



T.C.  
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

**ANANDAMİD VE ANTAGONİSTLERİNİN MMP-9 İLİŞKİLİ  
HİPOKAMPÜSE BAĞLI HAFIZA ÜZERİNE SIÇANLARDAKİ  
ETKİLERİNİN FARMAKOMOLEKÜLER DÜZEYDE  
İNCELENMESİ**

İBRAHİM YILMAZ

TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN  
Prof. Dr. HANEFİ ÖZBEK

İSTANBUL 2022

## TEZ ONAY FORMU

Kurum : İstanbul Medipol Üniversitesi  
Programın Seviyesi : Yüksek Lisans ( ) Doktora (X)  
Anabilim Dalı : Tıbbi Farmakoloji  
Tez Sahibi : İbrahim YILMAZ  
Tez Başlığı : Anandamid ve antagonistlerinin MMP-9 ilişkili hipokampüse bağlı hafıza üzerine sıçanlardaki etkilerinin farmakomoleküler düzeyde incelenmesi  
Sınav Yeri : İstanbul Medipol Üniversitesi Güney Yerleşkesi  
Sınav Tarihi : 07.01.2022

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve nitelik yönünden Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

| <u>Danışman</u>       | <u>Kurumu</u>               | <u>İmza</u> |
|-----------------------|-----------------------------|-------------|
| Prof.Dr. Hanefi ÖZBEK | İzmir Bakırçay Üniversitesi |             |

### Sınav Jüri Üyeleri

|                                   |                                 |
|-----------------------------------|---------------------------------|
| Dr.Öğr.Üyesi Ayşe Arzu ŞAKUL      | İstanbul Medipol Üniversitesi   |
| Doç.Dr. Mustafa GÜZEL             | İstanbul Medipol Üniversitesi   |
| Dr.Öğr.Üyesi Neriman İpek KIRMIZI | İstanbul Medipol Üniversitesi   |
| Prof.Dr. Berna T. BEBİTOĞLU       | İstanbul Medeniyet Üniversitesi |

Yukarıdaki jüri kararıyla kabul edilen bu Doktora Tezi, Enstitü Yönetim Kurulu'nun ...../...../ ..... tarih ve ...../..... - ..... sayılı kararı ile şekil yönünden Tez Yazım Kılavuzuna uygun olduğu onaylanmıştır.

Prof.Dr. Neslin EMEKLİ

**Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdür Vekili**

## ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

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

İbrahim Yılmaz

İmza

## TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim ve tez çalışmalarım süresince; bilgi, deneyim ve emeğini sabırla hiç esirgemeyerek, en zor zamanlarımda yanımda olan, saygıdeğer tez danışman hocam, *Prof. Dr. Hanefi Özbek*'e, katkı ve yardımları ile her zaman destekleyen Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı başkanı *Dr. Öğr. Üyesi Ayşe Arzu Sayın Şakul*'e, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyelerine, canlı memeli deneklerden hipokampus dokularının rezeke edilmesinde cerrahi tecrübe ve yardımlarını esirgemeyen, Haliç Üniversitesi Tıp Fakültesi Beyin ve Sinir Cerrahisi Anabilim Dalı Öğretim Üyesi, *Doç. Dr. Numan Karaarslan*'a, rezeke edilen dokuların moleküler ve genetik analizleri esnasında bilgi birikimi ve yardımları ile bana destek veren, Namık Kemal Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi, *Doç. Dr. Duygu Yaşar Şirin*'e, eğitim süresi boyunca, yatağa bağımlı olan babamın öz-bakımlarını yerine getirerek, bana en büyük desteği veren; annem, *Hava Yılmaz*'a, ablam *Müh. Demet Kocabıyık*'a, eniştem Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi'nden, *Prof. Dr. Habib Kocabıyık*'a ve benimle her zaman gurur duyan, babam, *Hasan Yılmaz*'a sonsuz teşekkürlerimi ve saygılarımı sunuyorum.

# İÇİNDEKİLER

|  |           |
|--|-----------|
| TEZ ONAY FORMU.....  | i         |
| ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANI .....                       | ii        |
| TEŞEKKÜR .....   | iii       |
| KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ.....                               | vi        |
| TABLolar LİSTESİ .....   | viii      |
| ŞEKİLLER LİSTESİ .....   | ix        |
| RESİMLER LİSTESİ .....   | x         |
| <b>1. ÖZET .....</b>   | <b>1</b>  |
| <b>2. ABSTRACT.....</b>  | <b>2</b>  |
| <b>3. GİRİŞ VE AMAÇ .....</b>                                      | <b>3</b>  |
| <b>4. GENEL BİLGİLER.....</b>                                      | <b>5</b>  |
| 4.1. Hafıza .....  | 5         |
| 4.2. Uzun Süreli Potansiyasyon (Long Term Potentiation: LTP).....  | 5         |
| 4.3. Hipokampus .....  | 11        |
| 4.3.1. Hipokampus fonksiyonları.....                               | 13        |
| 4.3.2. Sıçan hipokampusünün histolojik özellikleri.....            | 13        |
| 4.4. Hipokampüse Bağlı Hafıza .....                                | 14        |
| 4.5. Fosfatidilinositol-2-kinaz/Protein Kinaz B Sinyal Yolağı..... | 15        |
| 4.6. Fosfataz ve Tensin Homoloğu (PTEN).....                       | 17        |
| 4.7. Notch 1 Homolog (Notch 1) .....                               | 17        |
| 4.8. Matriks Metalloproteinaz (MMP)'ler .....                      | 20        |
| 4.8.1. MMP-9.....  | 21        |
| 4.9. Kannabinoid ve Endokannabinoid .....                          | 21        |
| <b>5. MATERYAL VE METOT.....</b>                                   | <b>30</b> |
| 5.1. Etik İzinler .....  | 30        |
| 5.2. Materyal .....  | 30        |
| 5.2.1. Kullanılan cihazlar .....                                   | 30        |
| 5.2.2. Kullanılan kimyasal maddeler .....                          | 31        |
| 5.2.3. Kullanılan kitler, tamponlar ve çözeltiler .....            | 31        |
| 5.2.3.1. RNA izolasyon kiti .....                                  | 31        |
| 5.2.3.2. Tamamlayıcı DNA (cDNA) sentez kiti.....                   | 32        |

|   |            |
|---|------------|
| 5.2.3.3. RT-qPCR kiti .....   | 32         |
| 5.3. Canlı Memeli Deneklerin Beslenme ve Barındırılması .....                           | 33         |
| 5.4. Farmasötik Preparatların Hazırlanması.....   | 34         |
| 5.5. Deney Grupları.....  | 35         |
| 5.6. Anestezi Altında Deneklerin Sakrifikasyonu.....                                    | 37         |
| 5.6.1. Anestezi ve dekapitasyon.....  | 37         |
| 5.6.2. Cerrahi rezeksiyon ile hipokampal dokuların çıkartılması .....                   | 39         |
| 5.7. Rezeke Edilen Dokuların Moleküler Analizler İçin Hazırlanması .....                | 43         |
| 5.7.1. Dokulardan total RNA izolasyonu:.....  | 44         |
| 5.7.2. cDNA eldesi.....   | 47         |
| 5.7.3. RT-qPCR.....   | 48         |
| 5.7.4. Protein izolasyonu ve miktar tayini .....  | 50         |
| 5.7.5. SDS-PAGE .....   | 51         |
| 5.7.6. İmmünblotlama .....  | 53         |
| 5.8. İstatistiksel Analizler .....  | 54         |
| <b>6. BULGULAR.....</b>   | <b>56</b>  |
| 6.1. RT-qPCR Sonuçları .....  | 56         |
| 6.2. SDS-PAGE Sonrası Western-blot Sonuçları .....                                      | 63         |
| 6.3. Deney ve kontrol gruplarının RQ değerlerine ait karşılaştırmalar.....              | 71         |
| 6.3.1. Gruplar arası MMP-9 değerlerinin karşılaştırılmasına ait bulgular ...            | 71         |
| 6.3.2. Gruplar arası Notch1 değerlerinin karşılaştırılmasına ait bulgular ....          | 73         |
| 6.3.3 Gruplar arası PTEN değerlerinin karşılaştırılmasına ait bulgular.....             | 75         |
| 6.4. Gruplar arası Western-blot değerlerine ait karşılaştırmalar .....                  | 78         |
| 6.4.1. Gruplar arası $\beta$ -Aktin değerlerinin karşılaştırılmasına ait bulgular... 81 |            |
| 6.4.2. Gruplar arası PTEN değerlerinin karşılaştırılmasına ait bulgular..... 84         |            |
| 6.4.3. Gruplar arası MMP-9 değerlerinin karşılaştırılmasına ait bulgular ... 86         |            |
| 6.4.4. Gruplar arası Notch1 değerlerinin karşılaştırılmasına ait bulgular .... 88       |            |
| <b>7. TARTIŞMA.....</b>   | <b>91</b>  |
| <b>8. SONUÇ .....</b>   | <b>104</b> |
| <b>9. KAYNAKLAR .....</b>   | <b>106</b> |
| <b>10. ETİK KURUL ONAYI.....</b>  | <b>121</b> |
| <b>11. ÖZGEÇMİŞ .....</b>   | <b>123</b> |

## KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

- AEA:** N-araşidonil etanolamin / Anandamid
- AG:** Araşidonilgliserol
- Akt:** Protein kinaz B
- AM251:** Kannabinoid reseptör 1 (CBR1) antagonist [Cannabinoid 1 receptor (CB1) antagonist]
- AM630:** 6-iodopravadolın, Kannabinoid reseptör 2 (CBR2) antagonist
- AMPA:**  $\alpha$ -amino-3-hidroksi-5-metil-4-isoksazolpro-pionik asit
- AMPAR:**  $\alpha$ -amino-3-hidroksi-5-metil-4-isoksazolpro-pionik asit reseptörleri
- $\beta$ -DG43:** Beta-distrolikan
- BLA:** Bazolateral amigdala
- CA:** Ammon boynuzu (Cornu ammonis)
- CAMKII:** Kalsiyum kalmodulin bağımlı kinaz 2
- cAMP:** Siklik adenzin mono fosfat
- CB:** Kannabinoid
- CB1R:** Kannabinoid reseptörü-1
- CB2R:** Kannabinoid reseptörü-2
- cMYC:** Protoonkogen transkripsiyon faktörü-c
- DMSO:** Dimetil sülfoksit
- eCB:** Endojen kannabinoid
- ECB:** Endocannabinoid
- EGC:** Epifiz büyüme kıkırdağı
- EK:** Entorhinal korteks
- ERK:** Hücre dışı sinyalle düzenlenen kinazlar (Extracellular signal-regulated kinases)
- ESM:** Ekstraselüler matriks (Extracellular matrix, ECM)
- FAAH:** Yağ asidi amid hidrolaz (Fatty acid amide hydrolase)
- FOXO1:** Çatal başlı kutu proteini O1 (Forkhead box protein O1)
- GABA:** Gama aminobutirik asit
- GPCR55:** G protein kenetli reseptör 55 (G protein-coupled receptor 55)
- GD:** Dentat girus (Gyrus dentatus)
- JNK:** c-Jun N-terminal kinazlar (c-Jun N-terminal kinases)

**LAPS:** Ligand aracılı protein yapısı  
**LPI:** lizofosfatidilinositol  
**LTD:** Uzun süreli depresyon (Long Term Depression)  
**LTP:** Uzun süreli potansiyasyon (Long Term Potentiation)  
**ML193:** (N-[4-[[[(3,4-Dimetil-5-izoksazolil) amino] sulfonil] fenil]-6,8-dimetil-2-(2-piridinil)-4-kuinolinekarboksamid)  
**MMP:** Matriks metalloproteinaz  
**MSS:** Merkezi sinir sistemi  
**mTOR:** Rapamisin protein kompleksinin memeli hedefi  
**NAGly:** N araziidonil glisin (N-arachidonoylglycine)  
**Notch1:** Çentik geni (Notch receptor 1, Notch homolog 1)  
**NMDA:** N-metil-D-aspartik asit  
**NMDAR:** N-metil-D-aspartik asit reseptörü  
**PK1:** 3-fosfoinositid bağımlı protein kinaz 1 (3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1)  
**PEA:** Palmitoletanolamid (palmitoylethanolamide)  
**PI3K:** Fosfotidilinositaz 3 kinaz  
**PKA:** cAMP bağımlı kinaz A, Protein kinaz A  
**PPAR:** Peroksizom proliferatör-aktive edilmiş reseptör  
**PTEN:** Fosfataz ve tensin homologu  
**PVDF:** Polivinilidin diflorid (polyvinylidene difluoride)  
**r:** protein ifadesi kat değişim değeri  
**RQ:** Bağlı miktar (relative quantity)  
**RT-qPCR:** Gerçek zamanlı ters-transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu  
**SDS-PAGE:** Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforez  
**THC:**  $\Delta$  (9) -tetrahidrokannabinol  
**TNF:** Tümör nekroz faktör  
**TRPV1:** Geçici (transient) reseptör potansiyel vanilloid 1



## TABLULAR LİSTESİ

|  |    |
|--|----|
| <b>Tablo 5.2.1.</b> RT-qPCR için gereken bileşenler ve miktarları .....                  | 33 |
| <b>Tablo 5.7.1.</b> Isısal döngü cihazının süre ve sıcaklıkları .....                    | 48 |
| <b>Tablo 5.7.2.</b> RT-qPCR bileşenleri ve miktarları.....                               | 49 |
| <b>Tablo 5.7.3.</b> Çalışılan RT-qPCR koşulları.....                                     | 50 |
| <b>Tablo 6.1.1.</b> Deney gruplarından elde edilen RQ değerleri.....                     | 61 |
| <b>Tablo 6.2.1.</b> Tüm örneklerdeki protein ifadesi kat değişim değeri (r) .....        | 67 |
| <b>Tablo 6.2.2.</b> Araştırma değişkenlerine ait tanımlayıcı istatistikler.....          | 71 |
| <b>Tablo 6.3.1.</b> MMP-9 RQ değerlerine ait tanımlayıcı istatistikler .....             | 72 |
| <b>Tablo 6.3.2.</b> Gruplar arası MMP-9 RQ değerlerinin karşılaştırılması.....           | 72 |
| <b>Tablo 6.3.3.</b> Notch1 RQ değerlerine ait tanımlayıcı istatistikler.....             | 74 |
| <b>Tablo 6.3.4.</b> Gruplar arası Notch1 RQ değerlerinin karşılaştırılması.....          | 74 |
| <b>Tablo 6.3.5.</b> PTEN RQ değerlerine ait tanımlayıcı istatistikler .....              | 76 |
| <b>Tablo 6.3.6.</b> Gruplar arası PTEN RQ değerlerinin karşılaştırılması .....           | 76 |
| <b>Tablo 6.4.1.</b> $\beta$ -Aktin “r” değerlerine ait tanımlayıcı istatistikler.....    | 82 |
| <b>Tablo 6.4.2.</b> Gruplar arası $\beta$ -Aktin “r” değerlerinin karşılaştırılması..... | 82 |
| <b>Tablo 6.4.3.</b> PTEN “r” değerlerine ait tanımlayıcı istatistikler .....             | 84 |
| <b>Tablo 6.4.4.</b> Gruplar arası PTEN “r” değerlerinin karşılaştırılması .....          | 85 |
| <b>Tablo 6.4.5.</b> MMP-9 “r” değerlerine ait tanımlayıcı istatistikler.....             | 87 |
| <b>Tablo 6.4.6.</b> Gruplar arası MMP-9 “r” değerlerinin karşılaştırılması .....         | 87 |
| <b>Tablo 6.4.7.</b> Notch1 “r” değerlerine ait tanımlayıcı istatistikler .....           | 89 |
| <b>Tablo 6.4.8.</b> Gruplar arası Notch1 “r” değerlerinin karşılaştırılması .....        | 89 |

## ŞEKİLLER LİSTESİ

|  |    |
|--|----|
| Şekil 6.1.1. MMP-9 genine ait amplifikasyon eğrisi .....                                 | 57 |
| Şekil 6.1.2. PTEN genine ait amplifikasyon eğrisi .....                                  | 58 |
| Şekil 6.1.3. Notch1 genine ait amplifikasyon eğrisi .....                                | 59 |
| Şekil 6.1.4. $\beta$ -Aktin genine ait amplifikasyon eğrisi .....                        | 60 |
| Şekil 6.2.1. Deneklerin RQ değerlerindeki MMP-9 değişkenine ait histogram .....          | 68 |
| Şekil 6.2.2. Deneklerin RQ değerlerindeki Notch1 değişkenine ait histogram .....         | 69 |
| Şekil 6.2.3. Deneklerin RQ değerlerindeki PTEN değişkenine ait histogram.....            | 70 |
| Şekil 6.3.1. MMP-9 RQ değerlerine ait hata çubuk grafiği .....                           | 73 |
| Şekil 6.3.2. Notch1 RQ değerlerine ait hata çubuk grafiği .....                          | 75 |
| Şekil 6.3.3. PTEN RQ değerlerine ait hata çubuk grafiği.....                             | 77 |
| Şekil 6.4.1. Deneklerin “r” değerlerindeki $\beta$ -Aktin değişkenine ait histogram..... | 78 |
| Şekil 6.4.2. Deneklerin “r” değerlerindeki PTEN değişkenine ait histogram.....           | 79 |
| Şekil 6.4.3. Deneklerin “r” değerlerindeki MMP-9 değişkenine ait histogram.....          | 80 |
| Şekil 6.4.4. Deneklerin “r” değerlerindeki Notch1 değişkenine ait histogram.....         | 81 |
| Şekil 6.4.5. $\beta$ -Aktin “r” değerlerine ait hata çubuk grafiği.....                  | 83 |
| Şekil 6.4.6. PTEN “r” değerlerine ait hata çubuk grafiği .....                           | 86 |
| Şekil 6.4.7. MMP-9 “r” değerlerine ait hata çubuk grafiği.....                           | 88 |
| Şekil 6.4.8. Notch1 “r” değerlerine ait hata çubuk grafiği.....                          | 90 |

