ve $mGlu_3$)
3) Grup III ($mGlu_4$, $mGlu_6$, $mGlu_7$ ve $mGlu_8$)

İyonotropik Glutamat Reseptörleri

NMDA reseptörleri: Glutamat reseptörleri arasında en çok incelenen reseptördür. Beyin korteksi, hipokampus, striatum, septum ve amigdalada yoğun miktarda bulunur. Nöronal olarak incelendiğinde NMDA reseptörleri nöronlarda postsinaptik yerleşmiştir (21). NMDA reseptörleri fensiklidin (PCP) ve ketamin ile bloke olur (27). NMDA reseptörleri üç farklı alt birimden oluşan ligand-geçişli iyon kanalıdır. NMDAR1, NMDAR2, NMDAR3 alt birimleridir. NMDAR1, beyinde gelişimsel ve bölgesel olarak ekspre edilen sekiz bağlantı varyantına sahiptir. NMDAR2 alt üniteleri beyinde heterojen dağılmıştır. NMDAR3 alt ünitesi yetişkin beyninde özellikle oksipital ve entorinal korteksler, talamus ve serebellumda dağılım gösterir. NR1'in fonksiyonel NMDA reseptörünün çekirdek alt ünitesidir, NR2 ve NR3'ün ise reseptör düzenleyicidir. NR1 ve NR2 proteinleri transmembran proteinleridir. Her bir proteinin amino terminal bölgesi ekstraselülerdir ve ligand-bağlanma bölgeleri ile multipl glikasyon alanları içerir. Karboksil bölgesi intraselülerdir ve reseptörlerin düzenlenmesini kontrol eder (23).

NMDA reseptörü, dinlenme potansiyelinde Mg^{2+} ile bloke haldedir. Reseptördeki iyonik akımlar sadece nöronal membran kısmı depolarize olduğunda oluşur. Reseptörün aktivasyonunda ekstraselüler Ca^{2+} hücre içine girer. NMDA reseptörleri ile nörotransmisyon yavaş meydana gelir ve uzun sürede sonlanır. Bu özellikleri nedeniyle NMDA reseptörleri sinaps gelişimi ve plastisitede, LTP ve LTD mekanizmasında etkilidir (22,23,26).

AMPA reseptörleri: İyonotropik glutamat reseptörleri arasında NMDA grubu ve AMPA/KA grubu şeklinde bir ilişki söz konusu olsa da son yıllardaki çalışmalar AMPA ve

KA reseptörlerinin birbirinden farklı olduğunu göstermiştir. Aynı değerlendirilmelerinin nedeni ise aynı agonistlerle aktive olmalarıdır. Farklılıklarını kanıtlayan ise kodlandıkları gen farklılıklarıdır. AMPA reseptörünü kodlayan dört gen çeşitli bulunur ve Glu1-Glu4 ya da GluRA-GluRD arasında isimlendirilmesi söz konusudur. KA reseptörlerini 5 farklı gen kodlamaktadır. AMPA reseptörler alt üniteleri dört hidrofobik membran ilişkili alana sahiptir, bunlar M1, M2, M3, M4 şeklindedir. M1, M3 ve M4 membrana yayılırken M2 alanı iyon kanalının girişini oluşturan düğüm yapar. Hem N -terminal alanı hem de M3 ve M4 alanları arasındaki düğüm ekstraselülerdir ve glikozilasyon zincirleridir. Bu iki alan reseptörün agonist bağlanma bölgesini oluşturur ve allosterik modülatörler M3-M4 düğümündeki bir alanda rol alırlar. C- terminal alanı intraselülerdir ve birçok proteinle karşılıklı etkileşir. Bu proteinler glutamat reseptör etkileyici protein (GRIP), C-kinazla etkileşen protein (PICK-1), AMPA reseptör bağlayıcı protein (ABP), sinaps ilişkili protein-97 (SAP-97) ve stargazin'dır. AMPA alt reseptörleri 'flip' ve 'flop' formlarındadır. Embriyonik fazdaki beyinde ağırlıklı olarak flip formu eksprese edilirler ve aşamalı olarak yetişkin beyninde dominant olan flop formuna geçerler. AMPA reseptör kanalları Na^{+} ve K^{+}'a geçirgendir fakat GluR2 alt ünitesinin yokluğunda Ca^{+2} geçişine de izin verebilir. AMPA reseptörlerinin etkileşmesi için glutamat, allosterik ve intra-iyon kanal bağlanma bölgeleri vardır. GluR1 alt birimi CAMKII, PKC ve PKA tarafından fosforile edilir. Dopaminin D1 reseptör aktivasyonu ile GluR1 alt birimini fosforile ederek veya PKA ile protein fosfataz 1 aktivasyonunu ve sonraki dopamin ve siklik adenozin monofosfat ile düzenlenen fosfoprotein 32-kDa (DARPP-32) aktivasyonunu inhibe ederek AMPA akımlarını güçlendirir. AMPA reseptör alt tipi GluR1 NMDA ile birlikte LTP mekanizmasıyla ilişkilidir ve GluR1'in PKA fosforilasyon alanındaki defosforilasyonu LTP de rol alır. GluR2 alt tipinin PKC tarafından fosforilasyonu, AMPA reseptör sinaptik alanında bozulma ve serebellumda LTD'nin indüksiyonu ile ilişkilendirilmiştir. GluR2'nin oligonükleotidlerle inhibisyonu hipokampal nöronlarda hücre ölümünü indüklemektedir (22,28-32).

KA reseptörleri (kainat): Kainat reseptörlerinin beş alt ünitesi vardır: KA1, KA2, GluR5, GluR6, GluR7. KA reseptörleri hipokampal nöronlarda hızlı glutamerjik transmisyona sebep olurlar. Postsinaptik fonksiyonludurlar, fakat hipokampus içerisindeki CA3 piramidal nöronlardaki *mossy* lif terminallerde de presinaptik olarak rol aldıkları gösterilmiştir. Presinaptik KA reseptörleri aktivasyonlarının transmitter salgılanması iki yönlüdür, zayıf aktivasyon glutamat salgılanmasını artırırken güçlü aktivasyon GluR6 ile inhibisyona neden olur. Presinaptik KA reseptörleri mossy lif CA3 sinapslarda kısa süreli plastisiteye katılır ve

bu LTD ve LTP ‘nin indüklenmesini sağlar. Uzun süreli plastisitenin bu formları mossy lif terminallerindeki Ca^{2+} birikmesine bağlıdır. Böylece KA reseptörleri ile transmiter salgılanmasının iki yönlü ve aktivasyon bağımlı düzenlenmesi epileptogenezise katkı sağlar ayrıca hipokampusta bellek gibi önemli fizyolojik olaylarda rol alır (22,33,34).

Metabotropik Glutamat Reseptörleri

Metabotropik reseptörler iyonotropik reseptörlere göre daha az çalışılmış ve bilgi sahibi olunmuş reseptörlerdir. Metabotropik reseptörlerin keşfi ve bu reseptörlerle ilgili ilk çalışmalar 1990'lı yılların başında gerçekleşmiştir. Metabotropik reseptörlerle yapılan çalışmalar ağırlıklı olarak bellek ve öğrenme üzerine olmuştur. Metabotropik reseptörlerin anatomik olarak talamus ve korteks bölgelerinde bol miktarda bulunduğu görülmektedir. Üç ana alt gruba ayrılırlar ve tamamı yedi transmembran alanından oluşan GPCR (*G-protein coupled receptors*) süper ailesine aittirler. Metabotropik reseptörlerin üç grubu primer yapı olarak yakın ilişkilidir ve aminoasit dizilişine, bağlantılı sinyal transdüksiyonu mekanizmasına, agonist duyarlılığına göre Grup I, Grup II, Grup III olarak adlandırılırlar (35,36).

Grup I reseptörleri (mGlu1, mGlu5) Gq aracılığıyla inozitol-1,4,5-trifosfat-Ca^{2+} ile kenetlidir. Grup II (mGlu2, mGlu3) reseptörleri beyinde frontal korteks, hipokampüs, amigdala bölgelerinde sıklıkla görülür ve Gi aracılığıyla adenilat siklaz inhibisyonuna neden olur. Grup III (mGlu4, mGlu6, mGlu7, mGlu8) reseptörleri Gi ile eşleşerek adenilat siklazın inhibisyonuna neden olur. MGluR gen ailesinin reseptörlerin N-terminal geniş ekstra sellüler alanının glutamat bağlama bölgeleri içerdiği ve C-terminal alanının da mGluR’ların transdüksiyon mekanizmasını düzenleyen agonistlerin etkisini saptamada rol oynadığı bilinmektedir (35-37).

Grup I metabotropik glutamat reseptörleri postsinaptik olarak lokalizedirler ve burada iGluR kanallarındaki akımları düzenlerler. Farklı olarak, grup II ve grup III metabotropik glutamat reseptörleri, glutamat salıverilişinin düzenlenmesine katılan presinaptik reseptör olarak fonksiyon görmektedirler. Metabotropik glutamat reseptörlerinin sinaptik dağılımı ve fonksiyonel özellikleri, C-terminal alanı ile değişik proteinlerin karşılıklı etkileşimleri ile düzenlenmektedir. Grup I metabotropik glutamat reseptörler, Homer proteinleri (1a-c,2a ve 2b,3), kalmodulin (CaM) ve siah-1A’yı içeren yapı proteinleri ile etkileşmektedir. Homerler grup I metabotropik glutamat reseptörleri ve IP3 reseptörlerinin C bölgelerinde prolinden zengin alanlarla etkileşen EVH alanları içerirler. Grup II metabotropik glutamat reseptörlerin C bölgeleri ile etkileşen bir protein keşfedilmemiştir. Bununla birlikte grup I metabotropik

glutamat reseptörlerle etkileşenlere benzer birçok protein (örneğin PKC, CaM ve PICK1 ile etkileşen G proteini βγ alt birimler), grup III metabotropik glutamat reseptörleri ile de etkileşir. Metabotropik glutamat reseptörler agonistleri yavaş membran depolarizasyonunda yer alan birçok nöronun hızının artışını indüklerler. Bu görevin K^+ kanallarının inhibitör etkilerine bağlı olduğu düşünülmektedir. Doğrudan eksitatör postsinaptik etkileri söz konusudur ve metabotropik glutamat reseptörlerin aktivasyonu, özellikle mGluR7 aracılığıyla, presinaptik mekanizmalarla sinapslarda hem eksitatör hem de inhibitör transmisyona neden olmaktadır. Böylece presinaptik aktiviteyi etkilediği gösterilmiştir (40-42). Metabotropik glutamat reseptörleri öğrenme ve bellekte görev alan sinaptik plastisiteye katılmaktadır. Grup I metabotropik glutamat reseptörlerinin işlevini kaybetmesi uzaysal ve motor öğrenmenin kazanılması ve bilginin uzun süre saklanması becerisinde kayıplara sebep olur. Grup II ve III metabotropik glutamat reseptörlerle ilgili yapılan çalışmalar, öğrenme ve bellekte bozulma göstermemiştir; grup II/III reseptörlerinin optik fonksiyonlar ve artmış epileptogenezis ile ilişkili olduğunu görülmüştür. İlave olarak grup II/III reseptör agonistleri nöroprotektif etki göstermektedir (43,44).

LY354740 ilk tanımlanan Grup II metabotropik glutamat reseptör agonistidir ve nanomolar düzeyde affinite gösterir (25). Grup II/III metabotropik glutamat reseptörlerin antagonisti LY341495 psikoza yol açmaktadır. LY341495 anksiyete ve depresyon çalışmalarında da incelenmiştir (38,39).

Glutamat ile İlişkili Hastalıklar

Glutamaterjik sistemin disregülasyonu ve disfonksiyonu birçok nörolojik ve psikiyatrik bozukluğun patofizyolojisine sebep olmaktadır. Yapılan çalışmalar glutamatın nörotoksisite ve nörodejenerasyon üzerine etkilerini göstermiştir. Genel bir ifadeyle epilepsi, status epileptikus, Parkinson hastalığı, bilişsel bozukluklar, demans, migren, amyotrofik lateral skleroz (ALS), Huntington koresi, kronik ağrı, inme, travmatik ve spinal kord yaralanmaları, ensefalopatiler, anksiyete bozukluğu, travma sonrası stres bozukluğu, depresyon, bipolar bozukluk, uyku bozuklukları, madde kötüye kullanımı, şizofreni ve diğer psikotik bozukluklar glutamat ile ilişkilidir (45-51).

İskemi ve hipoksiye bağlı nörodejenerasyonun metabolik sonucu laktik asit birikimi, pH'ta düşme ve ATP azalması söz konusu olur. Bu durum Na^+/K^+ kapısını etkiler. Hücre membranı depolarizasyonuna neden olur. Ca^{2+} kanalları aktive olur ve aşırı glutamat salıverilmesi gerçekleşir. NMDA ve AMPA reseptörlerinin aşırı aktive olur. İntraselüler Ca^{2+}

birikimi artar ve nöronal hücre hasarı, disfonksiyonu ve ölümle sonuçlanan olaylar gerçekleşir (46,47).

ALS hastalığı bir motor nöron hastalığıdır. Bir ALS fare modelinde, presemptomatik evrede sinaptik GluR1'de artış, sinaptik ve total GluR2'de ve total CB1 kannabinoid reseptörü düzeyinde bir azalma olduğu saptanmıştır. GluR1'deki artışın kalsiyum-geçirgen AMPA reseptörler sayısında artışa yol açabileceği ve bunun da nöronal ölüme katkıda bulunabileceği öne sürülmüştür (48). Bazı hayvan deneylerinde glutamat agonist enjeksiyonlarında nöbet veya epilepsi benzeri aktivite oluştuğu gözlemlenmiştir. Bununla beraber glutamat antagonisti enjeksiyonlarıyla da epileptik nöbetlerin azaldığı kaydedilmiştir. Çalışmaların ayrıntılarına bakıldığında epileptik nöbet anında glutamat ve aspartat salgılanmasının arttığı belirtilmiştir (49).

Madde kötüye kullanımı çalışmalarında, etanolün akut etkilerinden birinin glutamat reseptör fonksiyonunun inhibisyonu olduğu kanıtlanmıştır. Sonuç olarak bilişsel defisitler oluşur ve etanol düşük konsantrasyonda hipokampusta LTP'yi inhibe eder (50). Alzheimer hastalığında da glutamat önemli bir yere sahiptir. Glutamatın aşırı salgılanmasına bağlı olarak oluşan nörotoksisite hipokampüs alanındaki nöronal kayıplarla bilişsel kayıplara ve ileri dönemde de nöronal ölümlere yol açmaktadır. Günümüzde Alzheimer hastalığının etkili bir tedavi seçeneği olarak NMDA reseptör antagonisti memantin kullanılmaktadır (51).

MATERYAL VE METOT

Bu çalışma Trakya Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından 16.02.2011 tarih ve 02 no.lu oturumda 2011/02.02 karar no.su ile onaylanmıştır (Ek-1). İyi Laboratuvar Uygulamaları Kılavuzu ve Hayvan Etiği Evrensel İlkelerine uygun olarak gerçekleştirilen bu çalışma Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından (TÜBAP-2011/97) kayıt numarası ile desteklenmiştir.

Çalışmada, Trakya Üniversitesi Deney Hayvanları Biriminden temin edilen, 19-31 g arası ağırlıktaki, 8 haftalık erkek balb/c fareler kullanıldı. Her birinde on ikişer fare bulunan gruplarda hayvanlar, 7 gün süreyle günde 4 deneme ile Morris Su Labirentinde saklı platformu bulma konusunda eğitildi ve bu testlerdeki performanslarına dayanarak bellek fonksiyonları değerlendirildi. Eğitimlerin tamamlanmasından sonra 8. günde saklı platform çıkarılarak, fareler 1 dakika yüzdürüldü ve platformu arama çabaları kaydedildi. Testlerin yapıldığı süre boyunca, farelere özel bir barındırma koşulu uygulanmadı, yiyecek ve içecek kısıtlaması yapılmadı.

Çalışma grupları şu şekilde oluşturuldu:

Grup A: Kontrol, serum fizyolojik, 8 gün

Grup B: LY379268 0.3 mg/kg, 8 gün

Grup C: LY379268 1.0 mg/kg, 8 gün

Grup D: LY379268 3.0 mg/kg, 8 gün

Grup E: LY341495 0.3 mg/kg, 8 gün

Grup F: LY341495 1.0 mg/kg, 8 gün

Grup G:LY341495 3.0 mg/kg, 8 gün

Grup H: 7 gün serum fizyolojik, 8. gün LY379268 3 mg/kg

Grup I: 7 gün serum fizyolojik, 8. gün LY341495 3 mg/kg

MORRIS SU LABİRENTİ

1,2 metre çapında ve 43 cm derinliğinde daire şeklinde (Şekil 2) bir su tankı içinde suyun yüzeyinin 2 cm altında yer alan bir platformdan ibarettir. Farelerin 4 farklı lokalizasyondan suya bırakılmalarını takiben 1 dakika içinde platformu bulmaları beklendi. Platformu bulduktan sonra platform üzerinde 15 saniye kalmalarına izin verildi ve daha sonra su tankından alınıp, kurulanarak kafeslerine konuldu. Bir dakika içinde platformu bulamayan farelere yardım edilerek platformu bulmaları sağlandı ve 15 saniye platform üzerinde bırakıldı. Su tankının bulunduğu odanın duvarlarında deneyler boyunca sabit olan çevresel ipuçları asılı idi ve farelerin bu ipuçlarına bakarak platformu bulmaları beklendi (52).

Su tankı üzerine yerleştirilmiş bir kamera aracılığı ile farelerin yüzme traseleri bilgisayara kaydedildi. Bu amaç için üretilmiş bir yazılımda (Ethovision XT, 7.0, Noldus, Hollanda), görüntüdeki fare işaretlendi ve tüm deney boyunca yüzdüğü mesafe izlendi, bilgiler yazılıma aktarıldı ve yazılım yüzülen mesafeyi ve süreyi hesapladı. Platforma erişme süresi ve platforma erişene kadar kat edilen mesafe, platforma ortalama uzaklık, yüzme hızı, havuzun duvarlarına yakın bölgede yüzme ölçülen parametrelerdi. Platforma daha çabuk ulaşma veya daha kısa mesafe yüzerek platformu bulma, platformun yerinin öğrenildiğinin göstergesidir. Öğrenme fazı (*acquisition phase)* sırasında her gün yapılan denemelerde elde edilen skorların toplanması da genel bir bellek parametresi olarak kullanılır. Öğrenme eğitimlerinden sonra, platform çıkarılarak gerçekleştirilen testte (*probe* test), farelerin hedef kadrana ulaşma süreleri, hedef kadranda geçirdikleri süre, yüzme hızları vb. parametreler kaydedildi.



Şekil 2. Morris su labirenti.

İmmunohistokimya

Morris su labirentinde gerçekleştirilen testlerin tamamlanmasından sonra anestezi altında dekapitasyon uygulandı ve farelerin beyin dokuları CREB ve fosfo-CREB miktarlarının belirlenmesi için alındı. Hipokampüsten alınan örneklerde immunohistokimya ile CREB ve fosfo-CREB miktarları saptandı. Anti-CREB (Millipore Anti-CREB, clone E306, Antibody) ve anti-fosfo-CREB (Millipore Anti-phospho-CREB (Ser133) Antibody) immunohistokimyasal değerlendirmeleri için örnek dokular bir gece 56°C etüvde bekletildi. Dokular Toluol I ve Toluol II'de 20'şer dakika bekletildi, düşen alkol seviyelerinden (alkol 100-90-80-70) 10'ar dakika geçirildi ve ardından dokular distile suda bekletildi. Antijen kazanımları için dokular mikrodalgaya dayanıklı şalelere konuldu ve üstünü kapatacak kadar sitrik asit eklendi. Sitrik asit 1,05 gr ve distile 500 ml karıştırıldı (pH: 6) ve 20 dakika kaynatıldı. Dokular tris tampon solüsyonu (TBS) 1X ile 3 defa 5'er dakika yıkandı. Dokular %3'lük H_2O_2'ye alındı (12 ml %30'luk H_2O_2, 54 ml Metanol, 54 ml distile su). Dokular sonra TBS-T'ye alındı. Preparat kurulanıp, doku kurutulmadan pub-penle sınırları çekildi. Geri TBS-T'ye konuldu. Normal Goat Serum (NGS) hazırlandı. 50 µl NGS + 950 µl TBS-T

(%5'lik NGS). Primer antikorlar hazırlandı. Anti Creb = 1/400, Anti-fosfo Creb= 1/1000. Dokulara primer antikorlar damlatıldı ve oda ısısında 2 saat nemli çemberde bekletildi. Dokular TBS ile 3 defa 5'er dakika yıkandı ve TBS-T'ye alındı. Sekonder antikor =1/400 oranında; *biotinylated* antirabbit 3 µl /1200 TBS hazırlandı. Preparatlara sekonder antikorlar eklendi, 30 dakika nemli çemberde oda ısısında bekletildi. ABC (*Avidin-biotin* kompleks) hazırlandı (2,5 ml TBS + 1 damla A + 1 damla B karışımı). ABC kit, doku kurutulmadan aspire edilen preperatlara eklendi ve nemli çemberde 30 dakika bekletildi. Dokular yine TBS ile 3 defa 5'er dakika yıkandı ve TBS-T'ye alındı. Dokulara DAB eklendi (DAB=2,5 ml DS + 1 damla buffer + 1 damla H_2O_2 + 2 damla DAB karıştırıldı). DAB eklenerek kromojenize edilen dokular, reaksiyonu durdurmak için TBS-T'ye alındı. Çeşme suyunda 5 dakika yıkandı. Dokulara 40 saniye boyunca hematoksilen ile zıt boyama yapıldı. Ardından çeşme suyunda yıkandı. Kesitlerin 150 µl amonyum hidroksit (NH_4OH) olan suya alınıp hemen batırılıp çıkarılması ile çeşme suyunda 5 dakika bekletildi. Kesitler alkol 100-90-80-70 ve Toluol I-II serilerinden geçirilerek kapatıldı.

Yapılan tüm immuhistokimyasal işlemlerin sonuçları; histolojik skorlama (HSCORE) yöntemi ile değerlendirildi. Değerlendirmeler; preparatların hangi grup hayvana ait olduğunu bilmeyen ve bilen birer değerlendirici tarafından, her preparatta rastgele seçilen beş alanda yapıldı. Skorlama, kesitlerde immünreaktivite gösteren hücrelerin yüzdesi ve boyanma derecesinin (I x PC; I: boyanma derecesi, PC: her derecede boyanan hücrelerin yüzdesi) ölçüt olarak alındığı, semikantitatif bir yöntemle gerçekleştirildi. Boyanma derecesi: 0 (boyanma yok), 1 (zayıf boyanma), 2 (orta boyanma), 3 (güçlü boyanma) olarak belirlendi.

İlaçlar

İlaçlar serum fizyolojik içinde çözündürüldü. LY 379268 subkutan yolla ve LY 341495 intraperitoneal yolla (0.3 mg/kg, 1 mg/kg ve 3 mg/kg) dozlarında her gün ilk yüzdürme deneyinden yarım saat önce, 10 gram vücut ağırlığı başına 0.1 ml hacimde verildi. İlaç verilmeyen kontrol grubuna sadece serum fizyolojik enjeksiyonu yapıldı.

İstatistiksel Analiz

Elde edilen verilerin değerlendirilmesinde çift-yönlü tekrarlanan ölçümler varyans analizi ve tek-yönlü varyans analizi (ANOVA) yöntemleri kullanıldı, *post hoc* analizler *Bonferroni* testi ile gerçekleştirildi; p değeri <0,05 olarak kabul edildi.