## RESİMLER LİSTESİ

|   |    |
|---|----|
| <b>Resim 4.3.1.</b> Wistar Albino cinsi erkek sıçandan rezeke edilen hipokampüs dokusu  | 11 |
| <b>Resim 4.3.2.</b> Rezeke edilen sıçan hipokampal dokusunun bölgesel haritalaması      | 14 |
| <b>Resim 5.3.1.</b> Sıçanların beslendiği pellet yemler                                 | 33 |
| <b>Resim 5.3.2.</b> Deneklere intraperitoneal yoldan enjeksiyonların uygulanması        | 34 |
| <b>Resim 5.5.1.</b> Gruplarına göre sınıflandırılarak ayrılan canlı memeli denekler     | 36 |
| <b>Resim 5.6.1.</b> Canlı memeli deneklerin anestezi altında dekapitasyon işlemi        | 37 |
| <b>Resim 5.6.2.</b> Operasyonun gerçekleştirildiği sırada kullanılan LED ışık cihazı    | 38 |
| <b>Resim 5.6.3.</b> Sıçan gövdesinden kafanın ayrıldıktan sonraki görüntüsü             | 38 |
| <b>Resim 5.6.4.</b> İntrakranial serebral dokunun superiordan görünüşü                  | 40 |
| <b>Resim 5.6.5.</b> Serebral korteks, serebellum, pons ve medullanın superior görüntüsü | 41 |
| <b>Resim 5.6.6.</b> Hipokampüs dokusunun beyinden diseke edilme basamakları             | 42 |
| <b>Resim 5.6.7.</b> Hipokampüs dokuları (A) ve bu dokuların tüplere aktarılması (B)     | 43 |
| <b>Resim 5.7.1.</b> Hipokampal dokuların kurutma kağıdı üzerinde tartılması             | 44 |
| <b>Resim 5.7.2.</b> RNA izolasyonu için dokuların parçalanması                          | 45 |
| <b>Resim 5.7.3.</b> Özel filtreli (Spinkolon) tüplere aktarılan süpernatantlar          | 46 |
| <b>Resim 5.7.4.</b> 50 µl RNA örneklerinin eldesi                                       | 47 |
| <b>Resim 5.7.5.</b> Isısal döngü cihazının süre ve sıcaklıkları                         | 48 |
| <b>Resim 5.7.6.</b> Spektrofotometrik analizler ile örneklerde protein miktar tayini    | 51 |
| <b>Resim 5.7.7.</b> SDS-PAGE için kullanılan jellerin görüntüsü                         | 52 |
| <b>Resim 5.7.8.</b> Kullanılan transfer membrana ait görüntü                            | 53 |
| <b>Resim 5.7.9.</b> WesternBreeze™ kit içeriği  | 54 |
| <b>Resim 6.2.1.</b> MMP-9 proteinine ait Western-blot sonuçları                         | 63 |
| <b>Resim 6.2.2.</b> PTEN proteinine ait Western-blot sonuçları                          | 64 |
| <b>Resim 6.2.3.</b> Notch1 proteinine ait Western-blot sonuçları                        | 65 |
| <b>Resim 6.2.4.</b> β-Aktin proteinine ait Western-blot sonuçları                       | 66 |

## 1. ÖZET

### ANANDAMİD VE ANTAGONİSTLERİNİN MMP-9 İLİŞKİLİ HİPOKAMPÜSE BAĞLI HAFIZA ÜZERİNE SIÇANLARDAKİ ETKİLERİNİN FARMAKOMOLEKÜLER DÜZEYDE İNCELENMESİ

Matriks metalloproteinaz (MMP)-9'un inhibisyonu, özellikle uzun süreli potansiyasyon (LTP) ve hipokampüse bağlı hafızanın kazanılması açısından önemlidir. Bu araştırmada; agonist anandamid (AEA), biarilpirazol grubu kannabinoid (CB) 1 antagonistlerinden AM251, 6-iodopravadolol olarak bilinen ve beyinde yer alan CB2'nin antagonisti olan AM630 ve N-[4-[(3,4-Dimetil-5-izoksazolil)amino]sulfonil]fenil] olarak adlandırılan ve G protein kenetli reseptör 55 (*G protein-coupled receptor 55*; GPCR55)'in, potent ve selektif antagonisti olan ML193'ün uygulandığı sıçanlara ait hipokampal dokularda, MMP-9 seviyesinin değişiminin araştırılması amaçlandı. LTP ve hipokampüse bağlı hafızanın kazanılması açısından önemli olduğu vurgulanan MMP-9 seviyesinin, hangi CB reseptörü (CBR)'nün indüksiyon/inhibisyonu ya da GPCR55'in inhibisyonu ile değişeceği konusunda kapsamlı veri sağlanabilmesi hedeflendi. Denekler 10 gruba (n=5) ayrıldı. Kontrol grupları hariç, agonist ve antagonistler tek başına veya birlikte, intraperitoneal (i.p.) yoldan, günde bir kez, yedi gün boyunca uygulandı. Sekizinci gün sonunda sakrifikasyon işlemi sonrası rezeke edilen tüm hipokampal dokularda, hem MMP-9 protein ve gen ifadesi hem de fosfataz ve tensin homologu (PTEN) ile Notch homolog 1 (Notch1) genine ait protein ve gen ifade düzeyleri incelendi. Veriler istatistiksel olarak değerlendirildi. Kontrol grubunda yer alan deneklere ait hipokampal dokularda gerçekleştirilen analizler sonucunda, gen veya protein ifadesinde anlamlı herhangi bir değişimin olmadığı gözlemlendi. Ancak bazı çalışma gruplarında, istatistiksel olarak anlamlı olan değişimler mevcut idi. Bu veriler ışığında hafıza ile ilişkili hastalıkların tedavisinde CB sistem üzerinden etki göstererek kullanılacak olan ilaçların geliştirilmesi için hipokampal hücrelerde MMP-9 ifadesinin PTEN sinyal yolağı dışında başka sinyal yolları tarafından kontrol ediliyor olabileceği ve bu sinyal yollarının da araştırılması gerektiği kanaatine varılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Anandamid, Hipokampus, Matriks metalloproteinaz, Notch1, PTEN.

## 2. ABSTRACT

### PHARMACOMOLECULAR ASSESMENT OF THE EFFECTS OF ANANDAMIDE AND ITS ANTAGONISTS ON MMP-9 ASSOCIATED HIPPOCAMPAL MEMORY IN RATS

Matrix metalloproteinase (MMP)-9 inhibition is especially essential for long-term potentiation (LTP) maintenance and the acquisition of hippocampus-dependent memory. The present study aimed to investigate the changes in MMP-9 level, in rat hippocampal tissues treated with anandamide (AEA), biarylpyrazole cannabinoid (CB) receptor antagonist AM251, CB2R antagonist 6-iodopravadolin (AM630), and N- [4 - [[(3,4-Dimethyl-5-isoxazolyl) amino] sulfonyl] phenyl] (ML193), a potent and selective antagonist of *G protein-coupled receptor 55* (GPR55). The main aim was to provide comprehensive data on whether GPR55 inhibition and CBR induction and inhibition changed the MMP-9 expression that is significantly involved in the acquisition process of LTP and hippocampus-dependent memory. The subjects were divided into 10 groups (n: 5 per group). The pharmaceuticals were intraperitoneally (i.p.) administered to the subjects, except the control group, once a day for a period of seven days in total. The changes in gene and protein expression levels of MMP-9, phosphatase and tensin homolog (PTEN), and notch receptor 1 (Notch1) were evaluated in the resected rat hippocampal tissues at the end of 8<sup>th</sup> day. The data were analysed statistically. The analyses of the rat hippocampal tissues in the control group revealed no significant changes in the gene and protein expressions. However, statistically, significant changes were observed in some study groups. The obtained results revealed that MMP-9 expression in hippocampal cells may be controlled by other signalling pathways other than PTEN signalling pathway, and these signalling pathways should be investigated to develop drugs acting on the CB system in the treatment of memory-dependent diseases.

**Key Words:** Anandamide, Hippocampus, Matrix metalloproteinase, Notch1, PTEN.

### 3. GİRİŞ VE AMAÇ

Sinaptik plastisite mekanizmalarında; matriks metalloproteinaz (MMP) ailesinin üyeleri de dahil olmak üzere, birçok kompleks proteaz sisteminin aracılık ettiği, proteolitik aktivite rol oynamaktadır. Buna ek olarak MMP'lerin uzun süreli sinaptik plastisite, öğrenme ve hafızada önemli rol oynadığına dair araştırmalar literatürde yerini almıştır (1, 2). Özellikle, MMP-9'un inhibisyonu sayesinde, *Schaffer collateral-ammon boynuzu* (*Cornu ammonis*; CA)1 yolağındaki uzun süreli potansiyasyon (*Long Term Potentiation*; LTP) ve hipokampüse bağlı hafızanın kazanılması açısından kritik öneme sahip olduğu bilinmektedir (3-6).

Son zamanlarda yapılan laboratuvar araştırmaları, LTP indüksiyonu ve ekspresyonunun, presinaptik olduğu yosun (*mossy*) lifi-CA3 (MF-CA3) projeksiyonunda gerçekleştirilen MMP blokajının, LTP'nin sürekliliğini bozduğunu, ayrıca LTP indüksiyonunun, artmış MMP-9 ifadesi ile ilişkili olduğunu ortaya koymuştur (3).

Bilindiği üzere N-araşidonil etanolamine olarak bilinen anandamid (AEA), beyinde araşidonik asitten üretilen bir kannabinoid (CB) nörotransmitterdir. AEA hem merkezi hem de periferal sinir sisteminde bulunabilmektedir. Merkezi sinir sistemi (MSS)'nde CB reseptörü 1 (CB1R), periferal sinir sisteminde ise CB reseptörü 2 (CB2R) olarak adlandırılan reseptörler aracılığı ile işlev görmektedirler (7). AM251; biarilpirazol grubu CB1R antagonistlerinden olup, 6-Iodopravadoline (AM630) beyinde yer alan CB2R'nin ve (N-[4-[[[(3,4-Dimetil-5-izoksazolil) amino] sulfonil] fenil]-6,8-dimetil-2-(2-piridinil)-4-kuinolinekarboksamid) (ML193) ise G protein kenetli reseptör 55 (*G protein-coupled receptor 55*; GPCR55)'nin potent ve selektif antagonistleridir (8, 9).

Literatürde yer alan kanıt değeri yüksek araştırmalar incelendiğinde; CB'lerin hipokampüse bağlı bellek fonksiyonu ile ilişkili olduğunu raporlamakla birlikte (10), CB1R agonistleri, bilişi (kognisyonu) bozmakta ve sinaptik iletimin uzun vadeli potansiyasyonunu yani LTP'yi önlemektedir. Ancak, "hipokampal LTP üzerindeki endojen olarak oluşturulan CB'lerin (eCB) etkisi belirsiz kalmaktadır" şeklinde çıkarımda bulunan araştırmaya da rastlanmaktadır (11).

Bununla birlikte literatürde agonist olan AEA ve antagonistleri olan, AM251, AM630 ve ML193'ün moleküler düzeyde birlikte değerlendirildiği herhangi bir araştırmaya rastlanmamıştır.

Bu araştırmada, AEA, AM251, AM630 ve ML193 uygulanan sıçanlarda MMP-9 protein ve gen ifadesine ek olarak PTEN ve Notch1'e ait protein ve gen ifade düzeylerindeki değişimin karşılaştırılması amaçlandı. Bu sayede, LTP ve hipokampüse bağlı hafızanın kazanılması açısından önemli olduğu vurgulanan MMP-9 aktivitesinin; hangi CBR'nin indüksiyon ya da inhibisyonu ile değiştiği, ayrıca GPCR55 inhibisyonunun MMP-9 aktivitesi ile ilişkili olup olmadığı soruları netlik kazanabilecektir.



## 4. GENEL BİLGİLER

### 4.1. Hafıza

Geçmişte yaşanan ve bilgileri akılda tutarak hatırlatmaya yarayan güce bellek ya da hafıza denilmektedir (12). İnsanlar hafızaları ile dil, kültür ve bilimi geliştirebilmiş ve de geliştirmeye devam etmektedir (12). Hafıza sayesinde öğrenilen bilgiler depolanabilmekte ve gerektiğinde kullanılmasına olanak sağlanabilmektedir (12).

Hafıza basit bir şekilde, “kısa”, “orta uzun” ve “uzun süreli” olmak üzere, üçe ayrılabilir (13). Duyumlarla elde edilen bilgiler ilk etapta kısa süreli hafıza olarak adlandırılan hafızada filtre edilmektedir (14). Bu hafıza; önceki bilgileri ve/veya ilgilenilen bir konuyu içermiyor ise yaklaşık otuz saniye gibi bir sürede ortadan kalkar (14). İkincisi ise orta uzun süreli hafıza olarak adlandırılmakta ve kısa süreli hafızadan gelen bilgilerin, yaklaşık olarak 20 dakika süre zarfında tutulabildiği hafıza bölümü olup, bu süre bazen haftalarca, hafızanın bu bölümünde saklanabilmektedir (14). Üçüncüsü ise bilgilerin devamlı olarak kalabildiği hafıza, LTP olarak adlandırılmaktadır (14).

Elektriksel olarak iletilen uyarıcılar, kimyasal bir değişime uğradıktan sonra LTP'ye kaydedilmektedir (15). LTP'ye aktarılan bilgiler, günler, aylar veya yıllar boyu saklanabilen bilgilerdendir (16).

### 4.2. Uzun Süreli Potansiyasyon (Long Term Potentiation: LTP)

Uzun süreli potansiyel artışı anlamına da gelen LTP, bir sinir hücresi iletim mekanizmasıdır (17). Bu mekanizmada, iki sinir hücresi arasındaki iletişim ve bağlantı bölgesi olan sinapslar aracılığı ile işlem gerçekleştirilmektedir (18).

Bir sinir hücresinin, diğer bir sinir hücresi veya hedef organ ile bağlantı noktalarına sinaps adı verilmektedir. Sinapslar, “nöronlar”, “nöronlar ile bunların etkileşimde bulunduğu reseptörler” ve/veya “nöronlar ile efektör organlar” arasında olmak üzere üç farklı bölgede bulunmaktadır (19).



Sinyaller bu sinapslar aracılığıyla iletilmektedir. Pre-sinaptik sinir hücresi arda, tekrar tekrar uyarılır ise belli bir zaman süreci sonunda, postsinaptik bölgede uzun süreli bir etki oluşmaktadır (20, 21). Bunu sağlayan mekanizmaya LTP denilmektedir (22).

İlk önce *aplysia* adlı ilkel bir canlı cinsinde keşfedilen LTP'nin, memeli hayvanların sinir sistemi içerisinde, özellikle hipokampüste yer aldığı bulunmuştur (23, 24). LTP'nin, öğrenme ve hafıza süreçlerinde, hücrel olarak görev aldığı, hipokampüsün, hafıza işlemeden sorumlu olan en önemli beyin merkezlerinden birisi olduğu bildirilmektedir (25-28).

Kalıcı öğrenmenin gerçekleşebilmesi için insan beyninde gerçekleşmesi gereken, uzun süreli güçlendirme olarak da bilinen bu süreçte; pre-sinaptik nöronun uyarılmasıyla birlikte sinaptik boşluğa salınan nörotransmitterlerin, post-sinaptik nörondaki, belirli reseptörlere bağlanması sonucunda sodyum ve kalsiyum gibi iyonların içeri girebilmeleri için kanallar açılmaktadır (29). Daha sonra, pre-sinaptik nörondan ne kadar çok uyarı gelirse, post-sinaptik nöronda o kadar çok kanal açılabilen ve bir o kadar fazla iyon içeri girebilmektedir (30). Bu durum sinaps şiddetinin artması olarak tanımlanmaktadır (30). Uzun süreli olarak sinaps şiddetinin artması, LTP sürecinin gerçekleşmesine ve post-sinaptik bölgede kalsiyum iyonlarının artması sonucu aktive olan kalsiyum kinazın kalıcı morfolojik değişikliklere yol açmasına neden olmaktadır. Bu mekanizma sayesinde kalıcı öğrenme gerçekleşmiş olur (30).

LTP ve uzun süreli depresyon (LTD), spesifik sinaptik aktivite paternleri ile indüklenen sinaptik güçte merkez, sinir sisteminde bilgi depolama hücrel modelleri olarak, çok fazla dikkat çeken değişimlerdir. Omurilikten serebral kortekse kadar pek çok beyin bölgesinde ve omurgasızlardan insanlara kadar pek çok canlı türünde gerçekleştirilen çalışmalar, LTP ve LTD'nin çeşitli indüksiyon protokollerine yanıt olacak etkinlikte, kalıcı değişikliklere uğrayacak kimyasal sinapslar için, güvenilir bir kapasite göstermiştir (31).

Fizyolojik ilgisine ek olarak, LTP ve LTD önemli klinik uygulamalara sahip olabilmektedir. Bu süreçlerin altında yatan moleküler mekanizmalara ilişkin artan fikirler ve beyin aktivitesinin invaziv olmayan manipülasyonunda sağlanan teknolojik

ilerlemeler sayesinde araştırmacılar; insan sinir sisteminde, sinaptik gücü manipüle etmek için, LTP, LTD ve diğer sinaptik, hücrenel veya devre plastisite biçimlerinden yararlanma eşiğine gelmiştir (31).

Patolojik sinaptik durumları ortadan kaldırmak ve/veya tedavi etmek için ilaçlar kullanılmakta, invazif olmayan uyarıcı aygıtlar ile bozulmuş sinaptik dürtüden kaynaklanan durumları iyileştirmeye çalışılmakta ve bunları gerçekleştirmek için suni sinaptik plastisite indüklemesi araştırılmaktadır (31). Bu araştırılan yaklaşımların; nöropatik ağrı, epilepsi, depresyon, ambliyopi, tinnitus ve inme gibi çeşitli nörolojik rahatsızlıkların tedavisi için umut vaat edeceği literatürde bildirilmektedir (32-34).

2011 yılında Bliss ve Cooke (35) çalışmalarında; LTP'nin, sinaptik iletimin kalıcı olarak artmasına neden olan aktivite-bağımlı plastisitenin bir formudur açıklamasını yapmışlardır. LTP'nin, 1970'lerin başlarındaki keşfinden bu yana, nörobilimcilerde büyük bir hayranlık kaynağı olduğunu belirttikleri araştırmalarında, bu hayranlığın nedeni olarak, Donald Hebb'in '*Davranış Örgütü*' adlı kitabında, sinaptik bir bellek mekanizması için önerdiği kriterlerin olduğunu bildirmişlerdir (35).

Özellikle, LTP'nin uzun ömürlü olduğunu, değişikliklerin diğer sinapsları etkilemeden, bir hücre üzerindeki sinapsların bir bölümünde indüklenebileceğini vurgulamışlardır. Sinaptik iletimin etkinliğinin azaldığı, LTD'nin tamamlayıcı sürecinin ise bu özellikleri paylaştığını ve aynı zamanda anımsatıcı bir süreç olarak çok dikkat çektiğinin önemini raporlamışlardır (35). Çoğu nörobilimcinin inandığı gibi, LTP ve LTD'nin, öğrenme ve bellek altında yatan gerçek sinaptik süreçler olup olmadığının ise henüz kesin olarak aydınlatılmadığına dikkat çektikleri çalışmalarında (35); moleküler düzeyde, LTP / LTD ve diğer birçok bellek biçiminin, benzer moleküler mekanizmalara dayandığının belirgin olduğunu ifade etmişlerdir.

Ayrıca, sinaptik mukavemetteki LTP ve LTD benzeri değişikliklerin, beyindeki çeşitli sinaps kümelerinde bir bellek oluşturacak şekilde gerçekleştiği ve bu değişikliklerin LTP'nin yapay indüksiyonunu tı kayabildiği ve bu durumun da daha önceki LTP indüksiyonu ile kapatılabileceği bildirilmiştir (35).