BULGULAR

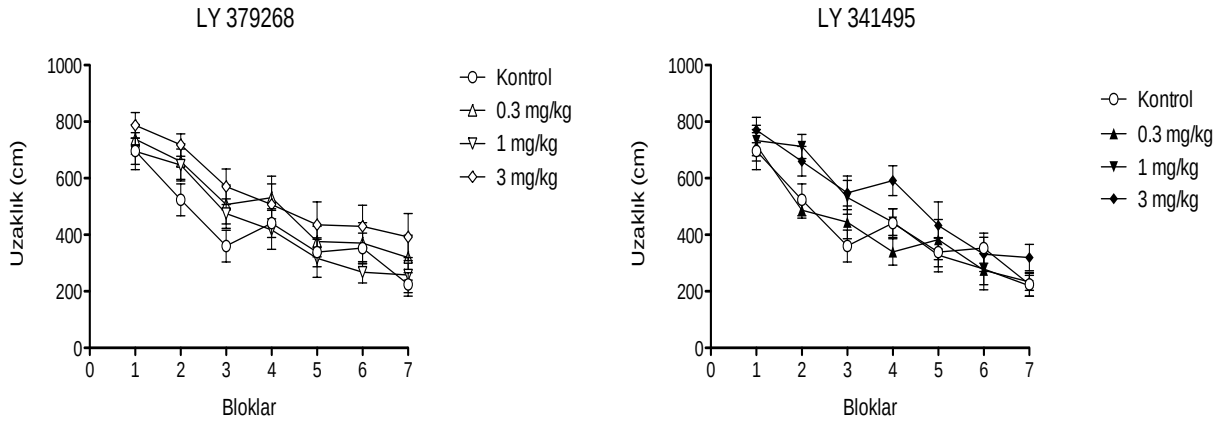
Morris su labirentindeki testler iki başlık altında ele alınabilir. Fareler, ilk 7 gün boyunca havuz içinde saklı platformun yerini bulabilmeleri için günde 4 kez eğitildiler. Bu deneylerin gerçekleştirildiği ilk faza öğrenme fazı (*acquisition)* adı verilir. Bu şekilde eğitilmiş fareler, yedinci gündeki son eğitim yüzdürmelerinden 24 saat sonra, platform havuzdan çıkarılarak, tekrar havuza bırakıldılar ve sadece bir kez 60 saniye süreyle yüzdürüldüler (*probe* test). Bu ikinci fazdaki deneyler, kalıcı belleğin test edilmesini sağlamaktadır; bu deneyde, farelerin platformun uzaysal lokalizasyonu konusunda bir uzun süreli bellek geliştirip geliştirmediğini göstermektedir.

1. ÖĞRENME FAZI DENEYLERİNDE ELDE EDİLEN BULGULAR

Fareler 7 gün art arda günde 4 kez yüzdürülerek saklı platformun yerini bulma konusunda eğitildiler. Bu eğitimler süresince, farelerin platformun yerini öğrenip öğrenmediklerini değerlendirmek için bazı parametreler incelendi. Aşağıda bu parametrelere göre farelerin öğrenme performansları değerlendirilmektedir.

a) Platforma Ulaşana Kadar Yüzülen Uzaklık

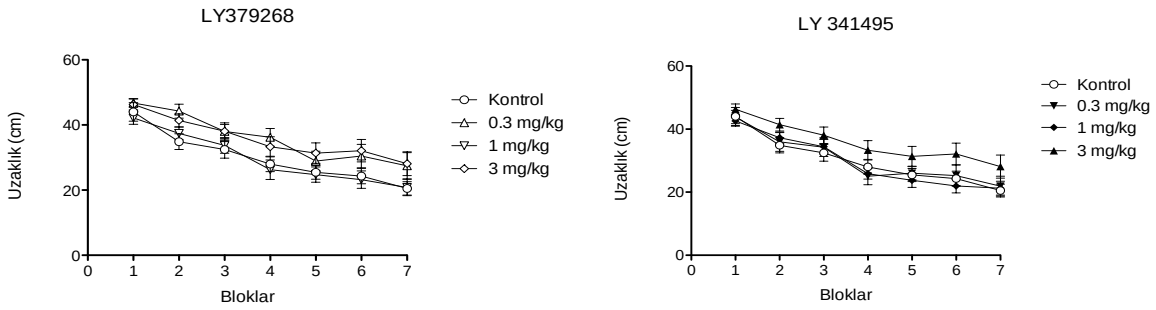
Platforma ulaşana kadar yüzülen uzaklık, farelerin platformu arayışlarının bir ölçüsüdür ve platformun yeri öğrenildikçe azalmaktadır. Şekil 3'te görüldüğü gibi, kontrol grubu farelerin platforma erişene kadar yüzdükleri uzaklık giderek azalmaktadır ve bu grafik farelerin öğrenme eğrisini ortaya koymaktadır. Üç farklı dozda (her iki ilaç için, 0,3 mg/kg, 1 mg/kg ve 3 mg/kg) LY 379268 veya LY 341495 verilen farelerde öğrenme eğrilerinde, herhangi bir blokta istatistiksel anlamlı bir değişiklik görülmemektedir. Yani, LY 379268 ve LY 341495 Morris su labirentinde farelerin uzaysal öğrenmeleri üzerinde olumlu veya olumsuz bir etki göstermemektedir.



Şekil 3. Farelerin platforma ulaşana kadar yüzdükleri uzaklık. Her bir blok, deneyin yapıldığı gündeki 4 yüzdürme eğitiminin ortalamasını göstermektedir. Dikey çubuklar standart hatayı göstermektedir.

b) Platforma Ortalama Uzaklık

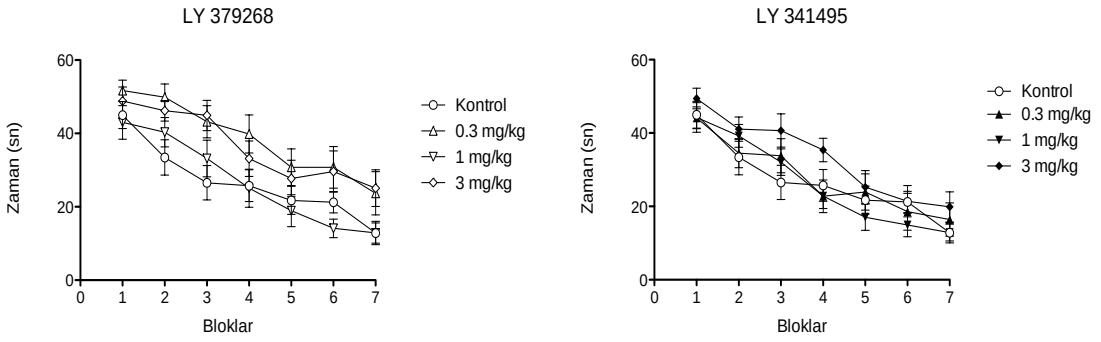
Platforma ortalama uzaklık, yüzme eğitimleri sırasında farelerin platforma uzaklığının ortalama ölçüsüdür ve platformun yeri öğrenildikçe azalmaktadır. Şekil 4'te görüldüğü gibi, kontrol grubu farelerin platforma ortalama uzaklık eğitim bloklarında giderek azalmaktadır ve bu grafik farelerin öğrenme eğrisini ortaya koymaktadır. LY 379268 veya LY 341495 verilen farelerde öğrenme eğrilerinde, herhangi bir blokta istatistiksel anlamlı bir değişiklik görülmemektedir. 3 mg/kg dozunda LY 341495 verilen farelerin daha geç öğrendiklerin düşündüren bir öğrenme eğrisi elde edilmekle birlikte, hiçbir blokta bu değerler istatistiksel anlamlı bir farklılığa erişemedi. Sonuç olarak, bu parametre yönünden, LY 379268 ve LY 341495 Morris su labirentinde farelerin uzaysal öğrenmeleri üzerinde olumlu veya olumsuz bir etki göstermemektedir.



Şekil 4. Farelerin platforma ortalama uzaklıkları. Her bir blok, deneyin yapıldığı gündeki 4 yüzdürme eğitiminin ortalamasını göstermektedir. Dikey çubuklar standart hatayı göstermektedir.

c) Platforma Erişme Süresi

Platforma erişme süresi platformun yeri öğrenildikçe kısalmaktadır. Şekil 5'da görüldüğü gibi, kontrol grubu farelerin platforma erişme süreleri eğitim bloklarında giderek azalmaktadır ve bu grafik farelerin öğrenme eğrisini ortaya koymaktadır. LY 379268 veya LY 341495 verilen farelerde öğrenme eğrilerinde, herhangi bir blokta istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik görülmemektedir. 0.3 mg/kg ve 3 mg/kg dozunda LY 379268 verilen farelerin platforma erişme süreleri genel olarak daha uzun olmakla birlikte, hiçbir blokta bu farklılıklar istatistiksel anlamlı değildi. Sonuç olarak, platforma erişme süresi yönünden, LY 379268 ve LY 341495 Morris su labirentinde farelerin uzaysal öğrenmeleri üzerinde olumlu veya olumsuz bir etki göstermemektedir.

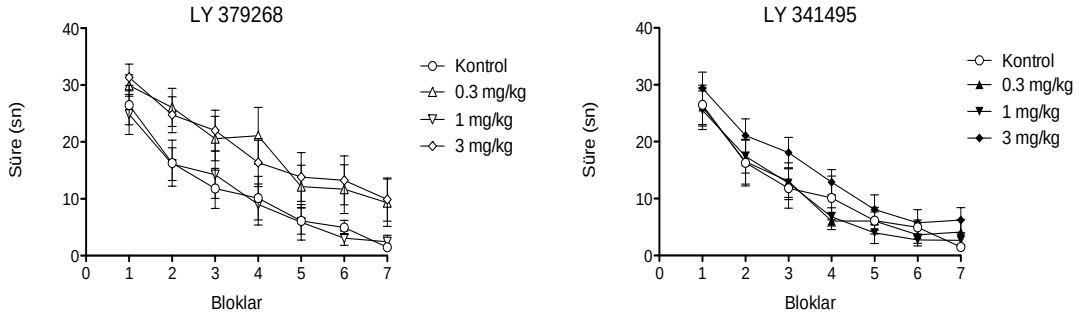


Şekil 5. Farelerin platforma erişme süreleri. Her bir blok, deneyin yapıldığı gündeki 4 yüzdürme eğitiminin ortalamasını göstermektedir. Dikey çubuklar standart hatayı göstermektedir.

d) Tigmotaksi (10 cm'lik Perimetrede Yüzme Süresi)

Morris su labirenti testinde havuza bırakılan hayvanlar önce havuzun duvarlarına tırmanmaya ve duvarda kaçacak bir yer aramaya çalışırlar. İlerleyen eğitim denemelerinde, duvardan uzaklaşıp havuzun içinde bir çözüm bulmayı, platforma erişmeyi öğrenirler. Bazen, özellikle ilk eğitim yüzdürmelerinde, platforma çıkan hayvanların tekrar suya atladıkları görülür; bu durum hayvanların platformu karşılaştıkları problemin çözüm noktası veya bir kaçış notası olarak görmediklerini göstermektedir. İlk eğitim yüzdürmelerinde daha fazla karşılaşılan bu davranış (tigmotaksi) giderek azalır ve genellikle farelerde sıçanlara oranla daha fazla karşımıza çıkmaktadır. Bu deneylerde, farelerin havuzun duvarlarına 10 cm yakınlığındaki bir alanda yüzdükleri süreler kaydedilerek, tigmotaksi yönünden bir değerlendirme yapılması amaçlanmıştır.

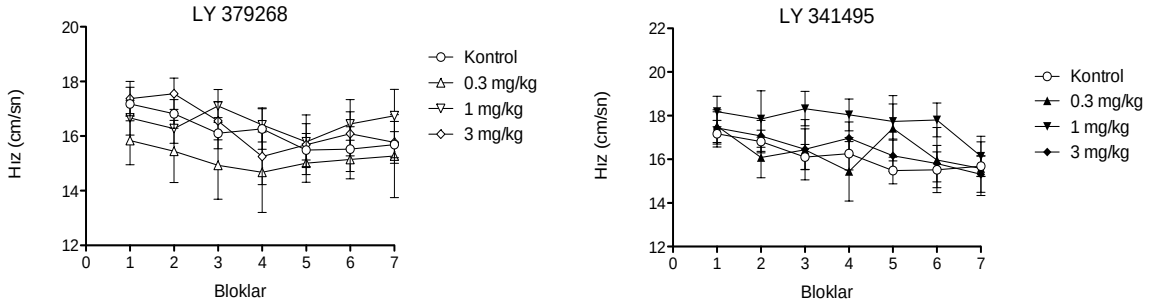
Kontrol grubundaki farelerin eğitimler devam ettikçe havuzun 10 cm'lik perimetresinde yüzdükleri süre kısalmıştır yani tigmotaksi davranışı azalmaktadır (Şekil 6). Yani, fareler içinde bulundukları problemin çözümünü öğrenmektedirler. 0.3 mg/kg ve 3 mg/kg dozda LY 379268 ve 3 mg/kg LY 341495 verilen farelerde perimetrede yüzme sürelerinde bir artış gözlendi ancak bu artışlar herhangi bir blokta istatistiksel olarak anlamlı değildi. Sonuç olarak, LY 379268 ve LY 341495 Morris su labirentinde farelerin gösterdiği tigmotaksi üzerinde olumlu veya olumsuz bir etki göstermemektedir.