Dahası bu araştırmada; LTP ve LTD'nin insan hafızasına uygunluğu konusundaki tartışmaların, bu süreçlerden, önceki deneyimler olmaksızın bir belleğin oluşumunu taklit edebilmek konusunda yararlanana kadar devam edeceği de

vurgulanmaktadır (35). Tüm bunlara ek olarak araştırmalarında; LTP ve LTD, modern nörobilim alanında bir başka önemli role sahip olduğunu ve bu önemin, insan MSS'nde oluşan hastalıkların tedavisinde kullanılabileceği olasılığına da yer vermişlerdir (35).

Çocukluk çağında duyuusal yoksunluk, beyin hasarı veya hastalığa bağlı olarak gelişen kayıplar veya aşırı sinaptik tahribattan dolayı çeşitli nörolojik durumların ortaya çıkabildiğini ve gelişmekte olan çeşitli teknolojiler kullanılarak sinaptik mukavemetin manipölasyonu, sinaptik mukavemetin normalleştirilmesi ve böylece MSS'nin plastisite ile ilişkili bozukluklarının iyileştirilmesi için bir araç sağlayabileceğini dile getirmişlerdir. LTP, LTD ve ilgili sinaptik plastisite formlarının klinik uygulamalarını ve insan MSS'ndeki sinaptik mukavemet değişikliklerinin ortaya çıkmasını ve indüksiyonunu sağlayan teknolojileri tartışmışlardır (35). Bunun için; anestezi uygulanmış tavşanların hipokampus dokularında, medial perforan yol ve dentat girus (gyrus dentatus; GD)'un granül hücreleri arasındaki sinapslarda *in-vivo* deney düzeneğine sahip araştırmayı gerçekeştirmişlerdir. LTP, afferent yolunda kısa süreli yüksek frekanslı bir hareket potansiyeli zinciri oluşturmak için uyarıcı bir elektrot kullanarak, indüklemeyi ve eř zamanlı olarak da pre-apoptik ve post-apoptik depolarizasyon sağlamışlardır. Aktive edilmiş granül hücreleri popölasyonunda uyarılan sinaptik yanıt kayıtlarının, tetanik stimölasyonu takiben, sinaptik mukavemetin kalıcı bir şekilde arttığını ortaya çıkardığından bahsetmişlerdir (35).

Daha sonra çalışmalarını, tavşanların dışında, deney düzeneğine ekledikleri fareleri de test ederek ileri bir düzeye taşımışlardır; LTP, LTD ve MSS boyunca gerçekeştirdikleri incelemelerde, en yaygın olarak, kemirgen transvers hipokampal dilimin, CA1 bölgesindeki, *Schaffer* kollateral-piramidal hücre sinapslarında gerçekeştirdiklerini bildirmişlerdir. Bu sayede, membran potansiyeli üzerinde deneysel kontrolün sağlanabildiği, post-sinaptik depolarizasyon ile transmitter salınımına neden olan tek pre-sinaptik uyarıların, tekrarlı eşleşmesinin, yüksek frekanslı stimölasyon gereksinimini atlayarak, LTP'yi indüklemek için yeterli olduğu ispatlanan avantajlı bir düzeneğin kullanıldığının altı çizilmektedir (35).

Sinaptik depolama mekanizmalarının birliği, insan belleğinin ilişkisel doğasını yansıtılabilmekte, uzun ömürlürlük, girdi-özgüllük ve birlikteliğin bu üç özelliğinin, sadece etkin bir bellek mekanizmasının tahmin ettiği kriterleri yerine getirdiği için değil, LTP ve LTD'nin altında yatan moleküler mekanizmalara dair ipuçlarını da sağladığı için önemli olduğu kaydedilmiştir (35). Daha da önemlisi araştırmalarında; LTP ve LTD'nin çeşitli aşamaları üzerindeki etkilerini incelemek için farmakolojik ajanların hızlı uygulanmasına ve çıkarılmasına olanak sağlama avantajına sahip olduğunu ve bu mekanizmalara sinaptik arıza halinde, potansiyel olarak başvurulabileceğini vurgulamışlardır (35). LTP ve LTD'nin indüksiyonu, ekspresyonu ve düzenlenmesi için geniş bir reseptör, enzim ve diğer hücre içi sinyalleme moleküllerinin katılımını test etmişlerdir. Bu sayede, anahtar proteinleri ortaya çıkarmak veya eksprese olan proteinlerin, farelerde genetik manipölasyonlarla birleştirildiğinde, sinaptik plastisitenin, moleküler temellerinin geniş bir karakterizasyonuna olanak sağlanabileceğini belirtmişlerdir (35). LTP'nin eř zamanlı pre-apoptik ve post-apoptik depolarizasyona yakın olmasının gerekliliği, bir tespit mekanizmasının dahil olduğunu göstermektedir yorumunu getirmişlerdir (35).

Tesadüfen buldukları bu tespit mekanizmasının, kalsiyum ve diğer katyonların nüfuz etmesine olanak sağlayan, glutamat reseptörünün voltaj bağımlı bir alt tipi olan N-metil-D-aspartik asit (NMDA) reseptörü (NMDAR) aracılığıyla gerçekleştirildiğini raporlamışlardır (35).

Nörotransmitterlerin, pre-sinaptik terminalden glutamat salınmasından sonra bağlandığını ve post-sinaptik membran, yakın dinlenme membran potansiyellerinde, NMDAR'ların iyon kanallarını bloke eden  $Mg^{2+}$  iyonlarının tahliyesini sağlamak için yeterince depolarize edildiğini belirtmişlerdir. NMDAR'ın, D-2-amino-5-fosfonopentanoat, propil-piperidin veya 5-Metil-10,11-dihidro-5H-dibenzo [a,d] siklohepten-5,10-imin maleat (MK801; *dizolcipine*) gibi seçici antagonistler ile bloke edilmesinin, LTP'nin indüksiyonunu engelleyeceğini, ancak bunun sürdürülebilirliğinin olmadığını da aynı çalışmada raporlamışlardır (35). CA1 piramidal hücre popölasyonunda NMDAR ekspresyonunu önleyen genetik manipölasyonun, LTP'nin indüksiyonunu ve hipokampüse bağlı hafızanın çeşitli formlarının ekspresyonunu da önleyeceği çıkarımında buldukları bu çalışmada, ilginç bir şekilde bu antagonizmanın, aynı zamanda, iki plastisite biçiminin ortak bir

NMDAR bağımlı indüksiyon mekanizmasını paylaştığını gösteren, hipokampal LTD indüksiyonunu da engelleyeceği sonucuna varmışlardır (35).

Tüm bunlara ek olarak, NMDAR içerisinde kalsiyum akışının hem LTP hem de LTD'nin indüksiyonunun merkezinde yer aldığını, çünkü 1,2-bis-(O-aminofenoksi)etan-N,N,N',N'-tetraasetik asit, tetraasetoksimetil ester veya etilen glikol tetraasetik asit gibi kalsiyum şelatörlerin hücre içi uygulamasının, plastisitenin indüksiyonunu önlediği yorumunu eklemişlerdir. Dahası, kalsiyumun serbest bırakılmasının, kalsiyum konsantrasyonuna bağlı olarak bir LTP veya LTD formunu indükleyebileceğini ve her iki etkinin de elektriksel olarak indüklenmiş plastisite tarafından tıkanabileceğini dile getirmişlerdir (35). Bu mekanizmaların hipokampal LTP / LTD için kanonik indüksiyon mekanizmaları olduğunu bildirdikleri çalışmada, bu sinapslarda ve MSS boyunca, NMDAR'a dayanmayan, özellikle de metabotropik glutamat reseptörünün aktivasyonu ile indüklenen LTD'nin diğer formları olan LTP / LTD'nin geniş bir yelpazesinin, var olduğunun netliği üzerine dikkatleri çekmişlerdir (35).

Ayrıca, LTP veya LTD'e yol açan indüksiyon protokollerinin MSS'nin farklı bölümlerinde değişebileceğini; hipokampüste LTP'ye yol açacak pre- ve post-apoptik depolarizasyonun eşleşmesinin, serebellar kortekste, paralel fiber-Purkinje hücre sinapslarında LTD ile sonuçlanabileceğini vurgulamışlardır. Purkinje hücrelerinin gama aminobutirik asit (GABA)erjik olduğunu ve bu nedenle hedefleri üzerinde önleyici bir etkiye sahip olduklarından dolayı, LTD'nin böylesi bir durumda eksitatör ana hücrelerde, LTP'ye benzer bir net etkisinin olduğunu raporlamışlardır.

Özetle LTP/LTD indüksiyonu ve ekspresyonu arasındaki arayüzde çok çeşitli kalsiyum tespit mekanizmalarının yer aldığı bildirilen çalışmada (35), siklik AMP (cAMP) - bağımlı kinaz (PKA) ve kalsiyum kalmodulin bağımlı kinaz 2 (CaMKII) gibi enzimlerin aktivasyonunun, hipokampüsün CA1 alanındaki kanonik NMDAR bağımlı LTP formunun uyarılması için gerekli olduğu bildirilmektedir.

Bahsi geçen her iki kinazın, doğrudan veya dolaylı olarak kalsiyum seviyesindeki yükselmeleri tespit ederek, sinaptik etkinliği arttıracak şekilde işlevlerini değiştirerek, özellikle  $\alpha$ -amino-3-hidroksi-5-metil-4-isoksazolpro-pionik

asit (AMPA) reseptörleri (AMPAR)'nin, LTP'nin ekspresyonuna dahil olan proteinleri fosforile ettiğinin altını çizmişlerdir (35).

### 4.3. Hipokampüs

Hipokampüsün (Resim 4.3.1.), beyindeki yerleşimi temporal lobun derinlerinde lateral ventrikül ile bazal ganglionun komşuluğundadır.



**Resim 4.3.1.** Wistar Albino cinsi erkek sıçandan rezeke edilen hipokampüs dokusu

Hipokampüs koronal kesitlerinde denizatına benzemesi nedeni ile, 1500'lü yılların sonuna doğru anatomist *Arantius* tarafından, Latince bu anlama gelen '*Hippocampus*' (*hippos*=at, *kamos* =deniz canavarı) olarak adlandırılmıştır (36, 37). Bundan yaklaşık iki yüzyıl sonra Mısırlı anatomistler tarafından '*Ammon's horn*' ya da koç boynuzu anlamına gelen '*Cornu ammonis (CA)*' olarak tekrar isimlendirme yapılmıştır (36, 37).

Hipokampüs; prefrontal korteks, septum amigdala, hipotalamusun paraventriküler çekirdeği, *gyrus cinguli* gibi yapılarla limbik halkayı oluşturur.

Histolojik olarak hipokampus üç bölüme ayrılmaktadır ve bu üç bölümün tamamına hipokampal formasyon adı verilmektedir. İlk bölüm CA esas hipokampus (*hippocampus proper*) diğer bölümler ise GD ve subikulumdur. CA ve GD fonksiyonel bakımdan en önemli bölgeleridir. CA, içerdiği hücre farklılıklarından dolayı CA1, CA2, CA3 ve CA4 olmak üzere dört alt bölgeye ayrılır. Bu adlandırma ilk defa 1934 yılında *Lorente de No* tarafından yapılmıştır (38).

Bu alanlardan subikuluma en yakın olanı CA1, GD'ye en yakın olanı ise CA3'tür. GD'nin bir parçası veya hilusu olarak adlandırılan CA4 alanı ise, CA3 alanı ile GD arasında bulunmaktadır (39, 40).

Fakat bu alan, içerdiği hücre yapısı ve bağlantı lifleri açısından CA3'ten farklı olmadığı için modern sınıflandırmadan çıkarılmıştır (39, 40). CA3 alanında bulunan hücrelerin en önemli özelliği, GD'nin granüler hücrelerinden gelen yosun liflerini almasıdır. Buradaki piramidal hücrelerin boyutu diğer alanlardaki hücelere göre daha büyüktür. Piramidal hücrelerin en yoğun olduğu alan ise CA2 alanıdır ve bu alanda yosun liflerinin kaybolduğu görülür. Supramamillar bölge ve hipotalamustan CA2 alanına yoğun lifler gelir (41).

Hipokampusün en karmaşık bölgesi CA1 alanıdır. Büyüklükleri birbirinden farklı piramidal hücrelerin bulunduğu bu alandaki nöronların %10'unu internöronlar oluşturur. Hipokampüste piramidal hücreler tüm CA boyunca yayılmışken, granüler hücreler daha çok GD'de lokalize olmuştur (42).

İnsan hipokampusü, primat hipokampusü ve sıçan hipokampusü nöronal organizasyon ve fonksiyonları açısından benzerlik gösterebilir de morfolojik olarak aralarında bazı farklılıklar bulunmaktadır (43).

İnsan ve primat hipokampal formasyonları serebral korteksin baskısıyla temporal lob içine gömülü, lineer ve transvers bir pozisyona sahipken, sıçanlardaki hipokampal formasyon orta hatta yakın çekirdeklerden başlayıp talamusun üzerinden temporal loba kadar uzanmakta ve "C" şeklinde vertikal bir duruş sergilemektedir (43).

Günümüzde nöronların rejeneratif/reperatif yeteneği ile yeni nöronların oluşması olarak tanımlanabilecek nörogenezisin, erişkin dönemde de devam ettiği

bilinmektedir. Nörogenezle ilişkili önemli beyin bölgeleri, hipokampus ve *bulbus olfactorius*'dur (44).

Bilindiği üzere MSS, gerek iç çevreden gerekse dış çevreden gelen uyarılara yanıt verme ve uyum sağlayabilme yeteneğine sahiptir. Nöroplastisite, içten ve dıştan gelen uyarılara karşı nöronların ve bunların oluşturmuş oldukları sinaplara ait özelliklerin değişimidir. Nöroplastisite ile gerçekleşen değişikliklere örnek olarak; dendritlerde meydana gelen değişiklikler sonrasında, nörogenezis ve nörotrofik faktörlerin etkinliğinde değişimler sayılabilir (45).

Hipokampus nöroplastisite açısından en önemli beyin bölgesidir. Kortikal ve subkortikal bölgelere giden ve bu bölgelerden gelen yolaklar oldukça yoğundur. Hipokampusun limbik sistemin amigdala başta olmak üzere duygudurum düzenlenmesinde rol oynayan diğer bölgeleri ile sıkı bir iletişim halinde olması da nöroplastisite yönünden çok önemlidir (45).

#### **4.3.1. Hipokampus fonksiyonları**

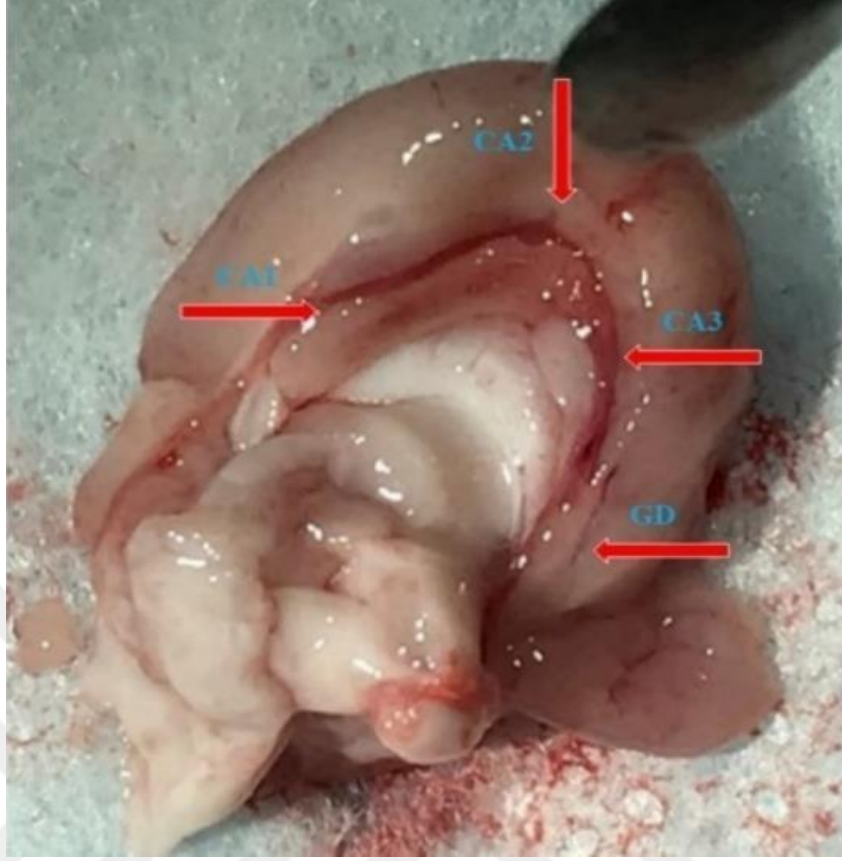
Hipokampus özellikle öğrenme ve bellek ile ilişkili fizyolojik olayların oluşmasında önemli bir role sahiptir. Hipokampusun amigdala, orbitofrontal korteks ve ön singulat korteksle beraber oluşturduğu ağ bellek oluşumunda rol almaktadır (46).

#### **4.3.2. Sıçan hipokampusunun histolojik özellikleri**

Sıçan hipokampusunda esas olarak granül ve piramidal hücreler bulunur (47). Sıçanlarda, hipokampal piramidal hücrelerin çoğu prenatal dönemde ortaya çıkar ve postnatal birinci ayda hipokampus tam anlamıyla fonksiyonel haldedir (48, 49). Sıçanlar da dahil olmak üzere memeli hipokampusunun subikulum, GD ve entorhinal korteks (EK)'den meydana geldiği tanımlanmıştır (50-52).

Sıçanlarda da hipokampus CA1, CA2, CA3 ve GD olmak üzere dört ayrı bölgeye (Resim 4.3.2.) ayrılmıştır (53).





**Resim 4.3.2.** Rezeke edilen sıçan hipokampal dokusunun bölgesel haritalaması

#### **4.4. Hipokampüse Bağlı Hafıza**

Normal koşullarda erişkin memeli beyinde; hipokampus içerisinde, GD'nin subgranüler bölgesi ile lateral ventriküllerin subventriküler bölgesinde nöron üretimi gerçekleşmektedir (54). Bu bölgelerden özellikle hipokampüsün en önemli özelliği, öğrenme ve hafıza fonksiyonlarına katkı sağlayan kritik bölge olmasıdır. Bu yüzden, nörodejeneratif hastalıklara karşı koruyucu ve/veya tedavi edici yöntemlerin araştırıldığı çalışmalarda, hipokampal hafıza ile ilgili mekanizma ve bunu etkileyen faktörlerin araştırılması hız kazanmış durumdadır (55).

Epizodik ve spasyal hafıza oluşumunda çok önemli bir yapı olan hipokampüsün (56), öğrenme ve hafıza oluşumunun hücresel ve moleküler mekanizmaların açıklamasında, hipokampüste oluşan LTP de yer almaktadır (55).