Şekil 6. Farelerin havuzun 10 cm'lik perimetresinde yüzme süreleri (tigmotaksi). Her bir blok, deneyin yapıldığı gündeki 4 yüzdürme eğitiminin ortalamasını göstermektedir. Dikey çubuklar standart hatayı göstermektedir.

e) Yüzme Hızı

Deneyler süresince kontrol grubu farelerin yüzme hızlarında istatistiksel anlamlı değişiklikler meydana gelmedi. Şekil 7'de görüldüğü gibi, LY 379268 veya LY 341495 verilen farelerde yüzme hızlarında kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı bir değişiklik yoktur.



Şekil 7. Farelerin yüzme hızları. Her bir blok, deneyin yapıldığı gündeki 4 yüzdürme eğitiminin ortalamasını göstermektedir. Dikey çubuklar standart hatayı göstermektedir.

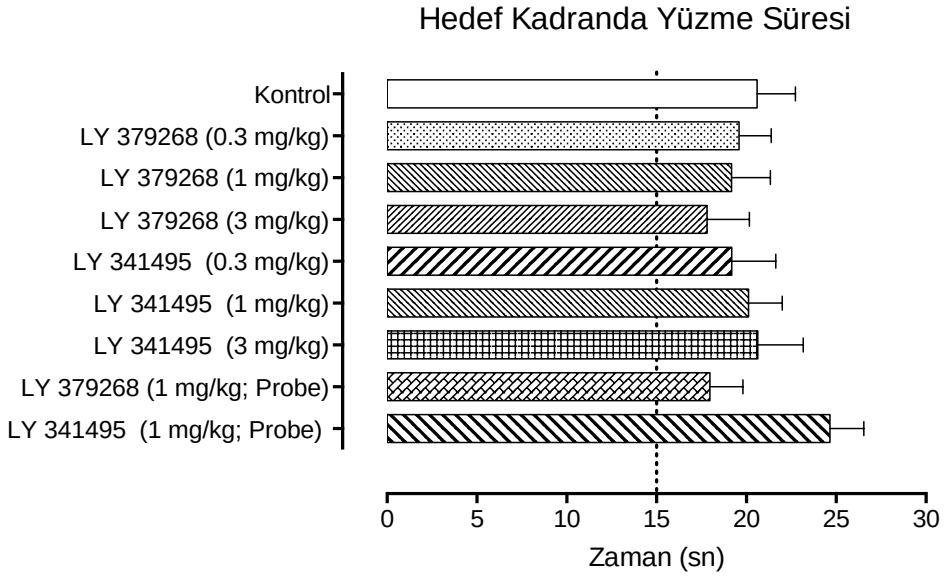
2. PROBE TESTLERİNDE ELDE EDİLEN BULGULAR

Yedi gün süreyle saklı platformun yerini bulmaları için eğitilmiş fareler, sekizinci günde platform çıkarılarak 60 saniye süreyle yüzdürüldüler.

a) Hedef Kadranda Yüzme Süresi

Farelerin eğitim yüzdürmelerinde platformun bulunduğu kadranda geçirdikleri süre, gruplar arasında anlamlı bir farklılık göstermedi. Bu testte toplam yüzdürme süresi 60 saniye olduğundan, herhangi bir kadran tercihi yapmaksızın yüzen bir hayvanın, teorik olarak herhangi bir kadranda 15 saniye yüzmesi beklenir. Farenin bir kadranda 15 saniyeden daha fazla yüzmüş olması, o kadranla ilgili bir tercihi olduğuna işaret etmektedir. Şekil 8'de tüm hayvanların hedef kadranda 15 saniyeden daha uzun bir süre geçirdikleri görülmektedir.

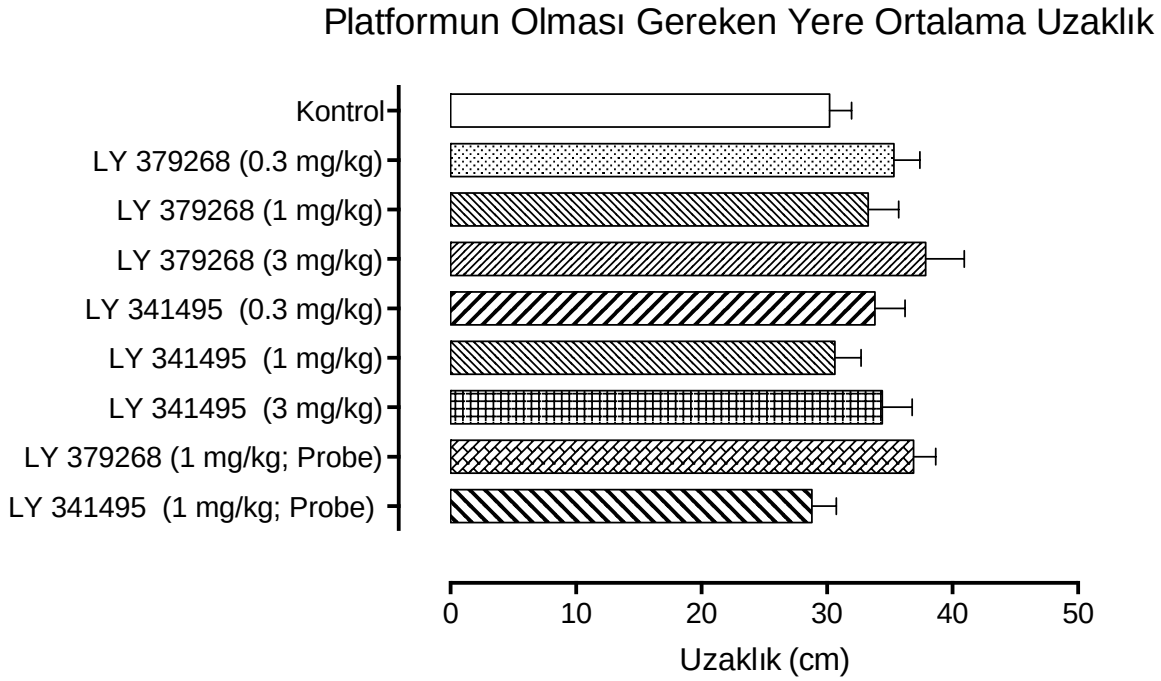
Tüm deneyler boyunca (8 gün süreyle) LY 379268 veya LY 341495 verilen farelerde (her iki ilaç için, 0,3 mg/kg, 1 mg/kg ve 3 mg/kg dozlarda) bu parametrede bir düzelme ya da bozulma saptanamadı. Ayrıca, bir grupta LY 379268 sadece *probe* testinden 1 saat önce (sadece 8. gün) 1 mg/kg dozunda ve diğer bir grupta da LY 341495 sadece *probe* testinden 1 saat önce (sadece 8. gün) 1 mg/kg dozunda verilerek, eğitim yüzdürmeleri sırasında ilaca maruz kalmayan farelerde bu ilaçların *probe* test performansını olumlu veya olumsuz etkileyip etkilemedikleri incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar LY 241495 verilen hayvanlarda hedef kadranda yüzme süresinde bir artışı düşündürmekle birlikte, bu artış istatistiksel anlamlı değildi (Şekil 8).



Şekil 8. *Probe* testinde farelerin hedef kadranda yüzme süreleri. Yatay çubuklar standart hatayı göstermektedir.

b) Platformun Olması Gereken Yere Ortalama Uzaklık

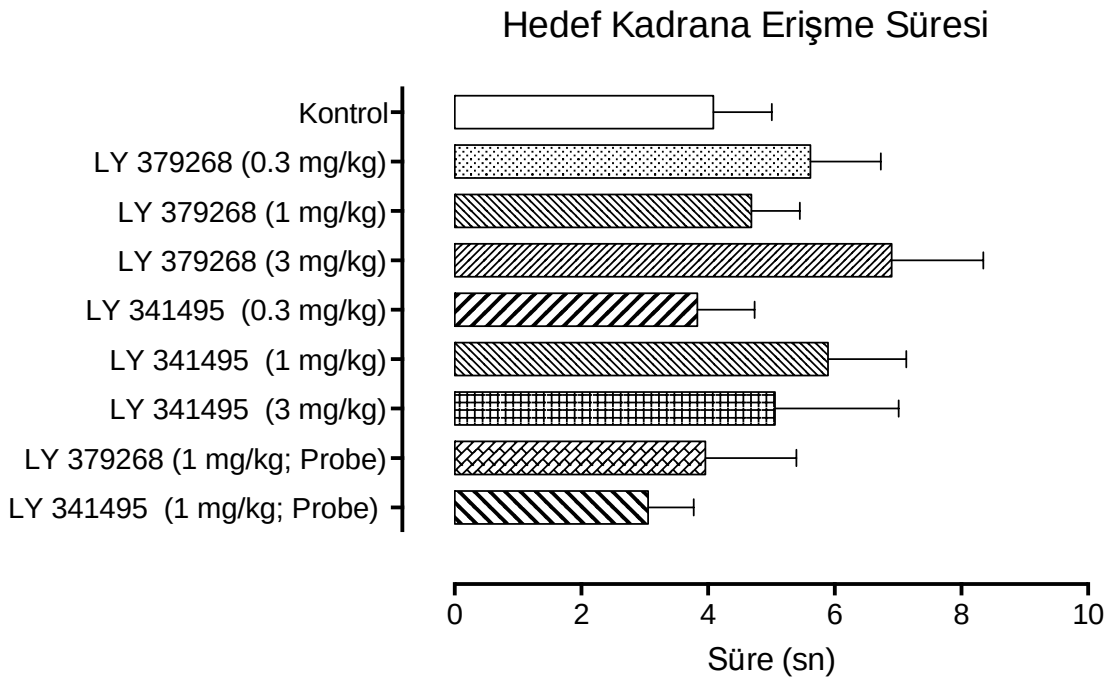
Eğitim yüzdürmelerinde kullanılan platforma ortalama uzaklık parametresine benzer şekilde, *probe* testlerinde, farelerin, çıkarılmış olan platformun olması gerektiği yere ortalama uzaklıkları incelendiğinde, gruplar arasında istatistiksel anlamlı bir fark gözlenmedi.



Şekil 9. *Probe* testinde farelerin platformun olması gereken yere ortalama uzaklıkları. Yatay çubuklar standart hatayı göstermektedir.

c) Hedef Kadrana Ulaşma Süresi

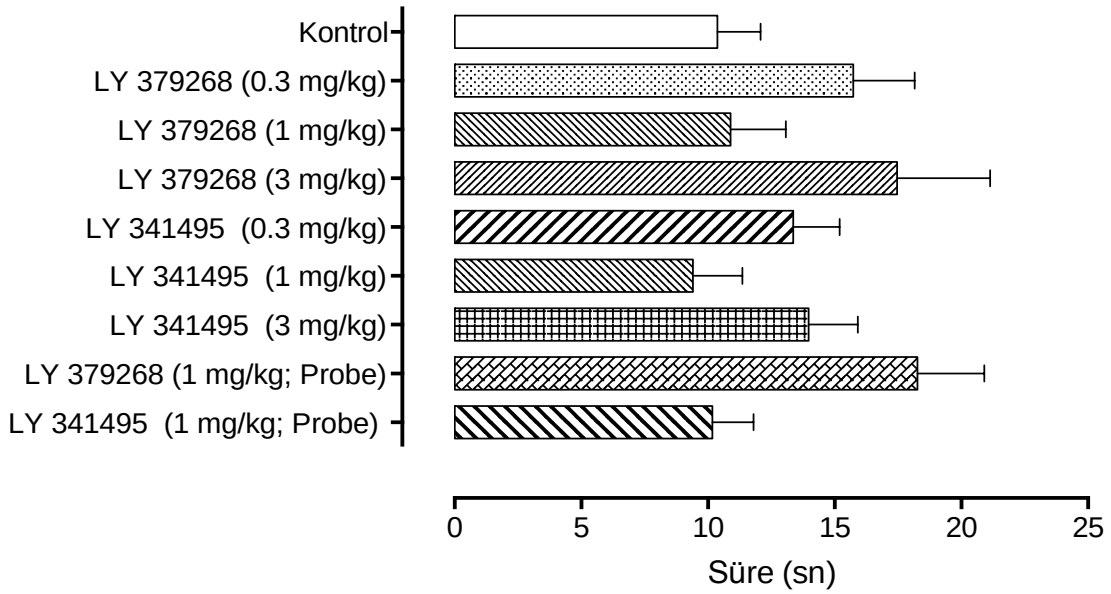
Farelerin hedef kadrana ulaşma süreleri, gruplar arasında bazı farklılıklar sergilemekle birlikte, bu farklılıklar istatistiksel anlamlılık düzeyine erişmedi (Şekil 10). LY 379268 3 mg/kg dozu (8 gün süreyle) ve LY 341495 1 mg/kg dozu (8 gün süreyle) verilen gruplarda hedef kadrana ulaşma süreleri kontrol grubuna göre daha uzundu; ancak bu farklar istatistiksel anlamlı değildi. Diğer taraftan, sadece *probe* testinin yapılacağı gün tek doz olarak LY 341495 (1 mg/kg) verilen farelerin hedef kadrana, kontrol grubu farelere oranla daha çabuk ulaştıkları saptandı; fakat bu fark da istatistiksel yönden anlamlı bulunmadı.