Literatürde LTP ile ilgili giderek artan sayıda çalışma, öğrenme sürecinde LTP'nin sinaptik bağlantıları güçlendirmenin yanı sıra hipokampüsteki yeni nöronların oluşumunu da teşvik ettiğini raporlamıştır (55). Tüm bunlara ek olarak, LTP'nin, yeni üretilen nöronların hipokampüste sinaptik plastisiteyi artırdığına yönelik bilgilerin yer aldığı çalışmalar da literatürde yerini almıştır (57, 58).

Bu araştırmalar içerisinde nöral progenitor hücreleri etkileyebilen; büyüme faktörleri, sitokinler, kemokinler, nörotrofinler, steroidler, MMP'ler gibi ekstrinsek faktörlerin yanı sıra transkripsiyon faktörleri ve sinyal ileti yollarının düzenleyicileri gibi hücre içi intrinsek faktörler de bildirilmektedir (55, 59-61).

Nöral bilginin işlenmesinde hipokampüsün her bir bölgesinin ve bölgeler arası bağlantıların rol oynadığı bilinmektedir. Hipokampal ağın omurgasını EK, DG, CA3 ve CA1 arasındaki bağlantıları içeren trisinaptik devre oluşturur (55, 62). DG, hipokampüste anahtar konumdadır. Kortikal girdiler hipokampüse DG'den girer EK'den gelen uyarılar glutamaterjik eksitator sinaptik bağlantılarla DG granüler hücreleri dendritlerine yayılır ve bu yolağa perforan yol denilmektedir (55, 62).

Trisinaptik halkanın ikinci yolu DG'nin CA3 ile yaptığı sinaptik bağlantıdır. DG granüler hücrelerinin aksonları, CA3'teki piramidal hücrelerle yosun lifler aracılığıyla seyrek fakat güçlü bağlantılar yapar. CA3 piramidal nöronlarından *Schaffer* kollateralleri ile CA1 piramidal nöronlarının dendritlerine yayılım ile trisinaptik yol tamamlanır (55, 62).

Yaşa bağlı kognitif fonksiyonları etkileyen nörodejeneratif hastalıkların patogeneğinde hipokampüs fonksiyon bozukluğunun yattığı ileri sürülmektedir. Dolayısıyla hipokampüste üretilen yeni nöronların hipokampüs fiziolojisi ve patolojisindeki rolünü araştırmak oldukça önemlidir (55, 59-62).

#### **4.5. Fosfatidilinositol-2-kinaz/Protein Kinaz B Sinyal Yolu**

PI3K/Akt sinyal yolu, hücre sağkalımı, çoğalması, farklılaşması, endositoz ve vezikül trafiği, metabolizması ve konakçı enflamatuvar tepkileri gibi çeşitli konak hücre sinyal transdüksiyonlarının ana düzenleyicilerinden biridir.

Nakayama ve ark.'ları (63); Akt'ın, Thr-308'de PDK1 ile fosforile edildiğini ve Ser-473'te rapamisin memeli hedefi (mTOR) kompleks 2'nin memeli hedefi ile tamamen aktive olduğunu belirttikleri çalışmalarında; aktif Akt, çeşitli hücrel uyaranlarla regülasyonu hücre sinyalleşmesinde merkezi bir düğüm noktasıdır açıklamasını dile getirmişlerdir.

Ayrıca, substratları ve downregüle olan Bad moleküllerini, kaspaz-9, glikojen sentaz kinaz 3 (GSK3)  $\alpha / \beta$ , mTOR çatalbaşı kutusu proteini O1 (FOXO1) faktörlerini modüle etmekle birlikte, Akt aktivitesinin bozulması, tip 2 diyabet ve kanser dahil olmak üzere çeşitli hastalıkların patofizyolojik nedenleri arasındadır, çıkarımında bulunmuşlardır (63).

PI3K/Akt sinyalleşme kaskadı, klasik olarak hücre sağkalımını teşvik etmede rol oynamaktadır. Ancak daha yakın zamanda, farklı hücrel işlevleri düzenlediği de gösterilmiştir. Özellikle, çalışmalar PI3K'nın sinaptik plastisite ve hafıza işlemleriyle ilişkili mekanizmalara katkıda bulunduğunu, ancak bu kaskadın uzun vadeli güçlenme gibi sinaptik plastisite formlarında işlevinin tartışmaya devam ettiğini ve bu etkilere aracılık eden PI3K substratlarının işlevinin zayıf şekilde anlaşıldığını göstermiştir. PI3K/Akt yolunun aktivasyonunun, FOXO1 proteini ailesinden olan FOXO1 transkripsiyon faktörü –FKHR- yoluyla hücre sağkalımını ve mTOR yoluyla protein sentezini teşvik ederek sinaptik plastisite ve hafıza konsolidasyon mekanizmalarına katkıda bulunabileceğini göstermektedir (64). Kanser biyologları tarafından yapılan araştırmalara paralel olarak diğer alanlardaki araştırmalarda, normal hücre fonksiyonunda ve hastalıkta PI3K katalitik ve düzenleyici alt birimler için heyecan verici ve genellikle öngörülemez rollerini ortaya çıkarmıştır (65).

Cho ve ark.'ları 2018 yılında (66), PI3/AKT aktivasyonunun kısa süreli hafızayı iyileştirdiğini göstermişlerdir. Ardından 2019 yılında; nöronal hasarın hafifletilebilmesi ve Alzheimer hastalığında hipokampus dokularında astrositlerin aktivasyonunun sağlanmasının, PI3K/Akt sinyal yolunu inhibe etmek sureti ile sağlanacağından da literatürde bahsedilmektedir (67).

Li ve ark.'ları (68); progresif hafıza kaybı, bilişsel bozulma ve davranış bozuklukları ile birlikte ilerleyici bir nörodejeneratif hastalık olan Alzheimer hastalığında, ginsengin nöroprotektif etkisinin altında yatan mekanizmayı anlamak

için PI3K / Akt sinyal yolu ile ilişkisini araştırmayı amaçlamışlardır. Bunun için hipokampüsteki PI3K, Akt, fosforlanmış Akt (p-Akt), p53 adlı tümör baskılayıcı proteinin kofaktörü olma işlevine sahip, insanda bulunan ve p53 aracılığı ile indüklendikten sonra, bulunduğu hücrenin apoptoza gidişini hızlandıran Bcl-2 veya Bax proteinlerinin mRNA'larının ve proteinlerinin ifadesini, gerçek zamanlı kantitatif ters-transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-qPCR) ve Western-blot yöntemi ile tespit etmişlerdir. Ginsengin, Alzheimer hastalığı olan sıçanlarda, hafıza kabiliyetini önemli ölçüde arttırdığını ve hipokampüste PI3K / Akt sinyal yolu aktivasyonuna aracılık ettiğini bildirmişlerdir (68).

#### **4.6. Fosfataz ve Tensin Homoloğu (PTEN)**

PI3K, PTEN tarafından, fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfat (PIP3)'e defosforile edilerek, negatif yönde kontrol edilmektedir. Aktive olmuş PI3K, fosfatidilinositol 4,5-bifosfat (PIP2)'i fosforile ederek PIP3'ü meydana getirir. Bu reaksiyon PTEN fosfatazı tarafından regüle edilmektedir. Akt fosforilasyonundaki artış, PTEN geninde mutasyon olduğunda da gözlenir. PTEN, pek çok protein üzerinde etkisi olan çift yönlü fosfataz enzimi olmakla birlikte, hücre için asıl işlevi PI3K'ın negatif düzenleyicisi gibi çalışarak, PIP3'ün PIP2'e defosforilasyonunu gerçekleştirmektir (69, 70).

1998 yılından itibaren bilinmektedir ki; PTEN kaybı, Akt aktivitesinin artışıyla doğrudan ilgilidir (71).

#### **4.7. Notch 1 Homolog (Notch 1)**

Hücre kaderini düzenleyen bir yolak olan Notch sinyal yolu, çoğu çok hücreli organizmada mevcut olan yüksek oranda korunmuş bir hücre sinyal sistemidir. Memeliler Notch1, Notch2, Notch3 ve Notch4 olarak adlandırılan dört farklı Notch reseptörüne sahiptir. Notch reseptörü, tek geçişli bir transmembran reseptör proteinidir (72). Gelişim döneminde hücre kaderinin belirlenmesinde rol oynayan mekanizmaya sahip Notch sinyal yolağı, Notch reseptörü boyunca, komşu olan hücrelerin birbirleri arasındaki sinyal alışverişini sağlamaktadır. Notch aktivitesi organ oluşumu ve morfogenezde rol oynayarak farklılaşma, çoğalma ve apoptozu etkilemektedir (72).

Son alışmalar ile Notch sinyalinin hücre farklılaşması, proliferasyonu ve apoptotik olaylarda rol oynadığı kanıtlanmıştır (72-74). Notch yolağına ilk olarak *Drosophila melanogaster*'de rastlanmış ve insandan ziyade, model organizmalarda gelişimdeki fonksiyonu daha yoğun olarak çalışılmıştır (72, 75). řu anda bir insan kanseri yolağı olduğu kesin olarak ispatlanmış olup aynı zamanda *Alzheimer* hastalığı ile ilişkili bir faktör olarak nitelendirilmektedir (72, 76). Hücrelerin kaderini belirlediği belirtilen Notch yolağının kök ve nc hücre katmanlarını kontrol etmekle birlikte, hücrelerin karakteristik fonksiyonlarına ait kararların düzenlenmesinde de rol oynadığı bildirilmektedir (72).

Notch geni, gelişimi düzenleyen ve nörit yapısındaki değişiklikler ve nöral kök hücrelerin bakımı dahil olmak üzere plastisite ile ilgili işlemlere katkıda bulunabilecek evrimsel olarak korunan sinyalleme mekanizmalarının kritik bir bileşenidir. Notch yolundaki defisitler, zihinsel gerilik ve bunama ile ilişkili *Alagille* ve *Cadasil* sendromlarından sorumludur. Ek olarak, postmitotik nöronlarda Notch proteinleri, amiloid prekürsör protein olan presenilin-1, presenilin-6, -7, -8, -9 ve  $\beta$ -amiloid nc proteini ile etkileşime girer. Bu nedenle, ailevi ve sporadik *Alzheimer* hastalığına bağlı hafızaya ait patolojilerde rol oynayabileceği raporlanmıştır (77).

Costa ve ark.'ları 2003 yılında Notch sinyalindeki değişikliklerin öğrenme ve hafıza eksikliğine yol açıp açmadığını test etmek için, bu yoldaki mutasyonları olan fareler üzerinde yaptıkları araştırmalarında (77); Notch1'deki heterozigot null mutasyonların diğer öğrenme formlarını, motor kontrolü veya keşif aktivitesini etkilemeden, meknsal öğrenme ve bellekte eksikliklere yol açtığını raporlamışlardır. Buna ek olarak downregüle kofaktör olan *recombination signal binding protein for immunoglobulin kappa J region* (RBP-J)'deki boş heterozigot mutasyonların da benzer şekilde uzamsal öğrenme ve hafıza eksiklikleri ile sonuçlandığını bildirmişlerdir (77).

Bu veriler Notch sinyalindeki yapısal bir düşüşün belirli öğrenme ve hafıza eksikliklerine neden olabileceğini ve Notch'e bağlı transkripsiyondaki anormalliklerin *Alzheimer* hastalığı ve *Alagille* ve *Cadasil* sendromlarıyla ilişkili bilişsel eksikliklere katkıda bulunabileceğini vurgulamışlardır.

Literatürde sinir sisteminde yer alan Notch sinyallerinin en çok hücrenin kaderinin belirlenmesi bağlamında incelendiği anlaşılmaktadır.

Bununla birlikte, bazı araştırmalarda, Notch1'in ayrıca nöronal morfoloji, sinaptik plastisite, öğrenme ve hafızayı da düzenlediği öne sürülürken, Notch1 sinyalinin beyin gelişiminde kritik bir rol oynadığı ve artan kanıtların yetişkin sinaptik plastisitesi ve bellek oluşumundaki bu sinyalleşme yolunu etkilediğinin günümüzde iyi bilindiği bahsi yer almaktadır (78).

Alberi ve ark.'ları 2011 yılında (79); Notch1 ve *ligand Jagged1*'in sinapsta bulunduğu, nöronlardaki Notch1 sinyalinin sinaptik aktiviteye cevap olarak gerçekteştiği ve sinaptik plastisite için gereken aktiviteye bağlı bir gen olan, Arc / Arg3.1 tarafından pozitif olarak düzenlendiği bilgisi literatürde yerini almıştır (79).

Postnatal hipokampüsteki Notch1'in şartlı olarak silinmesinin, hem LTP hem de LTD'yi bozduğu, öğrenme ve kısa süreli hafızadaki eksikliklere yol açtığı, kanıt değeri yüksek araştırmalarda yerini almıştır (79). Ayrıca Notch1 sinyalinin, nöronal aktiviteye cevaben dinamik olarak düzenlendiği ve hafıza oluşumuna katkıda bulunan sinaptik plastisite için Notch1'in gerekli olduğu da bilinmektedir (79).

Özetle hipokampal dokuda nöronal aktiviteye cevap olarak nöronlarda Notch1 reseptörü aktivasyonu gerçekteştiği, Notch1 geninin, sinaptik plastisite, öğrenme ve kısa süreli hafıza için önemli olduğu günümüzde bilinmektedir (79).

Notch1 sinyal yolunun, spesifik MMP'leri aktive ederek endotel hücrelerinin morfogenezini düzenleyen vasküler endotel büyüme faktörü sinyalinin aşağısında etki ettiği gösterilmiştir (80).

Lusiferaz analizleri ve biyoinformatik çalışmalar, Notch1 yolunu miR-34a'nın bir hedefi olduğunu göstermektedir . Notch reseptörlerinin ve ligandlarının mRNA'sı ve protein seviyelerinin, amigdala korku şartlandırmasından sonra, zamana ve öğrenmeye özgü bir şekilde, down regüle olduğu görülmektedir. Notch yolunun sistemik ve stereotaksik manipölasyonları, bazolateral amigdala (BLA)'daki Notch sinyalinin korku hafızası konsolidasyonunu baskıladığını göstermektedir (81). BLA içindeki miR-34a'nın inhibe edilmesinden sonra korku hafızası konsolidasyonundaki bozulmanın Notch sinyali inhibe edilerek düzeltilmektedir. Bu veriler, BLA içinde Notch sinyalindeki geçici bir azalmanın miR-34a düzenlemesi yoluyla korku belleğinin konsolidasyonu için önemli olduğunu göstermektedir (81).

Bu çalışma, gelişimsel moleküllerin yetişkin davranışında rolleri olduğu ve onları hedef alan mevcut müdahalelerin, nöropsikiyatrik bozuklukların tedavisi için umut vaat ettiği fikrini ortaya koymaktadır (81).

#### **4.8. Matriks Metalloproteinaz (MMP)'ler**

MMP'ler; ekstraselüler matriks (ESM) bileşenlerini yıkıma uğratan,  $Zn^{++}$  ve  $Ca^{++}$ 'a bağımlı 28'den fazla enzim bulunduran proteaz kaynaklı bir nötral endopeptidaz ailesidir . MMP'ler, türlerine göre endotel hücreleri, makrofajlar, fibroblastlar, vasküler düz kas hücreleri, T lenfositler, trombositler, kondrositler, keratinositler, epitel hücreleri, mezaşimal hücreler, nötrofiller, trofoblastlar, osteoblastlar gibi oldukça çeşitli hücre tipleri tarafından eksprese edilirler (82). Buna ek olarak, organizmada fizyolojik olayların sürdürülmesinde MMP aktivitesi önem arz etmektedir. Birçok biyolojik süreçte rol oynarlar (82, 83).

MMP ifadesi; genlere ait transkripsiyon mekanizmasını manipule edebilen faktörlerin etkisi ile çeşitli fizyolojik ve/veya patolojik şartlar altında, dokuların yeniden modellenmesi esnasında artabilmektedir. Buna bağlı olarak da MMP'lerin üretimi, MMP inhibitörleri olan TIMP'lerin üretiminden fazla olabilmektedir (82, 84).

Sonuçta MMP'ler ve TIMP'ler arasındaki denge bozulabilmekte ve bozulan bu dengenin MMP'nin aktivitesi yönünde artması ile ESM kontrolsüz bir şekilde yıkılmaktadır. ESM yıkımına bağlı olarak kan-beyin bariyerinin yıkılmasından, multipl skleroz, demans ve Alzheimer hastalığına kadar birçok nörolojik hastalığın oluşumuna zemin hazırlayabilmektedir (82, 84, 85).

MMP'ler, substrat özgüllüğü baz alındığında beş grupta incelenebilmektedir. Bunlar; MMP-1, MMP-8, MMP-13 ve MMP-18'in yer aldığı kollojenazlar; MMP-2 ve MMP-9'un yer aldığı jelatinazlar; MMP-3, MMP-10 ve MMP-11'in yer aldığı stromelisinler; MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-24 ve MMP-25'in bulunduğu membran tipi MMP'ler ile MMP-7, MMP-12, MMP-19, MMP-20, MMP-21, MMP23, MMP-26, MMP-27 ve MMP-28'in yer aldığı ancak herhangi bir sınıfa dahil edilemeyenler şeklinde sınıflandırılmaktadır (86-89).

#### 4.8.1. MMP-9

MMP familyasına ait proteinlerin çoğu gibi hücre dışı proteinazlarla bölündüğünde aktive olan veya aktif olmayan proproteinler olarak salgılanan ve jelatinazlar sınıfında yer alan MMP-9; jelatinaz B (GELB); kolojenaz tip IV-B (CLG4B) ve Metafizel Anadysplasia -2 MANDP2 isimleri ile de bilinmektedir (90).

Özellikle tümör invazyonun proteoliz basamağında çok büyük önem arz eden ve 92 kDa ağırlığında olan MMP-9 proteini, bazal membranın yapısında en fazla bulunan kolajenlerden biri olan tip-4 kolajeni parçalamaktadır.

MMP-9'un inhibisyonu sayesinde *Schaffer collateral*- CA1 yolağındaki LTP ve hipokampüse bağlı hafızanın kazanılması açısından kritik öneme sahip olduğuna dair literatürde araştırmalara rastlanmaktadır (3-6).

#### 4.9. Kannabinoid ve Endokannabinoid

Yaklaşık 30 yıl süresince, sıçan beyinde bir kannabinoid (CB) reseptörünün keşfinden bu yana, CB farmakolojisi ve fizyolojisi alanında, insan fizyolojisi birçok seviyede, yeniden belirli konulara odaklanmak zorunda kalmıştır (91).

Allosterik ligand alanındaki gelişmelere paralel olarak, oldukça spesifik ve güçlü ortosterik ligandların geliştirilmesi neticesinde ise endokannabinoid (ECB) sistem, birçok fizyolojik sürecin modülatörü olarak ön plana çıkmış ve popülerite kazanmıştır.

Farmasötik kimya ve farmakomoleküler laboratuvarlar aracılığı ile tıbbi esrar başta olmak üzere, ECB sisteminin insan fizyolojisindeki rolünün araştırılması, hız kazanmıştır (91).