Şekil 10. *Probe* testinde farelerin hedef kadrana ulaşma süreleri. Yatay çubuklar standart hatayı göstermektedir.

d) Tigmotaksi (10 cm'lik Perimetrede Yüzme Süresi)

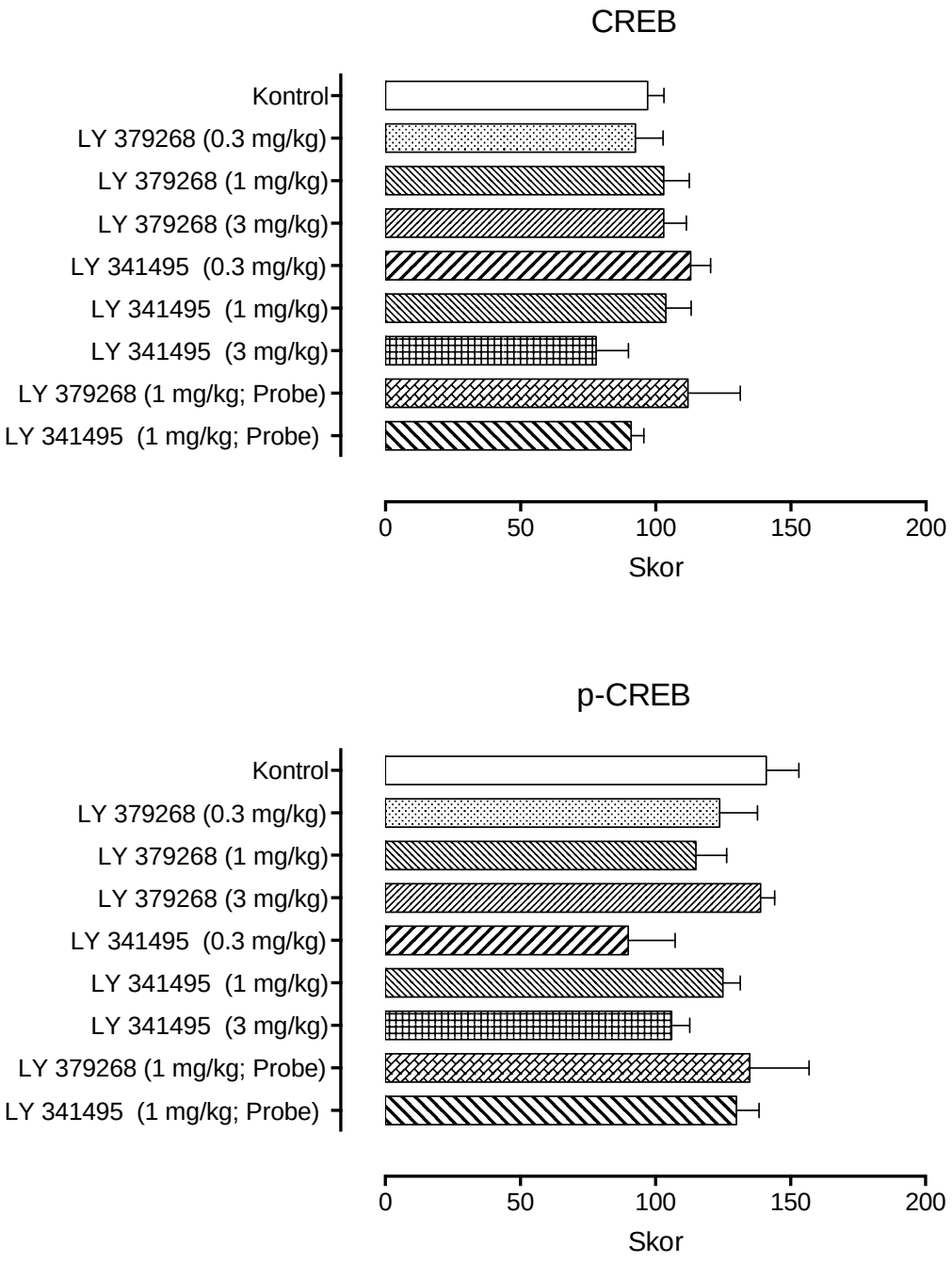
Eğitim yüzdürmelerinde olduğu gibi, probe testinde de, farelerin gösterdikleri tigmotaksi davranışı değerlendirilmiştir (Şekil 11). LY 379268 0.3 mg/kg ve 3 mg/kg dozu (8 gün süreyle), LY 341495 3 mg/kg dozu (8 gün süreyle) ve probe testinden önce 1 mg/kg tek doz olarak LY 379268 verilen farelerde, havuzun 10 cm'lik perimetresinde yüzme süreleri kontrol grubuna oranla yükselmiş bulundu; ancak bu artışlar istatistiksel anlamlılığa erişmedi.



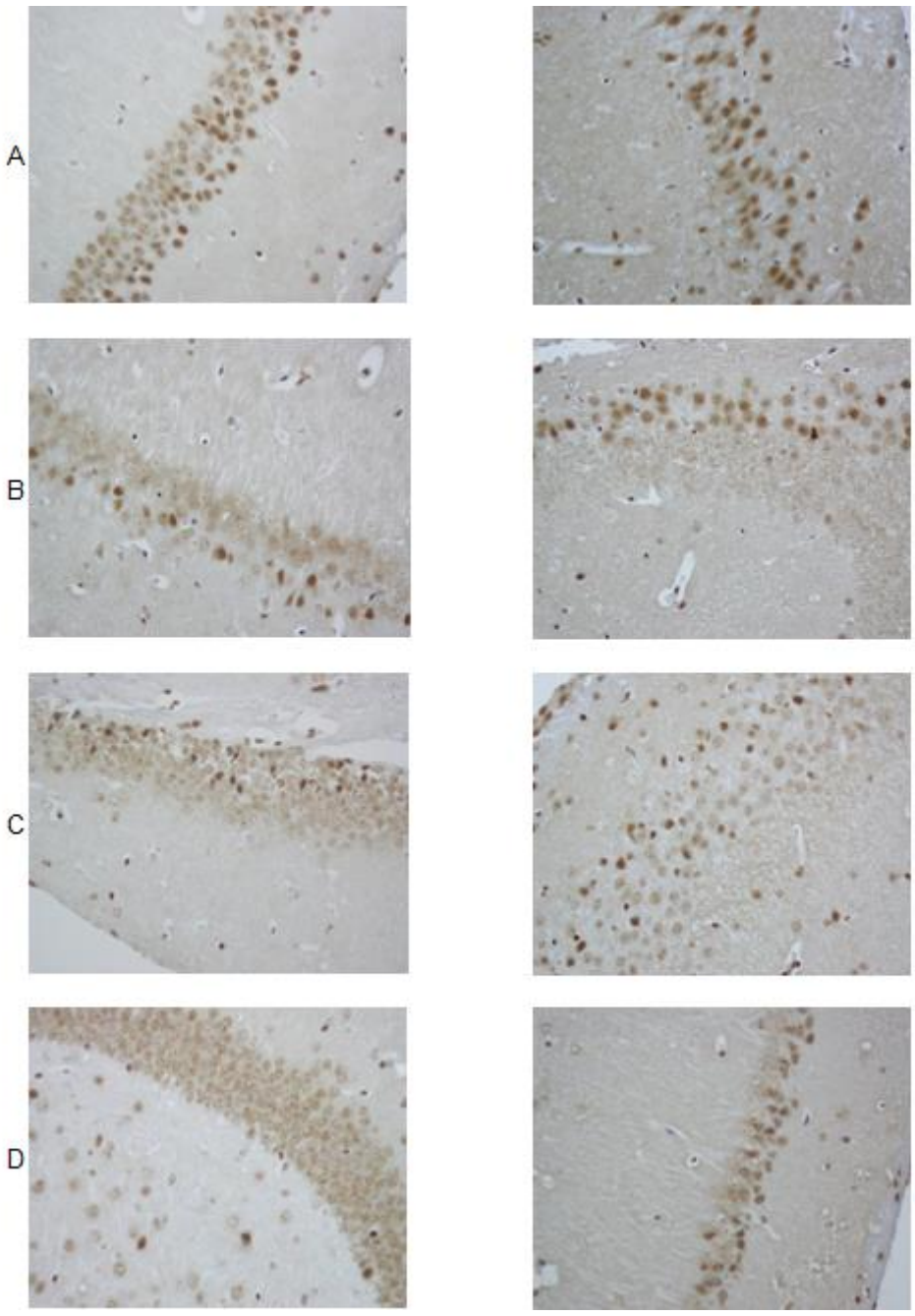
Şekil 11. *Probe* testinde farelerin perimetrede yüzme süreleri (tigmotaksi). Yatay çubuklar standart hatayı göstermektedir.