Salaga ve ark.'ları; seçici bir CB2 antagonisti ve AM630 kullandıkları araştırmalarında, CB2R'nin, immün sistem hücreleri ile merkezi ve periferik dokularda yayılmış durumda olduğunu bildirmişlerdir (92).

Janero ve ark.'ları; ECB sinyal sisteminin, CB1R ve CB2R'nin temel GPCR'lerinin ligand bağlama motifleri ve yapı-fonksiyonel korelasyonlarının ayrıntılı karakterizasyonunu gerçekleştirdikleri araştırmalarında, terapötik özellik kazanmak için CB1R ve CB2R'ye bağlı biyosinyalleri kontrol eden ilaçların gerçekçi tasarımını açıklamak gerektiğinin altını çizmişlerdir (93).



Burada, "ligand aracılı protein yapısı" (LAPS) olarak adlandırılan ve ligand etkileşimi ve reseptör bağımlı bilgi iletiminin anahtarı olan amino asit seviyesinde, CB1R ve CB2R yapısal özelliklerini karakterize eden deneysel paradigmayı tartışmışlardır (93).

Yeliseev ve ark.'ları (94); CB2R, rodopsin benzeri GPCR'nin büyük süper ailesine ait yedi transmembran helikse sahip integral zar protein olduğunu bildirdikleri çalışmalarında, CB2R'nin, immün yanıt, inflamasyon, ağrı ve diğer metabolik süreçlerin düzenlenmesinde hayati bir rol oynayan ECB sisteminin bir parçası olduğunu vurgulamışlardır. CB2R sinyalini hedef alan spesifik farmasötik maddelerin geliştirilmesi için hücre zarlarında CB2R'nin yapısı ve fonksiyonu hakkında daha fazla bilginin elde edilmesi gerektiğinin altını çizmişlerdir (94).

Console-Bram ve ark.'ları; EC reseptörü olan GPCR55'in, endojen lipoamino asit olan, N arachidonil glisin (*N-arachidonoylglycine*; NAGly)'nin hedefi olarak tanımlandığı ilk olan araştırmalarında; GPCR endojen modülatörleri olarak lipoamino asitlere olan ilginin çeşitli fizyolojik süreçlerde rol almaları nedeni ile arttığını bildirmişlerdir (95). Özellikle, bu amino asit konjüгатlarının, ECB sistemde rol aldıklarının ortaya çıkmış olduğunu vurgulamışlardır. NAGH'nin HAGPCR55/CHO hücrelerinde kalsiyum mobilizasyonunu ve mitojenle aktive protein kinaz aktivitelerinde konsantrasyona bağlı artışın indüklendiğini ve bu artış sonucunda, seçici GPCR55 antagonisti ML193'ün reseptör aracılı sinyallemeyle desteklediğini raporlamışlardır (95).

Barrie ve ark.'ları (96); esrar esasına dayanan terapinin kullanıldığı gerek hayvansal gerekse klinik çalışmalarda, esrar kökenli bileşiklerin hem analjezi hem de antiinflamatuvar etkiler sağladığının gösterilmesine ve de insanlar için umut verici terapötik uygulamaların başlatılmasına rağmen, esrar kökenli terapötiklerin gelişiminin halen başlangıç evresinde olduğunu bildirmişlerdir. Bu yüzden bu tür preparatlara ait çalışmalar ile sağlıkta ve hastalıkta ECB sisteminin çeşitli bileşenlerini ve terapötik hedefler olarak potansiyellerini inceleyerek hastalardaki etkinliği ve güvenlik profili hakkında daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulduğunu raporlamışlardır (96).

Woodhams ve ark.'ları (97); önemli bir endojen ağrı kontrol sistemi olan ECB sisteminin ağrı duyusu, duygusal ve bilişsel açıdan rolünü gözden geçirdikleri araştırmalarında; EC metabolizmasının bloklanması veya CB1R'nin allosterik modülasyonu yoluyla, ECB etkinliğinin farmakolojik olarak artırılmasına, EC Sistem ve stresle indüklenen ağrı modülasyonuna ve ağrı durumlarında, EC sistemi ve medial prefrontal korteks disfonksiyonu üzerine yoğunlaşmışlardır. Önceden klinik öncesi verilere odaklanmalarına rağmen, son zamanlarda ECB ile ilişkili tedavilerin klinik başarısızlıklarının, bu yaklaşımların gelecekteki potansiyeli üzerine yapılacak araştırmaların nörobiyolojide yeni bir ufuk olabileceğinin önemini vurgulamışlardır (97).

Lu ve ark.'ları; *Cannabis sativa*'nın uzun süredir medikal amaçlarla kullanıldığını, emniyet ve etkinliği arttırmak için bu bitkiden elde edilen bileşiklerin saflaştırılması veya sentezlenmesi üzerine CB'ler olarak bir şemsiye grubu altında isimlendirildiğini bildirmişlerdir (98).

Çeşitli CB'lerin, Kanada'da bulantı ve ağrı gibi çeşitli endikasyonlar için reçete edilebilir olduğunu, daha yakın zamanlarda, giderek artan sayıda kardiyoproteksiyon da dahil olmak üzere endojen CB sinyaliyle ilişkili diğer faydalı etkilerin öne sürüldüğü birçok raporların literatürde yer aldığından bahsetmişlerdir (98). Ancak terapötik anlamda hem kanıtların sınırlı olduğunun hem de etki mekanizmalarının belirsizliğini koruduğunun altını çizmişlerdir. En az bunlar kadar önemli olan durumun, CB'lerin belirgin psikoaktif yan etkiler nedeniyle klinik olarak kullanımlarını engellendiğini açıklamışlardır (98).

Luongo ve ark.'ları; patolojik birçok yolakta rol oynayan nöromodülatörlerin arasında, özellikle ECB'lerin hem nöronal hem de nöronal olmayan mekanizmalara derinden karışabileceğini raporladıkları çalışmalarında, bu kompleks sistemin moleküler ve hücrel mekanizmalardaki fonksiyonunun ve disfonksiyonunun literatürde, son yirmi yılda kapsamlı bir şekilde incelendiğini bildirmişlerdir (99).

Le Boisselier ve ark.'ları; son zamanlarda ortaya çıkan bir sürü sentetik CB'lerin modern teknolojinin *-lato sensu-* CB'ler üzerindeki kullanışlılığını düşündüren zengin bilgiler ortaya çıkardığının öneminden bahsetmişlerdir (100).

Birçok sinir iletim yolunu modüle ederek, ECB sistemi giderek keşfedilen birçok fizyolojik süreçte yer almakta olduğunun öneminden bahsetmişlerdir. Sentetik CB'lerin istenilen etkileri ve yan etkilerini, esrar içerken gözlemlenen olumsuz etkilerden daha yoğun olarak kabul edilmesi gerektiğini belirtmişlerdir (100). Bu yoğun etkinin nedenini, CBR'ye tam agonist etki ve daha yüksek afinite ile kısmen açıklayabildiklerini belirtmişlerdir. CB zehirlenmesinden sonra görülen nörolojik ve kardiyovasküler yan etkilerin genellikle konvansiyonel destekleyici tedaviye yanıt verdiğini, ancak sentetik CB kullanımının aşırı istismar ve bağımlılık olasılığı gibi nedenlerden dolayı bu tür preparatların potansiyel terapötik değeri ile ilgilenen bilimsel topluluk için endişe kaynağı olduğunun öneminden bahsetmişlerdir (100).

Petrosino ve ark.'ları; palmitoletanolamid (*palmitoylethanolamide*; PEA)'in, potansiyel bir nutrasötik olarak ortaya çıktığını, çünkü bu bileşiğin doğal olarak memelilerin hücre ve dokularında birçok bitki ve hayvan gıdası kaynağında üretildiğini ve önemli nöroprotektif, anti-inflamatuar ve analjezik etkilere sahip olduğunu belirtmişlerdir. PEA'nın moleküler etki mekanizmasını tanımlamak ve hem merkezi hem de periferik sinir sisteminde çoklu etkilerini açıklamak için çeşitli çabalar gösterdiklerini vurgulamışlardır (101).

PEA'nın farmakolojisi, etkinliği ve güvenliliğini araştırdıkları çalışmalarında, tek başına veya luteolin gibi antioksidan flavonoidler ve polidatin gibi stilbenler ile birlikte PEA'nın, mikronize edilmiş ve ultra-mikronize edilmiş formülasyonları ile uygulanabilirliğinden bahsetmişlerdir (101).

Fitzcharles ve ark.'ları; ECB sistemine yönelik tedavi seçenekleri arasında, *Cannabis sativa* bitkisinden elde edilen bitkisel ürünlerin yanı sıra farmasötik preparatların da bulunduğunu, birçok yargı organı tarafından tıbbi esrarın yasallaştırılması ve yaygın kamuoyu savunması, reçeteli veya kendi kendine ilaç kullanımına bir ilgi uyandırdığını dile getirmişlerdir. Çalışmalarında, CB ürünün etkinliği ve yan etkileri hakkındaki güncel kanıtları değerlendirmeye almışlardır (102). Bugüne kadar elde edilen kanıtların yetersiz olduğunu ve CB preparatlarının tıbbi kullanımını için yetersiz bilgiye sahip olduğumuzu raporlamışlardır (102).

Özellikle, hastalarda bitkisel esrarın risklerinin iyi tanımlanmadığının, dahası literatürde yer alan anekdot ve savunmanın, sağlam kanıtların yerini alamayacağına altını çizmişlerdir (102).

Kerbrat ve ark.'ları; yağ asidi amid hidrolaz (*Fatty acid amide hydrolase*;FAAH) aktivitesinde bir azalmanın, CB'lerin endojen analoglarının veya ECB'lerin seviyelerini arttıracığını ve FAAH inhibitörlerinin, hayvan modellerinde analjezik ve antiinflamatuvar aktivite gösterdiğini belirtmişlerdir. Bazı FAAH inhibitörlerinin birinci ve ikinci evre faz çalışmalarında test edildiğini bildirmişlerdir (103).

Seri kohortlarda 84 sağlıklı gönüllüye tekli dozlar (0.25 ila 100 mg) ve tekrarlayan oral dozlarda (10 gün boyunca 2.5 ila 20 mg) BIA 10-2474 isimli FAAH inhibitörünün uygulandığını ve herhangi bir ciddi advers olaya rastlanmadığını belirtmişlerdir (103). İki katılımcının yer aldığı plasebo veya günde 50 mg BIA10-2474 verilen altı katılımcının yer aldığı başka bir kohort çalışmasında ise katılımcıların nörolojik yan etkileri üzerine odaklanıldığını bildirmişlerdir (103).

Akut ve hızla ilerleyen nörolojik sendromun, ilaç katılımının beşinci gününden itibaren katılımcılardan üçünde geliştiğini raporlamışlardır (103). Başlıca klinik özelliklerin; baş ağrısı, serebellar sendrom, hafıza zayıflığı ve bilinç değişikliği olduğunu vurguladıkları araştırmalarında, manyetik rezonans görüntüleme bulgularında, ağırlıklı olarak pons ve hipokampiyi içeren sıvının zayıflatılmış inversiyon iyileşmesi ve difüzyon ağırlıklı görüntüleme dizileri üzerinde mikrohemorajiler ve hiperintensiteler de dahil olmak üzere bilateral ve simetrik serebral lezyonları gösterdiğinin altını çizmişlerdir (103). Bir hastada beyin ölümü gerçekleştiğini; iki hastanın durumunun zaman ilerledikçe düzeldiğini, ancak bir hastada hafıza kaybının mevcut olduğunu ve diğer hastada kalıcı bir serebellar sendrom varlığı meydana geldiğini raporlamışlardır (103). Beklenmedik ciddi bir nörolojik bozukluğun, BIA 10-2474'ün bir birinci faz denemesinde kullanılan en yüksek doz seviyesinde alındıktan sonra oluştuğunu ve bu toksik serebral sendromun altında yatan mekanizmanın açıklanamadığını belirtmişlerdir (103).

La Porta ve ark.'ları; yabani tip (WT) farelerde CB1R (ACEA) ve CB2R (JWH133) seçici agonistleri üç haftalık bir süre boyunca iyileştirme kabiliyetini değerlendirmek için kullandıklarını, ECB olan AEA ve 2-araşidonilgliserol (2-AG)

seviyelerini plazma ve beyin bölgelerinde ölçmüşlerdir. İlginç bir şekilde hem ACEA hem de JWH133, nosiseptif ve duygusal değişiklikleri iyileştirirken ACEA'nın ilişkili hafıza zayıflamasını ilerlettiğini vurgulamışlardır (104).

Wasserman ve ark.'ları; ECB sisteminin kemik kütleini düzenlediğini, CB1R ve CB2R'nin omurgalıların büyümesine neden olan epifiz büyüme kıkırdağı (EGC)'nin hipertrofik kondrositlerinde spesifik olarak eksprese edildiğini bildirdikleri çalışmalarında, hızlı gelişme evresinin sonunda CB1R ve / veya CB2R'i eksik farelerin, femurlarının, yabanil tipli hayvanlara kıyasla, daha uzun olduğunu raporlamışlardır (105).  $\Delta$  (9) -tetrahidrokanabinol (THC)'ün, dişi WT ve CB2'nin (CB1 değil), fareler hariç- iskelet uzamasını yavaşlatmakta ve femoral ve bu durum lumbar vertebra gövde uzunluğuna yansımaktadır (105). Bunun da daha düşük vücut ağırlığına neden olduğuna, ancak yağ içeriğinin değişmediğine vurgu yaptıkları araştırmalarında; THC *ex-vivo* kültürlerde EGC kondrosit hipertrofisini inhibe ederek ve CB1'in (CB2 değil), fareler hariç- hipertrofik hücre bölgesi kalınlığını azalttığını, bunun EGC'de yerel büyümeyi sınırlayan bir EC sistemini gösterdiğini raporlamışlardır (105).

Gómez ve ark.'ları (106); AEA'nın, kromatin yoğunlaşmasına, kaspaz-3, 8 ve 9'un aktivasyonuna ve fokal adezyon kinaz bölünmesine neden olmakla birlikte şaşırtıcı bir şekilde, hücre çoğalmasını inhibe etmesine rağmen protoonkogen proteinlerinden olan c-MYC ekspresyonunu arttırdığını raporlamışlardır. Dahası, AEA'nın, AKT aktivasyonunu inhibe ederken ERK, JNK ve p38'in sürekli bir aktivasyonuna neden olduğunu ve buna ek olarak, AEA'nın, kaspaz-3'ün bölünmesinde tümör nekroze edici faktör alfa (TNF- $\alpha$ ) ile sinerjik etki gösterdiğini bildirmişlerdir (106). AEA'nın tek başına veya TNF- $\alpha$  ile kombinasyon halinde kıkırdakta potansiyel bir tahribat ajanı olabileceğini düşündüklerini dile getirmişlerdir (106).

Ticari olarak temin edilebilen CB'lerin, büyük ölçüde CB1R'nin aktivasyonu yolu ile psikomimetik ve bağımlılık gibi kanabinomimetik yan etkilere maruz kalındığının raporlandığı araştırmaya da literatürde rastlanmaktadır (107).

Mevcut ticari CB'lerin terapötik indeksinin dar olduğunu; yakın geçmişte gelişen çevresel olarak kısıtlanmış CB'ler, bölgesel olarak uygulanan CB'ler, iki işlevli CB ligandları ve CB enzim inhibitörleri klasik CB1R ve CB2R ile etkileşmeyen eCB'ler, CBR antagonistleri ve selektif CB1R agonistlerinin analjezik olarak umut verdiğini dile getirmişlerdir (107). CB'lerin daha fazla araştırılması gerektiğini vurguladıkları araştırmalarında, bir CB2R agonistinin geçici *-transient-* bir reseptör potansiyeli vaniloid (TRPV-1) antagonisti ile kombinasyonunun CB2R agonistinin terapötik indeksini artırabileceği çıkarımında bulunmuşlardır (107). Enzim inhibitörlerinin ve TRPV-1 blokerlerinin de çok iyi bir şekilde araştırılması gerektiğinin öneminden bahsetmişlerdir. Önümüzdeki beş yıl boyunca CB'lerin çoğunun klinik olarak üretken gelişiminin, seçici CB2R agonistleri alanında olacağını üzerinde durulan çalışmalarında, bu ajanların çeşitli hastalıklarda test edileceğini belirtmişlerdir (107).

La Porta ve ark.'ları, umut verici klinik öncesi verilere rağmen CB'lerin terapötik kullanımını desteklemek için sınırlı klinik kanıt sağladığını ancak yine de umut verici sonuçların olduğunu altını çizmektedirler (108).

Fowler ve ark.'ları; 1992'de AEA'nın keşfedilmesinden bu yana ECB sistemi ve fizyolojik etkileri hakkındaki bilgilerimizin büyük ölçüde arttığından bahsetmişlerdir (109).

ECB farmakolojisini tartıştıkları derlemelerinde; AEA'nın sentezini seçici olarak engelleyen hiçbir bileşiğin olmadığı gibi AEA'nın salınmasının ve geri alımının engellendiği mekanizmaların da tam olarak aydınlatılamadığı ve buna rağmen, CB1R ve CB2R'de seçici agonistler ve antagonistlerin ve FAAH inhibitörlerinin iyi karakterize edildiği vurgulanmaktadır. Ayrıca, bu bileşiklerin birtakım rahatsızlıkların tedavisinde faydalı olabileceğinin yanı sıra ECB sisteminin modülasyonunun, nöroprotektif etkilerin de üretebilmesine olanak sağlamakla birlikte nörotoksik etkilere de yol açabileceğinden bahsedilmiştir (109).

Rockwell ve ark.'ları; AEA olarak bilinen araşidonil etanolaminin, CBR'lere bağlandığının tanımlandığı ilk endojen bileşik olduğundan bahsetmekle birlikte, AEA'nın hipotermi, antinosisepsiyon, hareketsizlik, katalepsi ve immün modülasyon

gibi THC'nin fizyolojik etkilerinin birçoğunu taklit edebileceğinden de bahsetmişlerdir (110).

AEA'nın, birincil splenositlerde interlökin-2'nin konsantrasyona bağlı bir inhibisyonuna neden olduğunu raporladıkları bu çalışmada; CB1 ve CB2 antagonistleri SR141716A [N- (piperidin-1-il) -5- (4-klorofenil) -1- (2,4-diklorfenil) -4-metil-H-pirazol-3 karboksamidhidroklorür] ve SR144528 [N - [(1 S) -endo-1,3,3, -trimethylbicyclo [2,2,1] heptan-2-il] -5- (4-kloro-3-metilfenil) -1- (4-metil-benzil) -pirazol-3-karboksamit] kombinasyon halinde kullanıldığında, AEA ile interlökin-2 inhibisyonunu antagonize etmediğinin altını çizmişlerdir (110). Buna ek olarak, ne varsayılan AEA membrane transportör önleyicisi (AMT) olan UCM707 [N- (3-furanilmetil) -5Z, 8Z, 11Z, 14Z-eikozatetraenamid] ne de metil araşidonoil fluorofosfonat (MAFP), FAAH, interlökin-2 üzerine AEA'nın inhibitör etkisini etkileyebilmiştir şeklinde açıklamada bulunmuşlardır. İlginç bir şekilde, araşidonik asitin interlökin-2 sekresyonunun konsantrasyona bağlı bir inhibisyonuna neden olduğu ve bunun yapısal olarak ilişkili AEA'nın etkisine benzer olduğu iddia edilmiştir (110). Son olarak, bir peroksizom proliferatör-aktive edilmiş reseptör (PPAR) gama spesifik antagonisti T0070907 [2-kloro-5-nitro-N-4-piridinil-benzamid] ile önmuamele, AEA'nın aracılık ettiği interlökin-2 sekresyonunu kısmen antagonize ettiğinden de bahsedilmiştir (110). AEA ile interlökin-2 salgısının inhibisyonunun CB1 / CB2 ve AMT / FAAH sisteminden bağımsız olduğunu düşündürmektedir açıklamasını getirdikleri çalışmalarında; interlökin-2 inhibisyonunun AEA'nın, siklooksijenaz-2 metaboliti tarafından aktive edilen bir PPAR gama aracılığı ile gerçekleştiği şeklinde yorumlamışlardır (110).

ECB sistemine ağrı, nörodejenerasyon ve kanser gibi çeşitli hastalık durumlarını tedavi etmek üzere modüle edilecek olan bileşikler üzerine kurulu yeni tedavilerin geliştirilmesi konusunda büyük ilgi duyulduğunun bildirildiği araştırmaya da yine literatürde rastlanmaktadır (111).

Özetle AEA, beyinde araşidonik asitten üretilen bir CB nörotransmitterdir. AEA hem merkezi hem de periferel sinir sisteminde bulunabilmektedir. MSS'de CB1R, periferel sinir sisteminde ise CB2R olarak adlandırılan reseptörler aracılığı ile işlev görmektedirler (7).

AM251; biarilpirazol grubu CB1 antagonistlerinden olup, AM630, beyinde yer alan CB2'nin ve ML193 ise GPCR55'in potent ve selektif antagonistleridir (8, 9). Literatürde yer alan kanıt değeri yüksek araştırmalar incelendiğinde; CB'lerin hipokampüse bağlı bellek fonksiyonu ile ilişkili olduğunu raporlamakla birlikte (10), "CB1R agonistlerinin, bilişi bozmakta ve sinaptik iletimin uzun vadeli potansiyasyonunu yani LTP'yi önlediği raporlanmaktadır. Ancak hipokampal LTP üzerindeki endojen olarak oluşturulan CB'lerin (eCB) etkisi belirsiz kalmaktadır" şeklinde çıkarımda bulunan araştırmaya da rastlanmaktadır (11).





## 5. MATERYAL VE METOT

### 5.1. Etik İzinler

Bu randomize, çift kör çalışma; İstanbul Medipol Üniversitesi Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulu ve Canlı Memeli Kullanımı İzin Belgesi (Tarih: 13/03/2019 Numara:38828770-604.01.01-E.10835) sayesinde, İstanbul Medipol Üniversitesi MEDİTAM laboratuvarında gerçekleştirildi.

### 5.2. Materyal

#### 5.2.1. Kullanılan cihazlar

Biyogüvenlik kabini (class II), Nüve, Türkiye  
Biyogüvenlik kabini (class II), Heal Force, Çin  
Buzdolabı +4<sup>0</sup>C, Beko, Türkiye  
CO<sub>2</sub> etüv, Thermo, Amerika Birleşik Devletleri (ABD)  
Dikey elektroforez tankı, Bio-Rad, ABD  
Distile su cihazı, Milipore, Almanya  
RT-qPCR sistemi, Applied biosystems fast 7500, ABD  
Güç kaynağı, Wealtec, Tayvan  
Hassas terazi, Ohaus, ABD  
Hemositometre, Marienfeld, Almanya  
Isıticılı çalkalayıcı blok, Biosan, Letonya  
Isısal döngüleme cihazı, Techne TC5000, İngiltere  
Isısal döngüleme cihazı, ABI Proflex, ABD  
Isıticılı manyetik karıştırıcı, WiseStir, Kore  
İnvert mikroskop, Olympus, Almanya  
Kırık buz makinasi, Fiocchetti, İtalya  
Mekanik karıştırıcı, Velp, İtalya  
Mikrospin, Biosan, Letonya  
Otoklav, Tekbal, Türkiye  
Otomatik pipet seti, Axygen, ABD  
Otomatik pipet seti, Eppendorf, ABD  
Pipet tabancası, Capp, Danimarka

pH metre, Hanna, Romanya  
Soğutmalı santrifüj, Tehnica, Slovenya  
Spektrofotometre, Shimadzu, Japonya  
Su banyosu, Nüve, Türkiye  
Tüp karıştırıcı, Hasvet, Türkiye  
Vakum, Biosan, Letonya  
Vakum, Rocker, Tayvan  
Vorteks, Wise Mix, Kore

### **5.2.2. Kullanılan kimyasal maddeler**

Bradfort solüyonu, Biorad, ABD  
Dimetil sülfoksit (DMSO), Sigma, ABD  
Etanol (EtOH), Sigma, ABD  
İzofluran, Hollanda  
KCl, Sigma, ABD  
Proteaz inhibitör kokteyli, Thermo Scientific Pierce Biotechnology, ABD  
Serum fizyolojik (SF)  
TritonX-100, Sigma, ABD

### **5.2.3. Kullanılan kitler, tamponlar ve çözeltiler**

#### **5.2.3.1. RNA izolasyon kiti**

RNA izolasyon kiti (PureLink™ RNA mini kit, ABD) içeriğinde RNaz-free lizis ve yıkama solüsyonları ile spin-kolonları bulunmaktadır. Bu kit kullanılarak yaklaşık 200 mg dokudan 1000 µg'a kadar RNA izole edilebilmektedir. Kit içeriğindeki yıkama solüsyonu II, içerisine 60 ml %100 EtOH ilave edilerek kullanıma hazır hale getirilmiştir.

### 5.2.3.2. Tamamlayıcı DNA (cDNA) sentez kiti

Bu kit (Applied Biosystems High Capacity Reverse Transcription, ABD) içerisinde 10X ters transkripsiyon tamponu, 10X ters transkripsiyon random primerleri, 25X dNTP karışımı (100 mM), MultiScribe™ Ters transkriptaz (50 U/μL) ve RNaz inhibitor bulundurmaktadır.

### 5.2.3.3. RT-qPCR kiti

RT-qPCR kit (*Applied Biosystems, ABD*)'i içerisinde;

2x Taq-Man gen ekspresyon master karışımı

- AmpliTaq Gold DNA polimeraz
  - Urasil-DNA glikozilaz
  - dNTP
  - ROX pasif referans
  - Optimize edilmiş tampon bileşenleri
- 20x Taq-Man gen ekspresyon tayin kiti
- İki tane işaretli primer (1x primer final konsantrasyonu 900 nM ve 20x stok primer konsantrasyonu 18μM)
  - Bir tane FAM™ boya ile işaretlenmiş Taq-Man prob MGB (1x final konsantrasyonu 250 nM, stok konsantrasyonu 5μM).
  - Taq-Man gen ekspresyon assayleri 1tane 6-VIC® boyası ile işaretlenmiş TaqMan MGB prob içerirler (1x final konsantrasyonu 250 nM, 20x stok konsantrasyonu 5μM'dır).

Her bir gen bölgesi için 4331182 katalog numarasına sahip ticari Taq-Man gen ekspresyon kitleri alındı. β-Aktin gen bölgesi (referans gen) için Actb..Rn00667869\_m1, MMP-9 gen bölgesi için MMP-9..Rn00579162\_m1, Notch1 gen bölgesi için Notch1..Rn01758633\_m1, ve PTEN gen bölgesi için PTEN..Rn00477208\_m1 kodlu ürünler kullanılmıştır. Reaksiyon için gerekli olan bileşenler ve mikrolitre (μL) cinsinden miktarları Tablo 5.2.1.'de verilmiştir.

**Tablo 5.2.1.** RT-qPCR için gereken bileşenler ve miktarları

| PCR Bileşeni                             | Konsantrasyon ( $\mu\text{L}$ ) |
|--|---------------------------------|
| 20x Taq-Man® gen ekspresyon tayin kit    | 1                               |
| 2x Taq-Man gen ekspresyon master karışım | 10                              |
| Cdna                                     | 2                               |
| dH <sub>2</sub> O                        | 7                               |
| Total                                    | 20                              |

### 5.3. Canlı Memeli Deneklerin Beslenme ve Barındırılması

Canlı memeli deneklerin (Wistar-albino cinsi sıçanlar) beslenmesinde kullanılan yemler; kuru madde en az %88 oranında olan ve içeriğinde, protein, selüloz, sodyum, kalsiyum, fosfor, D3 vitamini ve E vitamini barındıran hazır peletler idi (Resim 5.3.1.).



**Resim 5.3.1.** Sıçanların beslendiği pelet yemler

Denekler 12 saat karanlık, 12 saat aydınlık periyotta tutuldu ve yem ile suya serbest erişimleri sağlandı. Enjeksiyonlar intraperitoneal yoldan, 26 Gauge (G)x½ uçlu Beybi® marka steril enjektörler yardımı ile günde bir kez ve yedi gün süre ile gerçekleştirildi (Resim 5.3.2.).



**Resim 5.3.2.** Deneklere intraperitoneal yoldan enjeksiyonların uygulanması

#### **5.4. Farmasötik Preparatların Hazırlanması**

Tüm farmasötikler, uygun çözücülerinde firma bülteni doğrultusunda hazırlandı. AEA (Sigma; Katalog #A0580-5MG), stok solüsyonu final konsantrasyonu 5 mg/mL olacak şekilde SF içerisinde; AM251 (Sigma; Katalog #A6226-10MG) stok solüsyonu final konsantrasyonu 1 mg/mL olacak şekilde SF içerisinde, AM630 (Sigma; Katalog #SML0327-5MG) stok solüsyonu final konsantrasyonu 1,25 mg/mL olacak şekilde SF içerisinde ve ML193 (Sigma; Katalog #SML1340-5MG) stok solüsyonu final konsantrasyonu 5 mg/mL olacak şekilde dimetilsülfoksit (DMSO) içerisinde çözülerek hazırlandı.

Stok solüsyonlar, enjeksiyonların uygulandığı süre içerisinde +4°C sıcaklıkta muhafaza edildi.

## 5.5. Deney Grupları

10 haftalık ve 300-320 gr ağırlığında 50 Wistar-albino cinsi erkek sıçanlar, randomize olarak, her bir grupta beşer adet canlı memeli denek olacak şekilde 10 gruba ayrıldı.

Grup 1 (Kontrol, n=5): Bu grupta yer alan örnekler; yedi gün boyunca, herhangi bir enjeksiyon uygulanmaksızın, süre sonundaki sekizinci günde, anestezi altında dekapite edilen sıçanlardan elde edilen hipokampüs dokularından oluşturuldu.

Grup 2 (Sham, n=5): Bu grupta yer alan örnekler; yedi gün boyunca sıçanlara, agonist (AEA) ve/veya antagonistler (AM251, AM630 ve ML193) yerine, %0,9 sodyum klorür çözeltisi (serum fizyolojik; SF) uygulanan ve süre sonundaki sekizinci günde, anestezi altında dekapite edilen sıçanlardan elde edilen hipokampüs dokularından oluşturuldu.

Grup 3 (Çözücü kontrol, n=5): Bu grupta yer alan örnekler; yedi gün boyunca sıçanlara, agonist (AEA) ve/veya antagonistler (AM251, AM630 ve ML193) yerine, ML193'ün çözücü olarak kullanılan DMSO çözeltisinin uygulandıktan sonra, sekizinci günde, anestezi altında dekapite edilen sıçanlardan elde edilen hipokampüs dokularından oluşturuldu.

Grup 4 (AEA, n=5): Bu grupta yer alan örnekler; yedi gün boyunca AEA uygulanan ve sekizinci günde, anestezi altında dekapite edilen sıçanlardan elde edilen hipokampüs dokularından oluşturuldu.

Grup 5 (AM251, n=5): Bu grupta yer alan örnekler; yedi gün boyunca AM251 uygulanan ve sekizinci günde, anestezi altında dekapite edilen sıçanlardan elde edilen hipokampüs dokularından oluşturuldu.

Grup 6 (AM630, n=5): Bu grupta yer alan örnekler; yedi gün boyunca AM630 uygulanan ve sekizinci günde, anestezi altında dekapite edilen sıçanlardan elde edilen hipokampüs dokularından oluşturuldu.

Grup 7 (ML193, n=5): Bu grupta yer alan örnekler; yedi gün boyunca ML193 uygulanan ve sekizinci günde, anestezi altında dekapite edilen sıçanlardan elde edilen hipokampus dokularından oluşturuldu.

Grup 8 (AEA + AM251, n=5): Bu grupta yer alan örnekler; yedi gün boyunca AEA ve AM251 uygulanan ve sekizinci günde, anestezi altında dekapite edilen sıçanlardan elde edilen hipokampus dokularından oluşturuldu.

Grup 9 (AEA + AM630, n=5): Bu grupta yer alan örnekler; yedi gün boyunca AEA ve AM630 uygulanan ve sekizinci günde, anestezi altında dekapite edilen sıçanlardan elde edilen hipokampus dokularından oluşturuldu.

Grup 10 (AEA + ML193, n=5): Bu grupta yer alan örnekler; yedi gün boyunca AEA ve ML193 uygulanan ve sekizinci günde, anestezi altında dekapite edilen sıçanlardan elde edilen hipokampus dokularından oluşturuldu (Resim 5.5.1).

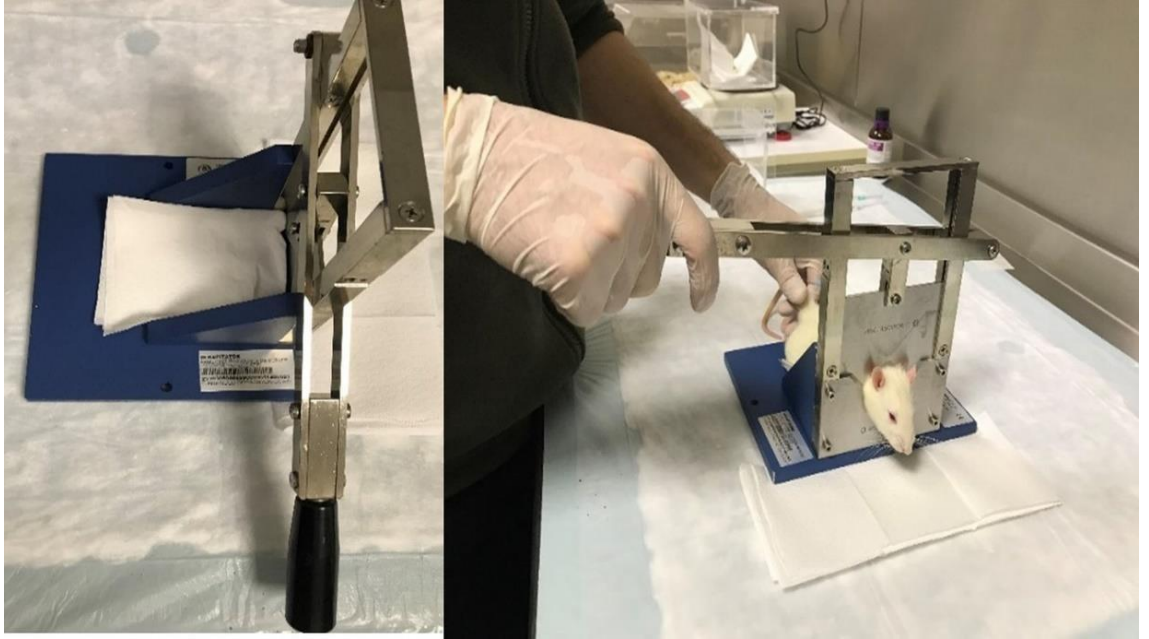


**Resim 5.5.1.** Gruplarına göre sınıflandırılarak ayrılan canlı memeli denekler

## 5.6. Anestezi Altında Deneklerin Sakrifikasyonu

### 5.6.1. Anestezi ve dekapitasyon

Dekapitasyon işlemi öncesinde, tüm gruplarda yer alan denekler, *Isoflurane-USP 100ml®* isimli inhalasyon anesteziği kullanılarak, kafanın gövdeden, kranioservikal bileşke lokalizasyonundan, kolayca ve temiz bir şekilde kesilerek ayrılmasına olanak tanıyacak şekilde, paslanmaz çelik bıçaklara sahip rodent dekapitörüne (Decapitor Katalog no: 2530305999990000651400001) alınarak, sakrifiye edildi (Resim 5.6.1.).



**Resim 5.6.1.** Canlı memeli deneklerin anestezi altında dekapitasyon işlemi

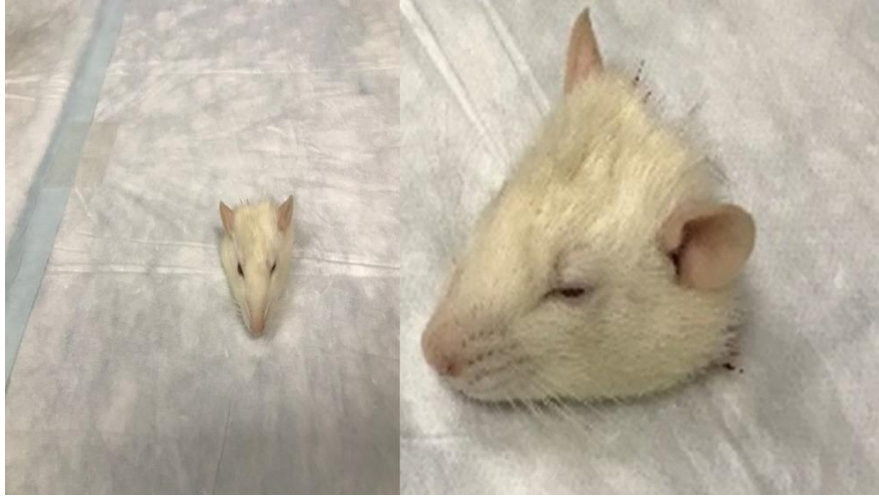
Tüm operasyon boyunca işlemler CL 6000 LED® marka ışık cihazı altında gerçekleştirildi (Resim 5.6.2.).





**Resim 5.6.2.** Operasyonun gerçekleştirildiği sırada kullanılan LED ışık cihazı

İzofluran anestezisi altında, dekapitör yardımı ile sakrifiye edilen canlı memeli deneklerin çıkartılan kafaları işlemin yapılacağı sahaya alındı (Resim 5.6.3.).