3. İMMUNOHİSTOKİMYA DENEYLERİNDE ELDE EDİLEN BULGULAR

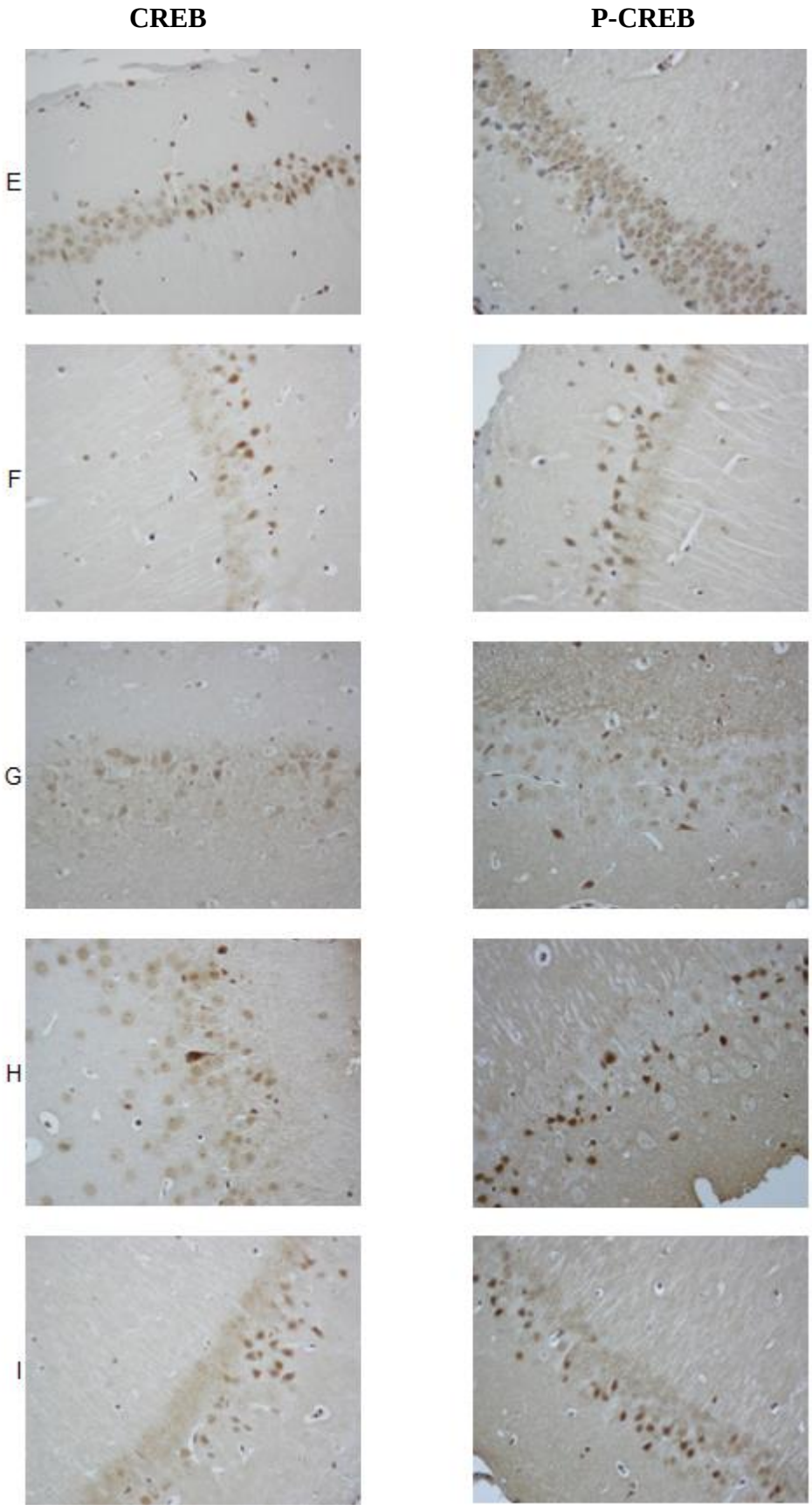
İmmunohistokimyasal analizlerde, fare hipokampüsteki CREB aktivitelerinin gruplar arasında anlamlı bir farklılık göstermediği saptandı ve gruplarda saptanan aktiviteler birbirlerine yakın değerlerde idi (Şekil 12). p-CREB aktiviteleri, CREB aktivitelerine oranla biraz daha fazla değişkenlik göstermekle birlikte, gruplar arasındaki farklardan herhangi biri istatistiksel yöndem farklı değildi.



Şekil 12. Farelerin hipokampüsünde CREB ve p-CREB aktiviteleri. Yatay çubuklar standart hatayı göstermektedir.



Şekil 13. İmmünohistokimya görselleri (X 40)



Şekil 13. İmmünohistokimya görselleri (X 40)(devam ediyor)

TARTIŞMA

Beynin yapıları ve uzaysal öğrenme ile yapılan çalışmalar incelendiğinde hipokampüs uzaysal öğrenmede önemli bir rol oynamaktadır. Hipokampus gri bir cevher tabakası olup, lateral ventrikülün alt boynuz tabanı boyunca uzanır, filogenetik olarak beynin en eski kısımlarındandır. Hipokampüs beyinde birçok bölge ile iletişim halindedir. Eski kaynaklar incelendiğinde hipokampüs ile ilgili bilgilerin sınırlı olduğu ve hipokampüsün sadece koku ile ilgili bir yapı olduğunun düşünüldüğü görülmektedir. Hipokampüsle ilgili çalışmalar arttıkça hipokampüsün beynin başka fonksiyonlarında da rol oynadığı anlaşılmıştır. Limbik sistem hareket ve bunların davranışlara dönüşmesinde etkilidir ve çok sayıda sinyali hipokampüsten alır. Beyin bölgesinden hipokampüsün çıkarıldığı birçok çalışmanın sonucuna bakıldığında verbal ve sembolik anıların saklanmasının engellendiği görülmüştür. Böylelikle hipokampüsün kısa süreli ve uzun süreli bellekte önemli bir yere sahip olduğu anlaşılmıştır (53). Hipokampüste monoaminerjik, kolinerjik, GABAerjik afferentler bulunmakta, glutamat ve aspartat, hipokampüsten en çok salıverilen eksitatör transmiter olarak bilinmektedir. Glutamatın hipokampüste uzun süreli potansiyalizasyon (*long term potentiation*, LTP) gelişiminden sorumlu olduğu kanıtlanmıştır (1). Öğrenmeden sorumlu bir elektrofizyolojik aktivite olduğu kabul edilen LTP glutamatın iyonotropik reseptörleri ve özellikle NMDA reseptörleri rol oynamaktadır. Glutamatın iyonotropik reseptörleri yanında, 8 tane metabotropik reseptörü bulunmakta ve bu reseptörlerin santral sinir sisteminde yaygın dağılım göstermesi nedeniyle çeşitli santral aktivitelere katkıda bulunma olasılığı olduğu vurgulanmaktadır. Glutamat reseptör çalışmaları incelendiğinde metabotropik reseptörler ile

ilgili çalışmalar henüz çok sınırlıdır. Fakat metabotropik reseptörlerin SSS ve özellikle hipokampüs bölgesinde yaygın dağılım göstermesi ve hipokampüsün bellek ile ilişkili olduğu bilgisinin varlığı metabotropik reseptörlerin bellek üzerine bazı etkilerinin olabileceğini düşündürmüştür (53). Grup I (mGluR1 ve mGluR5), Grup II (mGluR2 ve mGluR3) ve Grup III (mGluR4, mGluR6, mGluR7 ve mGluR8) şeklinde sınıflandırılan metabotropik glutamat reseptörlerinden, Grup II reseptörler sıklıkla presinaptik yerleşimlidirler ve nörotransmiter salıverilişini inhibe ederler. Bu etkiyi eksitatör (glutamaterjik), inhibitör (GABAerjik) ve nöromodülatör (monoaminler, asetilkolin, peptidler) sinapslarda oluşturabilmektedirler. mGluR2'nin medial perforan yolak üzerinde yer aldığı ve *mossy fiber* üzerinde bulunduğu saptanmıştır (54). mGluR2 geni silinmiş fareler hipokampüste *mossy fiber*-CA3 sinapsında normal bir bazal sinaptik ileti ve LTP sergilemekle birlikte, bu sinapsta düşük frekanslı uyarıyla oluşturulan LTD'nin belirgin bir şekilde bozulduğu gözlenmiştir (55). Bir başka çalışmada, mGluR2 aktivasyonunun kognitif bozulmaya yol açtığı öne sürülmüş ve mGluR2 antagonistlerinin kognitif bozukluklarda kullanılma potansiyeli olabileceği iddia edilmiştir (56). mGluR2 geni silinmiş farelerin kokaine yanıtının artması nedeniyle, mGluR2'nin ilaç bağımlılığında da bir rol oynayabileceği öne sürülmüştür (57).Bu reseptör grup II agonistlerin rodent psikoz modelindeki yararlı etkilerine de aracılık etmektedir (58,59).

Çalışmamızda fareler havuzun içindeki saklı platformun yerini öğrenmeleri amacıyla 7 gün süreyle günde dört kez yüzdürüldüler (öğrenme testi), 8. günde platform havuzdan çıkarıldı ve fareler bir kez 60 saniye süreyle yüzdürüldüler *(probe* testi). İlk 7 gün yapılan eğitimlerde platforma erişim süresi, platforma ortalama uzaklık ve platforma ulaşana dek yüzülen uzaklık parametreleri değerlendirildi. Kontrol grubundaki fareler, incelenen bu parametreler yönünden, her gün giderek daha iyi performans gösterdiler ve platformun yerini öğrendiler. Grup II metabotropik reseptör agonisti (LY 379268) ve antagonistinin (LY 341495) incelenen üç dozunda elde edilen öğrenme grafikleri kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı bir farklılık göstermedi. Elde ettiğimiz bulgular, metabotropik glutamat reseptörlerinin uyarılması veya bloke edilmesinin Morris su labirentinde farelerin uzaysal öğrenme fonksiyonunu olumlu veya olumsuz yönde etkilemediğini göstermektedir.

Platformsuz yüzdürmede incelenen parametrelerden biri hedef kadrana erişme süresiydi. İçinde bulunduğu problemin farkına varan farenin hedef kadrana ulaşma süresi kısa, hedef kadranda geçirdiği süre ise uzun olmalıdır. Deneylerimizde bu parametrelerin kontrol grubu farelere oranla anlamlı bir değişiklik göstermediğini belirledik. Ölçümü yapılan bir başka önemli parametre de; platformun olması gereken yere ortalama uzaklıktı. Öğrenme bellek süreci oluşumunu tamamlamış olan hayvanın platformun yerini hatırlayarak platforma yakın

bölgelerde yüzmesi beklenir. Elde ettiğimiz sonuçlar, Grup II metabotropik reseptör agonisti (LY 379268) ve antagonistinin (LY 341495) incelenen üç dozunda bu parametreyi istatistiksel olarak anlamlı derecede etkilemediğini ortaya koymuştur.

Probe testinde elde edilen kayıtlarda, hayvanın hedef kadranda ne kadar süre yüzdüğü de incelendi. Hayvanın hedef kadranda daha uzun süre yüzmesi, onun bu bölgede bir arama faaliyeti içinde olduğu şeklinde yorumlanabilir; bir başka deyişle, hayvan bize platformun buralarda bir yerde olduğunu söylemektedir. Bu hayvan platformun yerini öğrenmiştir, öğrenme ve uzaysal bellek aktivasyonu gerçekleşmiştir. Belleği bozan ilaçların, hedef kadranda geçirilen süreyi azaltması beklenir. Bulgularımız Grup II metabotropik reseptör agonisti (LY 379268) ve antagonistinin (LY 341495) incelenen üç dozunda hedef kadranda geçirilen süreyi artırıcı ya da azaltıcı yönde bir etkisi olmadığını ortaya koymuştur. Yani, Grup II metabotropik reseptörler, hayvanların platformun yerini anımsamalarını olumlu ya da olumsuz yönde etkilememektedir.

Probe testinde incelediğimiz çeşitli parametrelerde elde ettiğimiz sonuçlar birbirleriyle tutarlıdır ve göstermektedir ki, fareler eğitim yüzdürmelerinde platformun yerini öğrenmekte ve *probe* testinde platformun yerini hatırlamaktadırlar. Grup II metabotropik reseptör agonisti (LY 379268) ve antagonisti (LY 341495) uygulanması farelerin bu parametrelerde gösterdikleri performansı etkilememektedir. Glutamatın öğrenme ve bellekte rol oynadığı göz önüne alındığında ve mGluR2'nin hipokampüste presinaptik yerleşimi olduğu düşünülürse, Grup II metabotropik reseptör agonisti (LY 379268) ve antagonistinin (LY 341495) öğrenme ve bellek fonksiyonunda olumlu veya olumsuz bir değişiklik ortaya çıkarması beklenebilir. Ancak, elde ettiğimiz bulgular bu görüşü doğrulamamıştır.

Bu çalışmada, hayvanların havuzdaki yüzme hızları ve havuz kenarına 10 cm'lik bölgede yüzdükleri süreler (tigmotaksi) de ölçüldü. Farelerin yüzme hızları, testin gerek öğrenme gerekse retansiyon fazlarında farklılık göstermedi. Benzer şekilde, çalışmada incelenen parametrelerden bir diğeri olan tigmotaksi açısından da her iki fazda değişiklik görülmedi. Bu parametreye göre; deney esnasında hayvandan beklenen davranış, havuzun içinde gizlenmiş platformu bulması ve hangi yönden bırakılırsa bırakılsın havuzun iç kısmına doğru yönelmesidir. Ancak, bu durumu kavrayamayan fare havuz içinde amaçsızca dolaşmaktadır. Bu parametre bize özellikle hayvanın içinde bulunduğu ve çözmesi gerekli problemin ne kadar farkında olduğunu gösterir. Tigmotaksi'nin artması hayvanın içinde bulunduğu problemin farkına varmadığını göstermektedir. Elde ettiğimiz verilere göre Grup II metabotropik reseptör agonisti (LY 379268) ve antagonisti (LY 341495) verilişi bu

parametreyi anlamlı derecede değiştirmedi. Bu durum bu ajanların farelerin araştırma oryantasyonunu etkilemediğini göstermektedir.

Cyclic AMP Response Element Binding Proteini (CREB) bellek ile, özellikle de uzun süreli bellek ile ilişkili görevlere sahiptir. Bellek sürecinde nöronun aktivasyonu ile birçok hücre içi sinyal yolağı harekete geçer. CREB fosforilasyonu belleğin uzun süreli depolanmasında önemli görünmektedir. CREB belirli bir konsantrasyona ulaştığında kalıcı olarak dönüşür. CREB yolağı tekrar tekrar uyarıldığında, sinaps büyümesini düzenleyen genlerin eksprese olmasını sağlar. Bu da nöronlar arasındaki bağlantıların değişmesine yol açar. Sinaptik bağlantılardaki bu değişiklikler, uzun süreli belleğin temelini oluşturur. CREB proteini ve BDNF'nin etkilerini, hipokampusta aynı grup nöronlarda gerçekleştirdikleri saptanmıştır. CREB proteini ile BDNF arasındaki bağlantıyı ortaya çıkarmak için yapılan araştırmalarda, CREB proteininin işlevinde azalma olmasının BDNF eksikliğine katkıda bulunabileceği tespit edilmiştir (60). Bu bilgiler ışığında, farelerin öğrenme ve bellek sürecinde Morris su labirenti yüzme deneylerine ve ölçümlerine ek olarak, beyin dokusundaki CREB düzeylerine bakıldı.

Western blotting analizleri hipokampüsteki CREB ve p-CREB aktivitelerinin Grup II metabotropik reseptör agonisti (LY 379268) ve antagonistinin (LY 341495) verilen farelerde kontrolden anlamlı bir farklılık göstermediğini ortaya koymuştur. CREB ve p-CREB aktivitesinin düzenlenmesinden sorumlu reseptörler sadece Grup II metabotropik reseptörler değildir. Bu nedenle, mevcut bazal CREB ve p-CREB aktivitesi, Grup II metabotropik reseptörlerin aktivasyonu veya inhibisyonu sonucu oluşan değişiklikleri maskelemiş olabilir ve bu nedenle herhangi bir değişiklik saptanamamış olabilir.

Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlara göre, Grup II metabotropik reseptör agonisti (LY 379268) ve antagonisti (LY 341495) uygulanışının Morris su labirentinde uzaysal öğrenme ve bellek gelişimi üzerinde gözlenebilir herhangi bir değişiklik oluşturmadığı sonucuna varılmıştır.

SONUÇLAR

Grup II metabotropik glutamat agonisti LY379268 ve antagonisti LY341498'in uzaysal öğrenme ve bellek üzerine etkilerini incelemek için erişkin, erkek, balb/c fareler 7 gün süre boyunca günde 4 kez Morris su labirentinde gizli platformun yerini bulmaları için eğitildiler (*trial*). 8. gün platform havuzdan çıkarılarak farelerin platform arayışları gözlemlendi (*probe*).

Grup II metabotropik glutamat agonisti LY379268 gerek öğrenme (*trial*) gerekse (*probe*) test performansını olumlu ya da olumsuz yönde etkilemedi.

Benzer şekilde Grup II metabotropik glutamat antagonisti LY341498 gerek öğrenme (*trial*) gerekse (*probe*) test performansını olumlu ya da olumsuz yönde etkilemedi.

İmmunohistokimyasal analizlerde hipokampüs CREB ve p-CREB aktivasyonları yönünden GrupII metabotropik glutamat agonisti LY379268 ve antagonisti LY341498 arasında bir farklılık yoktu.

Sonuç olarak Grup II metabotropik glutamat agonisti LY379268 ve antagonisti LY341498 uzaysal öğrenme ve bellek üzerine anlamlı bir etkiye sahip bulunmamıştır.

ÖZET

Hipokampal glutamatın uzaysal öğrenme ve bellekte önemli rol oynadığı bilinmektedir. Glutamatın iyonotropik reseptörleri üzerine yoğun çalışmalar yapıldığından, biz de araştırmamızda, Grup II metabotropik reseptörlerin uzaysal öğrenme ve bellek üzerine etkisinin olup olmadığını araştırmayı planladık. Fareler 7 gün süreyle günde 4 deneme ile Morris su labirentinde saklı platformu bulma konusunda eğitildikten sonra, 8. günde çıkarılan platformu arama çabaları kaydedildi. Grup II metabotropik reseptör agonisti LY 379268 ve antagonisti LY 341495 uygulaması, incelenen öğrenme ve bellek testlerinde herhangi bir değişikliğe neden olmadı. İmmunohistokimya analizi, fare hipokampüsünde CREB ve p-CREB aktivitelerinde gruplar arasında farklılık olmadığını göstermektedir. Sonuçlarımız, Grup II metabotropik reseptörlerin uyarılmasının veya inhibisyonunun uzaysal öğrenme ve bellek fonksiyonları üzerine etkisinin olmadığını göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: glutamat; hipokampüs; LY 379268; LY 341495; uzaysal öğrenme; bellek

EFFECT ON SPATIAL LEARNING AND MEMORY OF GROUP II METABOTROPIC RECEPTORS AT MOUSE

SUMMARY

Hippocampal glutamate is known to play a pivotal role in spatial learning and memory. Since ionotropic glutamate receptors are intensely studied, we aimed to investigate whether Grup II metabotropic receptors affect spatial learning and memory. In Morris Water-Maze task, mice were given 4 trials per day for 7 consecutive days to locate a hidden platform. On the 8th day, the platform is removed and learning and memory functions of the animals were evaluated. Neither the Group II metabotropic receptor agonist, LY 379268, nor the antagonist, LY 341495, exerted any effect on evaluated acquisition and retention phase parameters. Western blotting analyses indicate that CREB ve p-CREB activities in mice hippocampus are similar in all groups. Our results show that activation or inhibition of Group II metabotropic receptors have no effect on spatial learning and memory functions.

Keywords: glutamate; hippocampus; LY 379268; LY 341495; spatial learning; memory

KAYNAKLAR

1. Sweatt J.D. Long-Term Potentiation: A Candidate Cellular Mechanism for Information Storage in the CNS. In Byrne JH. (Eds). Concise Learning and Memory: The Editor's Selection. 1th ed. Slovenia: Elsevier; 2009.p.210-38.

2. Gu G, Lorrain DS, Wei H, Cole RL, Zhang X, Daggett LP et al. Distribution of metabotropic glutamate 2 and 3 receptors in the rat forebrain: Implication in emotional responses and central disinhibition. Brain Res 2008;1197:47-62.

3. Richards G, Messer J, Malherbe P, Pink R, Brockhaus M, Stadler H et al. Distribution and abundance of metabotropic glutamate receptor subtype 2 in rat brain revealed by [3H]LY354740 binding in vitro and quantitative radioautography: correlation with the sites of synthesis, expression, and agonist stimulation of [35S]GTPgammas binding. J Comp Neurol 2005; 487(1):15-27.

4. Tara N. Edwards, Ian A. Meinertzhagen. The functional organisation of glia in adult brain of drosophila and other insects. Progress in Neurobiol 2010;90(4): 471-97.

5. Arthur C. Guyton, John E. Hall. Beyin korteksi, beynin zihinsel işlevleri, öğrenme ve bellek beyin korteksinin fizyolojik anatomisi. (çeviri: H. Çavuşoğlu, B. Çağlayan Yeğen). Çavuşoğlu H, Çağlayan Yeğen B (editörler). Tıbbi Fizyoloji'de. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi; 2007.s. 714-47.

6. Mingjian Shi, Devi Majumdar, Donna J. Webb. Glia co-culture with neurons in microfluidic platforms promotes the formation and stabilization of synaptic contacts. Lab Chip 2013;13(15): 3008-21.

7. Larry R. Squire. Memory and Brain Systems. J. Neurosci 2009;29(41):12711-12716.

8. Sweatt JD (Ed) introduction the basics of psychological learning and memory theory In: Sweatt JD (Ed). Mechanisms of memory. 2nd ed. China: Academic Press; 2010.p.3–23.

9. Nurcan ARICANLI. Selektif REM deprivasyonunun bellek fonksiyonları üzerine etkisinde selektif serotonin reuptake inhibitörü sitalopramın etkisi. Edirne: Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakoloji Ana Bilim Dalı; 2010.

10. Roediger HL, Zaromb FM, Goode MK. Long-Term Potentiation: A Typology of Memory Terms. In Byrne JH. (Eds). Concise Learning and Memory: The Editor's Selection. 1th ed. Slovenia: Elsevier; Ed. 2009. p. 1-14.

11. M. Emin Ceylan, Ahmet Türkcan. Araştırma ve klinik uygulamada biyolojik psikiyatri. 2.baskı. İstanbul: Abdi İbrahim yayını; 2006.s.89-94.

12. Antonov I, Kandel ER, Hawkins RD. Presynaptic and postsynaptic mechanisms of synaptic plasticity and metaplasticity during intermediate-term memory formation in aplysia. J.Neurosci 2010;30(16):5781-91.

13. Robert D. Hawkins. Possible contributions of a novel form a synaptic plasticity in alypsia to reward, memory and their dysfunctions in mammalian brain. Learn Mem 2013;20(10): 580-91.

14. Ying Yang and Nicole Calakos. Presynaptic long-term plasticity. Front Synaptic Neurosci 2013;5:3.

15. Tulving E, Markowitsch HJ. Episodic and declarative memory: role of the hippocampus. Hippocampus 1998;8(3):198-204.

16. Larry R, Squire and Stuart M. Zola. Structure and function of declarative and nondeclarative memory systems. Proc. Natl Acad Sci U.S.A. 1996;93(24): 13515-22.

17. Arianna Maffei. The many forms and functions of long term plasticity at GABAergic synapses. Neural Plast 2011;254724.

18. Stern SA, Alberini CM.Mechanisms of memory enhancement. Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med 2013;5:37-53.

19. Perisse E, Raymond-Delpech V, Neant I, Matsumoto Y, Leclerc C, Moreau M et al. Early calcium increase triggers the formation of olfactory long-term memory in honeybee 2009;7:(3).

20. Kida S. A Functional role for CREB as a positive regulator of memory formation and LTP. Exp Neurobiol 2012;21,(4):136-40.

21. Kayaalp OS, UZBAY T. Santral sinir sistemini farmakolojisinin temelleri. Kayaalp OS.(Editör). Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji'de. Ankara: Pelikan Tıp ve Teknik Kitapçılık; 2009. s.623-60.

22. Niciu MJ, Kelmendi B, Sanacore G. Overview of glutamatergic neurotransmission in the nervous system. Pharmacol Biochem Behav 2013;100(4):656-64.

23. Traynelis S, Wollmuth LP, McBain CJ, Menniti FS, Vance KM, Ogden KK et. Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. Pharmacol Rev 2010;62(3): 405-96.

24. A.E. Kingston, P.L. Ornstein, R.A. Wright, B.G. Johnson, N.G. Mayne, J.P. Burnett et. LY341495 is a nanomolar potent and selective antagonist of group II metabotropic glutamate receptors. Neuro pharmacology 1998;37:1-12.

25. Tocris Bioscience Scientific Review Series, Tocris Reviews No:26,2011. http:www.tocris.com.

26. Niswender CM ve Conn PJ. Metabotropic Glutamate Receptors: Physiology, Pharmacology, and Disease. Annu Rev Pharmacol Toxicol 2010;50: 295–322.

27. Trevor A J, Katzung BG, Masters SB. SSS Farmakolojisine Giriş. Altan M (editör). Katzung ve Trevor Farmakoloji Sınav ve Gözden Geçirme'de. Ankara: Güneş Tıp Kitabevi; 2010. s.175-85.

28. Arvind Chopa. N-2-(4-(4(125) Iodobenzyl)-piperidin-1-ylmethyl) benzoimidazol-5-yl)-methanesulfonamide. National center for biotechnology information, 2011.

29. Lonchamp E, Gambino F, Dupont JL, Doussau F, Valera A, Poulain B et al. Pre and post synaptic NMDA effects targeting purkinje cells in the Mouse cerebellar cortex. 2012;7(1):e30180.

30. Takako OS, Hashimotodani Y, Ano M, Takeda S, Tsubokawa H, Kano M. Endocannabinoid signalling triggered by NMDA receptor-mediated calcium entry into rat hippocampal neurons. J physiol 2007;584(2): 407-18.