**Resim 5.6.3.** Sıçan gövdesinden kafanın ayrıldıktan sonraki görüntüsü

### 5.6.2. Cerrahi rezeksiyon ile hipokampal dokuların çıkartılması

Kraniumun osseöz dokusunun ortaya konulabilmesi için, üzerini kaplayan cilt ve ciltaltı doku, 15 numara bistüri yardımı ile orta hattan, oksipital bölgeden frontal bölgeye doğru insize edildi. Daha sonra cerrahi penset ve disseksiyon makası yardımı ile cilt, cilt altı doku ve periost osseöz dokudan, lateral ve anteriora doğru disseke edildi. Disseke edilen bu dokular frontal bölgeden her iki orbita ve os nasale üzerine doğru pensetler yardımı ile devrildi. Osseöz dokular anatomik olarak ortaya konuldu.

Frontal, parietal, interparietal, oksipital kemikler, sagittal ve lambdoid çıkıntılar anatomik olarak tanındı ve ortaya konuldu.

Sagittal krestin kaudal kısmını da oluşturan inter parietal kemiğin kaudo-lateral sınırından, kaudo-kranial yönelimle inter parietal kemikten frontal kemiğe doğru, birbirine paralel olacak şekilde bilateral, iris makası yardımı ile osseöz dokular, serebral doku korunarak, insize edildi.

Gerek beyin dokusu gerekse meningeal yapılara zarar vermemek için çok dikkatli manevralar gerçekleştirildi. Kraniumun anteriorunda ise her iki orbital çukurun superior sınırlarından geçen izafi hat lokalizasyonu hedeflenerek, frontal kemik insize edildi. Olfaktor bulbusa ulaşıldı. Serebral dokunun dorsal yüzeyini örten frontal, parietal, inter parietal kemik dokular eksize edildi.

Beyin dokusunun dorsal yüzeyini çevreleyen osseöz yapılar kapak şeklinde açılarak, bu kemik dokuların eksizyonu gerçekleştirildi. Serebral dokuyu çevreleyen ve serebral doku ile kranium arasında lokalize olan meningeal yapıların, serebral dokuyu koruyucu fonksiyonundan dolayı, disseksiyon esnasında zarar görmemesine ve dolayısıyla serebral dokunun hasarlanmamasına dikkat edildi.

Beyin dokusu, serebral dokuyu çepeçevre saran meninkslerden dikkatli bir şekilde disseke edildi. Daha sonra serberal dokunun, lateralde temporal, anteriorda ise frontal kemik tabanına doğru disseksiyonuna başlandı.

Kavisli dar desen forsepsi kapalı olacak şekilde ve mini dissektörler yardımı ile serebral dokunun kortikal yüzeylerine zarar vermeden, beynin dokusu bilateral lateralden temporal kemikten, anteriorda ise frontal kemik tabanından disseke edildi.

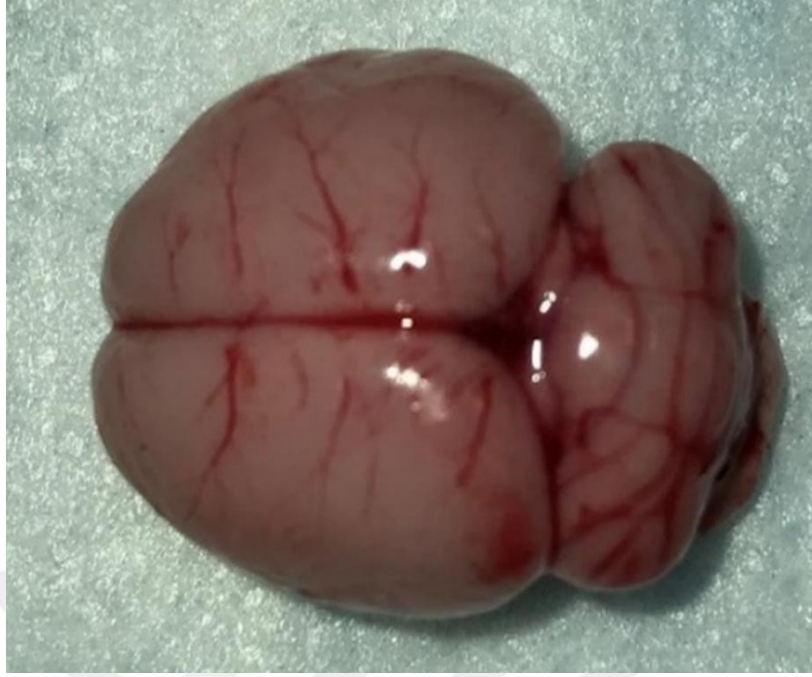
Daha sonra serebral dokunun tabanına dissektör kaydırılarak serebral doku ve orta beyin yapıları süperiora doğru itildi. Kafa tabanında serebral doku ile ilişkili vasküler yapılar ve kranial sinirler serebral dokudan ayrıştırıldı. Frontal bölgede ise, mini dissektör, anterior olfaktor bulbus kısmının altına doğru kaydırılarak beyin yavaşça yukarı doğru basküle edildi.

Optik sinir ve olfaktor sinir insize edilerek, sıçan kraniumu üzerini örten cilt, cilt altı dokularının anteriora doğru devrilmesi ve sonrasında serebral doku komşu osseöz yapılardan tamamen disseke edilerek hasar görmeden çıkarıldı. Eksize edilen serebral doku derhal, altında buzlu plaka olan drapeler üzerine alındı (Resim 5.6.4.).



**Resim 5.6.4.** İnrakranial serebral dokunun superiordan görünüşü

Anatomik olarak oryantasyonun daha kolay olacağı düşünülerek, beyin dokusunun ventral yüzeyi, buz plakasına bakacak şekilde, dorsal yüzeyi ise süperiorda olacak şekilde, serebellum posteriorda, frontal lob anteriorda kaudo-kranial olarak yerleştirildi. Dissektör yardımı ile serebellum, pons ve medulla serebral kortekslerden hafifçe disseke edildi. Daha sonra bu dokular her iki serebral kortikal yapılardan 15 numara bistüri yardımı ile insize edilerek ortamdan uzaklaştırıldı (Resim 5.6.5).



**Resim 5.6.5.** Serebral korteks, serebellum, pons ve medullanın superior görüntüsü

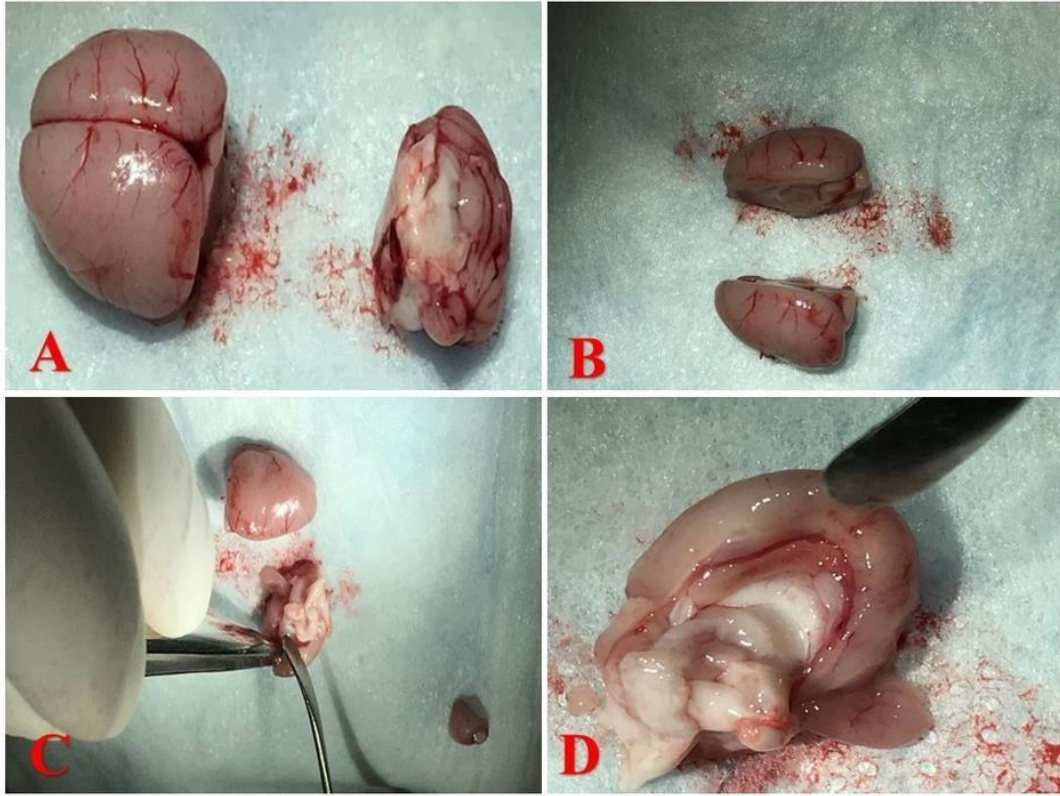
Ventral yüzü buzlu plakaya bakacak şekilde serebral korteksler işlem sahasına yerleştirildi. Daha sonra longitudinal serebral fissür ve interhemisferik sulkus boyunca orta hattan korpus kallozum ve orta beyin yapılarında içecek şekilde 15 numara bistüri yardımı ile insize edildi. Böyle her iki serebral hemisfer birbirinden ayrıştırıldı.

Dokunun daha kolay maniple edilebilmesi için her iki hemisferin frontal loblarında yüzeye paralel olacak şekilde anteriordan posterior 0,5 mm uzunlukta 15 numara bistüri ile insizyon yapıp, dokular ortamdaki uzaklaştırıldı.

Serebral hemisferlerden ilk olarak sol hemisfer, insize edilen frontal yüzeye doğru devrildi.

Daha sonra orta beyin dokuları penset yardımı ile tutularak, bistüri yardımı ile serebral kortikal dokudan disseke edildi.

Üçüncü ventrikül posteriorunda, talamusun superiorunda ve korpus kallozumun inferiorunda yer alan hipokampus dokusuna ulaşmak için ilk olarak açık parlak beyaz kısım olan, yarım ay şeklindeki, korpus kallozum tanındı (Resim 5.6.6.).



**Resim 5.6.6.** Hipokampus dokusunun beyinden diseke edilme basamakları

Resim 5.6.6. A’da; serebellum ve medullanın serebral hemisferden ayrılması, resim 5.6.6. B’de, her iki hemisferin longitudinal serebral fissür ve interhemisferik sulkus boyunca orta hattın insize edilerek birbirinden ayrıştırılması işlemine ait görüntüler yer almaktadır. Resim 5.6.6. C’de, sağ serebral hemisferden orta beyin dokularının diseksiyonu görülüyor iken, resim 5.6.6. D’de ise sağ serebral orta beyinden diseke edilen hipokampus dokusunun görüntüsü görülmektedir.

İlk olarak sol serebral hemisfer tekrar krotikal yüzeyi buzlu plate bakacak şekilde yerleştirildi. Küçük kavisli forseps yardımı ile frontal bölgeden sabitlenen dokudan, kortikal doku ve korpus kallozumun inferiorunda yeralan hipokampus dokusu 15 numara bistüri ve dissektörler yardımı ile diseke edilerek eksize edildi. Diseksiyon sürecini hızlandırmak ve kolaylaştırmak için, korteksin posterior kısmına doğru, korteksi medialden lateral ve posteriora doğru insizyon yapıldı. Böylece hipokampal dokuya daha kolay erişilebildi.

Hipokampus dokusunun diğer serebral doku bölgelerine göre daha pembe renkte olması, ayrıca bu bölgenin disseksiyonunda yardımcı bir parametre idi.

Aynı işlemler sağ serebral hemsifer dokuda da tekrarlandı ve bilateral hipokampus dokuları elde edildi.

Eksize edilen hipokampus dokuları, serebral krotikal yapıların, alınan spesmenlerde varlıkları açısından tekrar incelendi (Resim 5.6.7. A). Serebral dokuların tam ayrışmadığı hipokampal örnekler daha küçük bir forseps yardımı ile tam olarak serebral dokuları ayrıştırılarak, hipokampus dokuları hızlı bir şekilde tüplere yerleştirildi (Resim 5.6.7. B).



**Resim 5.6.7.** Hipokampus dokuları (A) ve bu dokuların tüplere aktarılması (B)

### **5.7. Rezeke Edilen Dokuların Moleküler Analizler İçin Hazırlanması**

Sakrifiye edilen canlı memeli deneklere ait sağ ve sol hipokampal dokular rezeke edildikten sonra, soğuk (4°C) potasyum klorür (KCl) ile yıkandı. Ardından kurutma kâğıdı ile kurutulan dokular, kurutma kâğıdının darası alındıktan sonra tartılarak, elde edilen veriler kayıt altına alındı (Resim 5.7.1.).



**Resim 5.7.1.** Hipokampal dokuların kurutma kâğıdı üzerinde tartılması

Tartılan dokular ivedi bir şekilde, içerisinde [protein ekstraksiyon solüsyonu, TritonX-100 (Katalog# 85111) ve proteaz inhibitör kokteyli (Katalog# 87785) (Thermo Scientific Pierce Biotechnology, Rockford, Amerika Birleşik Devletleri) içeren] lizis tampon içeren eppendorf tüplerine kodlanarak yerleştirildi.

### **5.7.1. Dokulardan total RNA izolasyonu:**

RNA izolasyonu için dokuların enzimatik ve mekanik olarak parçalanması işlemleri gerçekleştirildi. Bunun için öncelikle dokulardan total RNA ekstraksiyonu için içerisinde 1ml lizis tampon çözeltisi ve doku örnekleri yer alan eppendorf tüplere 10µl β-merkaptoetanol (%1; β-ME) eklendi (Resim 5.7.2. A, Resim 5.7.2. B). Daha sonra örnekler vortekslendi. Bu işlemi takiben özel rotator parçalayıcı tüplerine alınan örneklerin, rotator parçalayıcıda (mekanik karıştırıcı) 1400 rpm'de parçalanmaları sağlandı (Resim 5.7.2. C), ve vortekslendi (Resim 5.7.2. D). Dokuların mekanik olarak parçalanması esnasında, oluşan ısı artışının, RNA degradasyonuna neden olmasını önlemek amacıyla işlem buz üzerinde gerçekleştirildi. Daha sonra örnekler 14000 rpm'de 7 dakika santrifüj edildi.



**Resim 5.7.2.** RNA izolasyonu için dokuların parçalanması

Bu işlemi takiben dokulardan RNA izolasyonu üretici firmanın direktifleri doğrultusunda kit kullanılarak aşağıda belirtildiği üzere gerçekleştirilmiştir.

- 1) Santrifüj sonrası süpernatant temiz bir eppendorf tüpüne aktarıldı ve bu tüp içerisine, süpernatant hacmine göre 1:1 oranında %70 (h/h) soğuk (4°C) EtOH ilave edildi.
- 2) Daha sonra örnekler Spinkolonlara transfer edildi (Resim 5.7.3.).





**Resim 5.7.3.** Özel filtreli (Spinkolon) tüplere aktarılan süpernatantlar

- 3) Ardından örnekler, 12.000xg' de 15 saniye santrifüj edildi.
- 4) Bu işlemi takiben total RNA örneklerini de içeren spinkolonlar temiz bir eppendorf tüpünün üzerine yerleştirildi ve spinkolonların üzerine 700µl yıkama solüsyonu I eklendi. Ardından yine 12.000xg' de 15 saniye santrifüj edildi.
- 5) Spinkolonlar tekrar temiz bir eppendorf tüpünün üzerine yerleştirildi ve ardından, iki kez ardışık olarak; soğuk EtOH ilave edilen yıkama solüsyonu II'den her bir örneğe 500µl yıkama solüsyonu II ilavesi gerçekleştirildikten sonra 12.000xg' de 15 saniye santrifüj edildi.
- 6) Spinkolon yeni steril eppendorf tüpüne yerleştirildi. Her bir örnek üzerine 50µl RNAaz free su ilavesi gerçekleştirildi. Bu ilaveden sonra, 22,4°C'lik oda ısısında örnekler bir dakika bekletildi. Örnekler 12000xg'de 15 saniye santrifüj edildi.
- 7) Spinkolon uzaklaştırıldı.
- 8) Eppendorf tüpte 50 µl miktarında total RNA izole edildi (Resim 5.7.4.).



**Resim 5.7.4.** 50  $\mu$ l RNA örneklerinin eldesi

### 5.7.2. cDNA eldesi

Total RNA izolasyonunu takiben Wistar Albino cinsi erkek sıçan hipokampus dokusundan elde edilen RNA örneklerinden, RT-qPCR’de kullanılmak üzere tamamlayıcı DNA’nın sentezi “*Applied Biosystems High Capacity Reverse Transcription (ABD) kiti*” kullanılarak aşağıdaki gibi gerçekleştirildi.

Öncelikle her bir örnek için:

- 2 $\mu$ l 10X Ters transkripsiyon tamponu
- 2 $\mu$ l Ters transkripsiyon random primer (25X)
- 0.8  $\mu$ l dNTPs (100 mmol/l)
- 1  $\mu$ l RNAaz inhibitörü
- 1 $\mu$ l MultiScribe™ Reverse Transkriptaz (200U/ $\mu$ l)

temel karışım

oluşan reaksiyon karışımı hazırlanıp buzun üzerinde bekletildi. Bu esnada her bir örnek için 200ng RNA içeren miktardaki örnek ve dH<sub>2</sub>O kullanılarak 20 $\mu$ l’ye

tamamlandı. İşlem bittikten sonra örnekler kısa süreliğine vorteksle karıştırılarak santrifüj edildi ve ısısal döngü cihazına yerleştirildi.

Örneklerden cDNA eldesi ısısal döngü cihazında (Resim 5.7.5.), Tablo 5.7.1.'de gösterilen program uygulanarak gerçekleştirildi.



**Resim 5.7.5.** Isısal döngü cihazının süre ve sıcaklıkları

**Tablo 5.7.1.** Isısal döngü cihazının süre ve sıcaklıkları

|               | 1.Basamak | 2.Basamak  | 3.Basamak | 4.Basamak |
|---------------|-----------|------------|-----------|-----------|
| Sıcaklık (°C) | 25        | 37         | 85        | 4         |
| Zaman         | 10 dakika | 120 dakika | 5 dakika  | ∞         |

### 5.7.3. RT-qPCR

İlk olarak RT-qPCR, mRNA üzerinden gen ifadesinin saptanması veya gen ifadelerini birbirleri ile kıyaslaması amacı ile kullanılan PCR temelli hassas bir tekniktir.

Yapılan bu çalışmada, elde edilen cDNA örneklerinde MMP-9, Notch1 ve PTEN gen (ifadelerindeki) ekspresyonundaki değişimler RT-qPCR yöntemi ile belirlendi. Çalışma iki tekrarlı olarak gerçekleştirildi. Öncelikle cDNA örneklerinin her birinden 2µl alındı ve buz içerisine yerleştirilmiş şekilde olan steril eppendorf tüplere eklendi.