31. Wright A, Vissel B. The essential role of AMPA receptr GLUR2 subunit RNA editing in the normal and diseased brain. Front Mol Neorosci 2012;5:34.

32. Nakagawa T. The biochemistry, ultrastructure and subunit assembly mechanism of AMPA receptors. Mol Neurobiol 2010;42(3):161-84.

33. Zhang W, St-Gelais F, Grabner GP, Trinidad JC, Sumioka A, Morimoto-Tomita M et. A transmembrane accessory subunit that modulates kainate-type glutamate receptors. Neuron 2009;61(3):385-96.

34. Copits BA, Swanson GT. Dancing partners at the synapse: auxiliary subunits that shape kainate receptor function. Nat Rev Neurosci 2013;13(10):675-86.

35. Davies CH, Clarke VR, Jane DE, Collingridge GL. Pharmacology of postsynaptic metabotropic glutamate receptors in rat hippocampal CA1 pyramidal neurones. Br J Pharmacol 1995;116(2): 1859-69.

36. Viane AN, Petrof I, Sherman SM. Activation requirements for metabotropic glutamate receptors. Neurosci Lett 2013;29,62-79.

37. Lyon L, Burnet P WJ, Kew J, Corti C, Rawlins JN, Lane T. Fractionation of spatial memory in GRM2/3 (mGlu2/mGlu3) double knokckout mice reveals a role for group II metabotropic glutamate receptors at the interface between arousal and cognition. Neuro psychopharmacology 2011;36, 2616-28.

38. Linden M, Johnson BG, Trokovic N, Korpi ER, Schoepp DD. Use of MGLUR2 and MGLUR3 knockout mice to explore in vivo receptor specificity of the MGLUR2/3 selective antagonist LY341495 Neuropharmacology 2009 Aug;57(2):172-82

39. Bespalov AY, Van Galen MM, Sukhotina IA, Wicke K, Mezler M, Schoemaker H et al. Behavioral characterization of the mGLu group II/III receptor antagonist, LY-341495, in animal models of anxiety and depression. Eur J Pharmacol 2008;592(1-3):96-102.

40. Wang S, Chen X, Kurada L, Huang Z, Lei S. Activation of group II metabotropic receptors inhibits glutamatergic transmission in the rat entorhinal cortex via reduction of glutamate release probability. Cerebral cortex 2012 22:584-594.

41. Bertaso F, Roussignol G, Worley P, Backaert J, Fagni L, Ango F. Homer1a-dependent crosstalk between NMDA and metabotropic glutamate receptors in Mouses neurons. Plos one 2013;5(3):e9755.

42. Shin DM, Dehoff M, Luo X, Kang SH, Tu J, Surendra K. Et. Homer 2 tunes G protein-coupled receptors stimulus intensity by regulating RGS proteins and PLC GAP activities. J cell Biol 2003;162(2): 293-303.

43. Liberto V, Bonomo A, Frinchi M, Belluardo N, Mudo G. Group II Metabotropic glutamate receptor activation by agonist LY379268 treament increases the expression of brain derived neurotrophic factor in the Mouse brain. Neurosci 2010;165:863-73.

44. Mukherje S, Manahan-Vaughan D. Role of metabotropic glutamate receptors in persistent forms of hippocampal plasticity and learning. Neuropharmacology 2013;66:65-81.

45. Hsieh MH, Ho SC, Yeh KY, Pawlak CR, Chang HM, Ho YJ et. Blocade of metabotropic glutamate receptors inhibits cognition and neurodegeneration in an MPTP-induced Parkinson's disease rat model. Pharmacol Biochem Behav 2012;102:64-71.

46. Tang XJ, Xing F. Calcium- permeable AMPA receptors in neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. Biomed 2013;1(6): 828-32.

47. Morken TS, Brekke E, Haberg A., Widerqe M., Brubakk AM, Sonnewald U. Altered astrocyte-neuronal interactions after hypoxia-ischemia in the neonatal brain in female and male rats. Stroke 2014;45(9):2777-85.

48. Zhao P, Ignacio S, Abood ME. Altered pre-symptomatic AMPA and cannabinoid receptor trafficking in motor neurons of ALS model mice: implications for excitotoxicity. Eur. J Neurosci 2008;27(3):572-79.

49. Coulter DA, Eid T. Astrocytic regulation of glutamate homeostasis in epilepsy. Glia. 2012;60(8):1215-26.

50. Tabakoff B, Hoffman PL. The neurobiology of alcohol consumption and alcoholism: an integrative history. Pharmacol Biochem Behav 2013;113:20-37.

51. Revett TJ, Baker GB, Jhamandas J, Kar S. Glutamate system, amyloid Beta peptides and tau protein: functional interralationships and relevance to Alzheimer disease pathology. 2013;38(1):6-23.

52. Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. J Neurosci Methods. Plos one 1984;11(1):47-60.

53. Jeffrey L Cumming (çeviri editörleri Gökhan Erkol, Barış Metin). Alzheimer hastalığı ve ilişkili demansların nöropsikiyatrik özellikleri. İstanbul. İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Nöroloji A.B.D. Sigma Publishing; 2007. s.14-91.

54. Shigemoto R, Kinoshita A, Wada E, Nomura A, Ohishi H. Differential presynaptic localization of metabotropic glutamate receptor subtypes in the rat hippocampus. J. Neurosci 1997;17(19):7503-22.

55. Yokoi M, Kobayashi K, Manabe T, Takahashi T, Sakaguchi I. Impairment of hippocampal mossy fiber LTD in mice lacking mGluR2. Sci. 1996;273(5275):645-47.

56. Higgins GA, Ballard TM, Kew JN, Richards JG, Kemp JA. Pharmacological manipulation of mGlu2 receptors influences cognitive performance in the rodent. Neuropharmacology 2004;46(7): 907-17.

57. Morishima Y, Miyakawa T, Furuyashiki T, Tanaka Y, Mizuma H, Nakanishi S. Enhanced cocaine responsiveness and impaired motor coordination in metabotropic glutamate receptor subtype 2 knockout mice. Proc Natl Acad Sci USA 2005;102(11):4170-75.

58. Fell MJ, Svensson KA, Johnson BG, Schoepp DD. Evidence for the role of metabotropic glutamate (mGlu)2 not mGlu3 receptors in the preclinical antipsychotic pharmacology of the mGlu2/3 receptor agonist (−)-(1R,4S,5S,6S)-4-amino-2-sulfonylbicyclo[3.1.0]hexane-4,6-dicarboxylic acid (LY404039). J. Pharmacol Exp Ther 2008;326(1):209-17.

59. Woolley ML, Pemberton DJ, Bate S, Corti C, Jones DN. The mGlu2 but not the mGlu3 receptor mediates the actions of the mGluR2/3 agonist, LY379268, in mouse models predictive of antipsychotic activity. Psychopharmacology (Berl.) 2008;196(3):431–40.

60. Rahn EJ, Mikael C, Karlsson G, Sweatt D. Cellular, molecular and epigenetic mechanisms in non-associative conditioning: implications for pain and memory. Neurobiol. Learn Mem 2013;105:133-50.

ŞEKİLLER LİSTESİ

ŞEKİL 1. Glutamat reseptörlerinin mekanizması 9
ŞEKİL 2. Morris su labirenti 17
ŞEKİL 3. Farelerin platforma ulaşana kadar yüzdükleri uzaklık. Her bir blok, deneyin yapıldığı gündeki 4 yüzdürme eğitiminin ortalamasını göstermektedir. 19
ŞEKİL 4. Farelerin platforma ortalama uzaklıkları. Her bir blok, deneyin yapıldığı gündeki 4 yüzdürme eğitiminin ortalamasını göstermektedir. 20
ŞEKİL 5. Farelerin platforma erişme süreleri. Her bir blok, deneyin yapıldığı gündeki4 yüzdürme eğitiminin ortalamasını göstermektedir. 21
ŞEKİL 6. Farelerin havuzun 10 cm'lik perimetresinde yüzme süreleri (tigmotaksi). Her bir blok, deneyin yapıldığı gündeki 4 yüzdürme eğitiminin ortalamasını göstermektedir. 22
ŞEKİL 7. Farelerin yüzme hızları. Her bir blok, deneyin yapıldığı gündeki 4 yüzdürme eğitiminin ortalamasını göstermektedir. 23
ŞEKİL 8. Probe testinde farelerin hedef kadranda yüzme süreleri. 24
ŞEKİL 9. Probe testinde farelerin platformun olması gereken yere ortalama uzaklıkları..... 25
ŞEKİL 10. Probe testinde farelerin hedef kadrana erişme süreleri. 26
ŞEKİL 11. Probe testinde farelerin perimetrede yüzme süreleri (*tigmotaksi*)..... 27
ŞEKİL 12. Farelerin hipokampüsünde CREB ve p-CREB aktiviteleri. 28
ŞEKİL 13. İmmünohistokimya görselleri X40..... 29

ÖZGEÇMİŞ

17 Eylül 1982 tarihinde Lüleburgaz ilçesinde doğdum. İlköğrenimimi Alpullu Şeker İlkokulunda, ortaöğrenimimi Edirne Atatürk Ortaokulunda tamamladım. Edirne Lisesinden mezun olduktan sonra 2007 tarihinde Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde lisans eğitimimi tamamladım.

2007-2008 öğretim yılında Final Dergisi Dersanesinde Biyoloji öğretmenliği yaptım. 2008 yılında Orion Sağlık Grubu İlaç firmasında tıbbi ilaç mümessili olarak göreve başladım.

2009-2011 yılları arası Ali Raif İlaç firmasında ilaç mümessili olarak çalıştıktan sonra 2011-2013 yılları arasında Abdi İbrahim İlaç firmasında görev yaptım.

2013-2014 yılları arasında Mustafa Nevzat İlaç firmasında ilaç mümessili olarak çalıştım.

Halen World Medicine İlaç Şirketinde Product Manager olarak çalışmaktayım.

EKLER

Ek 1

T.C.

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARLARI

Oturum Sayısı: 02 **Karar Tarihi: 16.02.2011**

KARAR NO: **2011.02.02**

Yürütücülüğünü Tıp Fakültesi öğretim üyesi Prof Dr Ahmet ULUGÖL'ün yaptığı Yüksek Lisans Öğr Burcu ÇETİNKAYA'in Yüksek Lisans tezi olarak planlanan TÜHDYEK-2011/12 protokol nolu "Grup II metabotropik glutamat reseptörlerinin farelerde uzaysal bellek üzerine etkisi" başlıklı çalışma hakkında görüşüldü; araştırmanın amaç, yaklaşım, gereç ve yöntemler dikkate alınarak incelenmesi sonucunda: Hayvan Hakları Evrensel Bildirgesi ve etik kurallara uygun olarak hazırlandığına yapılabileceğine mevcudun oy birliği ile karar verilmiştir.

Ünvani/Adı/Soyadı	Araştırma ile İlişki	Toplantı Katılımı	İmza
Doç Dr Burhan AKSU Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	☐ var ☐ yok	☐ evet ☐ hayır	
Yrd.Doç. Dr Hayati ARDA Fen-Edebiyat Fakültesi Öğretim Üyesi	☐ var ☑ yok	☑ evet ☐ hayır	
Vet.Hek. Zıya ÇUKUR Veteriner Hekim	☐ var ☐ yok	☐ evet ☐ hayır	
Hüseyin KOÇ Sivil Toplum Örgütü Üyesi Sivi Üye	☐ var ☑ yok	☑ evet ☐ hayır	
Ilyas ÖZMEN Sivil Üye	☐ var ☐ yok	☐ evet ☐ hayır	
Yrd.Doç.Dr Beytullah ÖZKAN Fen-Edebiyat Fakültesi Öğretim Üyesi	☐ var ☑ yok	☑ evet ☐ hayır	
Doç.Dr. S. Arzu VARDAR Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	☐ var ☒ yok	☒ evet ☐ hayır	
Doç Dr. Nilda TURGUT Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	☐ var ☐ yok	☐ evet ☐ hayır	
Yrd.Doç.Dr. Ruşen COŞAR-ALAŞ Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	☐ var ☐ yok	☐ evet ☐ hayır	
Yrd.Doç.Dr. Y. Atakan SEZER Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	☐ var ☒ yok	☒ evet ☐ hayır	