Daha sonra her bir gen bölgesine özgül ticari kit varlığında reaksiyon karışımı hazırlandı (Tablo 5.7.2.).

**Tablo 5.7.2.** RT-qPCR bileşenleri ve miktarları

| RT-qPCR Reaksiyon içeriği | Miktar ( $\mu$ l) |
|---------------------------|-------------------|
| cDNA                      | 20                |
| Master karışımı           | 100               |
| Gene spesifik assay       | 10                |
| dH <sub>2</sub> O         | 70                |
| Total                     | 200               |

Öncelikle master karışımı, gen spesifik assay ve dH<sub>2</sub>O steril eppendorf tüp içerisine, tablo 5.7.2.'de gösterilen miktarlarda ilave edilerek karışım hazırlandı. Ardından bu karışım içerisinden, her bir kuyucuk içerisine, 18 $\mu$ l hacimde olacak şekilde, 96 kuyucuklu mikrolakalara karışım yerleştirildi ve üzerlerine ilgili cDNA örneklerinden 2 $\mu$ l ilave edildi. Kontrol grubu için oluşturulan havuzda bulunan cDNA örnekleri kullanıldı.

Karışımın ve cDNA örneklerinin mikrolakalara yerleşimi sonrasında, mikrolakanın üzeri, optik kaplayıcı ile kaplandı. Daha sonra azami hızda, 22,4°C'lik sıcaklıkta, 30 saniye santrifüj edilen mikrolaka içeriklerinin çökmesi sağlandı.

96 kuyucuklu bu mikrolaka, Applied Biosystems Fast 7500 RT-qPCR cihazının içerisine yerleştirildi ve uygun olan PCR koşulları sağlandı (Tablo 5.7.3.).

**Tablo 5.7.3.** Çalışılan RT-qPCR koşulları

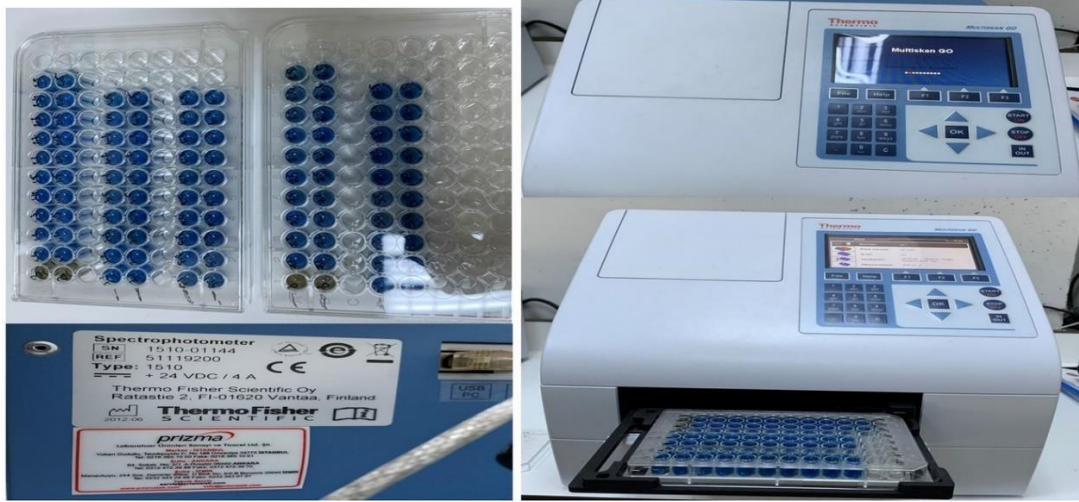
| Basamak  | UDG inkübasyon | Ampli-Taq Gold, UP<br>enzim aktivasyon | PCR                       |          |
|----------|----------------|--|---------------------------|----------|
|          |                |  | 40 Döngü ( <i>Cycle</i> ) |          |
|          |                |  | Denatürasyon              | Bağlanma |
| Zaman    | 2 dakika       | 10 dakika                              | 15 saniye                 | 1 dakika |
| Sıcaklık | 50°C           | 95°C                                   | 95°C                      | 60°C     |

#### 5.7.4. Protein izolasyonu ve miktar tayini

MMP-9, Notch1 ve PTEN proteinlerine ait ekspresyon düzeyi Western-blot yöntemi ile gösterildi. Tüm deney gruplarından elde edilen protein lizatlarında Bradford yöntemi ile toplam protein miktarı belirlendi. Elde edilen proteinlerin ayrıştırılması ve sonrasında immünblot ile ifade düzeylerinin belirlenebilmesi için öncelikle sodium dodesil sülfat- poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE) yöntemi uygulandı.

Bunun için öncelikle dokular TritonX-100 (Thermo Scientific Pierce Biotechnology, Rockford, Amerika Birleşik Devletleri) (Kat. No. 85111) tamponu içerisinde lanset yardımı ile parçalandı. Ardından el homojenizatörü yardımı ile homojenize hale getirilen dokular, ependorf tüplere aktarıldı. Berrak ve partikülsüz hale gelene dek 10.000 rpm'de beş dakika ardışık ve üç kez ard arda santrifüj edilen tüp içeriğinde yer alan supernatan alındı ve büyük doku parçaları ortamdaki uzaklaştırıldı.

Elde edilen bu örnekler üzerinden protein miktar tayinleri gerçekleştirildi (Resim 5.7.6.).



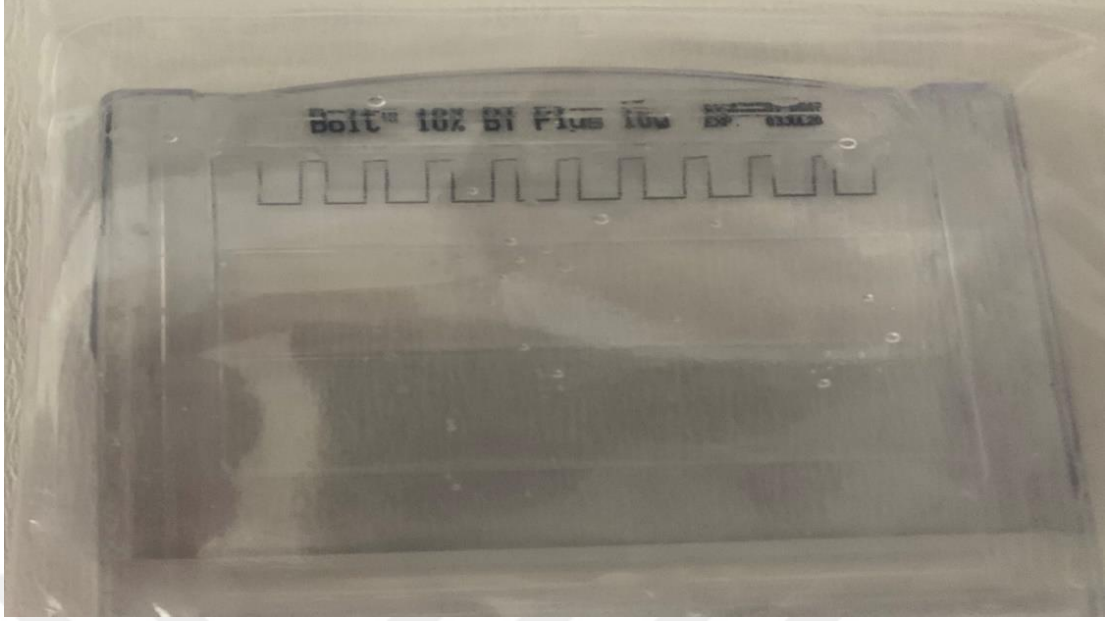
**Resim 5.7.6.** Spektrofotometrik analizler ile örneklerde protein miktar tayini

Protein miktar tayini bovine serum albümin (BSA) ile bilgisayar ortamında hazırlanan standart grafik yardımı ile gerçekleştirilirken, miktar tayini için Protein Assay ticari kitinden faydalanıldı.

Western-blot yöntemi ile PTEN, Notch1 ve MMP-9 protein düzeylerinin gösterilebilmesi için, protein miktar tayini ardından elde edilen proteinler SDS-PAGE yöntemi ile ayrıştırıldı.

### **5.7.5. SDS-PAGE**

Bu işlem basamağı %10'luk SDS-PAGE hazır jellerinde gerçekleştirildi (Resim 5.7.7.).



**Resim 5.7.7.** SDS-PAGE için kullanılan jellerin görüntüsü

Öncelikle protein örnekleri 4x merkaptetanol içeren yükleme tamponunda dilüe edildi ve 95<sup>0</sup>C' de beş dakika denatürasyonları sağlandı. Bu işlemi takiben her bir kuyuya 100 µg total protein olacak şekilde örnekler yüklenerek 120V elektrik akımında oda sıcaklığında 1,5 saat yürütüldü. Her yürütme işleminde kuyulardan birine protein moleküler ağırlık belirteci (Invitrogen) yüklendi ve işlem sonucunda elde edilen bantların büyüklükleri, bu belirteç aracılığı ile doğrulandı. Polivinil diflorid (polyvinylidene difluoride; PVDF) transfer membran, Western-blotlama yönteminde, proteinler ve nükleik asitler için yüksek bağlama kapasitesini sağlamakla birlikte, 0,45µm'lik gözenekleri sayesinde, bu membrane 10 kilo-dalton (kDa)'dan büyük proteinlerin transferleri için ideal kılmaktadır (Resim 5.7.8.).



**Resim 5.7.8.** Kullanılan transfer membrana ait görüntü

Bu yüzden bu doktora tezinde, yürütme işleminin tamamlanmasını takiben jel kasetleri açılarak proteinler iBLOT (0,45 µm; 26,5 cm x 3,75 m; Katalog no: IB401001, Thermo Fisher Scientific) sistemi kullanılarak, yedi dakika elektrik alanda, PVDF transfer membranına aktarıldı ve hedef protein MMP-9, Notch1 ve PTEN için immünblotlama gerçekleştirildi.

### 5.7.6. İmmünblotlama

İmmünblot işlemi WesternBreeze kit (Katalog no: WB7106, Thermo Fisher Scientific) kullanılarak üretici firma direktifleri doğrultusunda gerçekleştirildi (Resim 5.7.9.).





**Resim 5.7.9.** WesternBreeze™ kit içeriği

Öncelikle membranlar 30 dakika bloklama çözeltisinde bloke edildikten sonra 1 saat 1:1000 oranında MMP-9, Notch1 ve PTEN proteinlerine özgü primer antikörlerle muamele edilerek ve yıkama çözeltisi ile 3 x 5 dakika ile yıkamayı takiben 30 dk alkalin fosfataz konjuge sekonder antikör ile inkübe edildi. Son aşamada membranlar üç kez yıkamayı takiben substrat çözeltisi ile muamele edilerek oluşan kemilüminesans X-ray film (Katalog no: 34090, Thermo Fisher Scientific) üzerinde karanlık odada gösterildi. Çalışmada MMP-9 (Katalog no: MA5-15886, ThermoFisher Scientific, USA), Notch1 (Katalog no: PA5-23181, ThermoFisher Scientific, USA) ve PTEN (Katalog no: PA5-17826, ThermoFisher Scientific, USA) proteinlerine özgü primer antikörleri kullanıldı. Western-blot yönteminde endojen kontrol olarak  $\beta$ Aktin (Katalog no: MA1-140, ThermoFisher Scientific, USA) proteini kullanıldı.

## 5.8. İstatistiksel Analizler

Deney ve kontrol gruplarına göre RT-qPCR (bağıl miktar, *relative quantity*, “RQ”) ve Western-blot (protein ekspresyon değeri, “r”) değerlerinin karşılaştırılması için Kruskal Wallis H-Testi kullanılmıştır.

Bu test sonucunda anlamlı farklılık görülen değişkenler arasında farklılığın hangi gruplardan kaynaklandığını belirlemede gruplar arasında ikili karşılaştırmalar için Bonferroni düzeltmeli Mann Whitney U-Testi kullanılmıştır.

Verilerin analizinde IBM SPSS Statistic 22 paket programı kullanılmış ve araştırmada hata payı  $\alpha=0,01$  olarak belirlenmiştir.

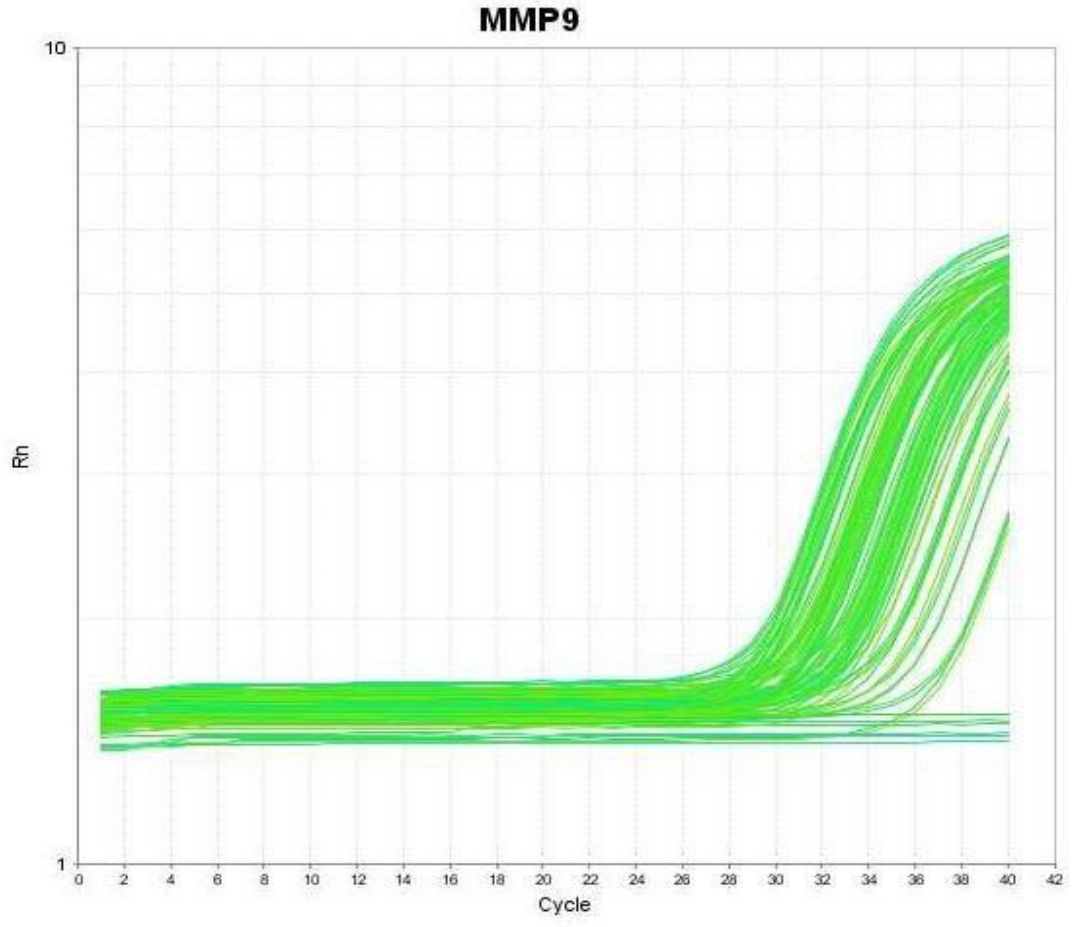


## 6. BULGULAR

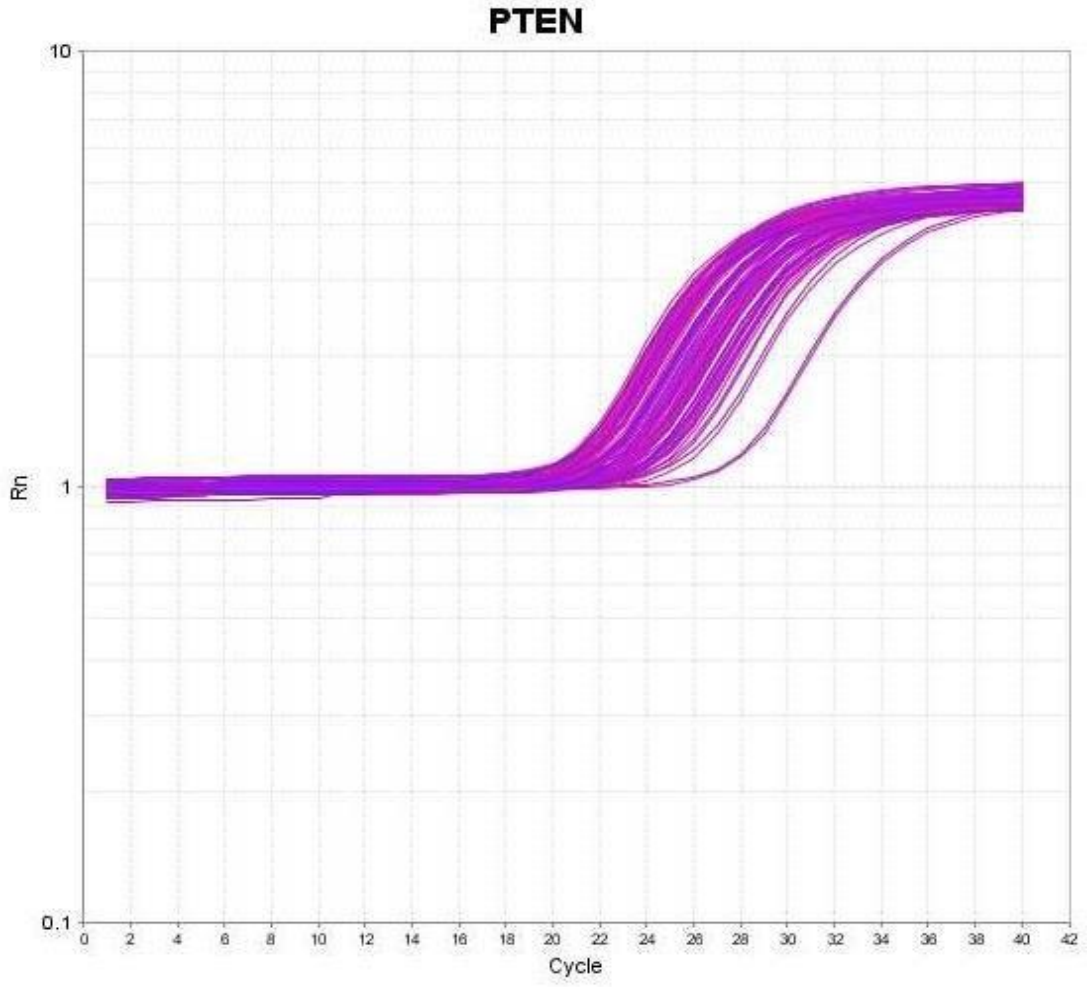
Canlı memeli deneklerin tartılan hipokampal doku örneklerine ait ağırlık ortalamasının hesaplanması sonrasında, ortalama doku ağırlığının  $0,0612 \pm 0,0069$  gram olduğu kaydedildi.

### 6.1. RT-qPCR Sonuçları

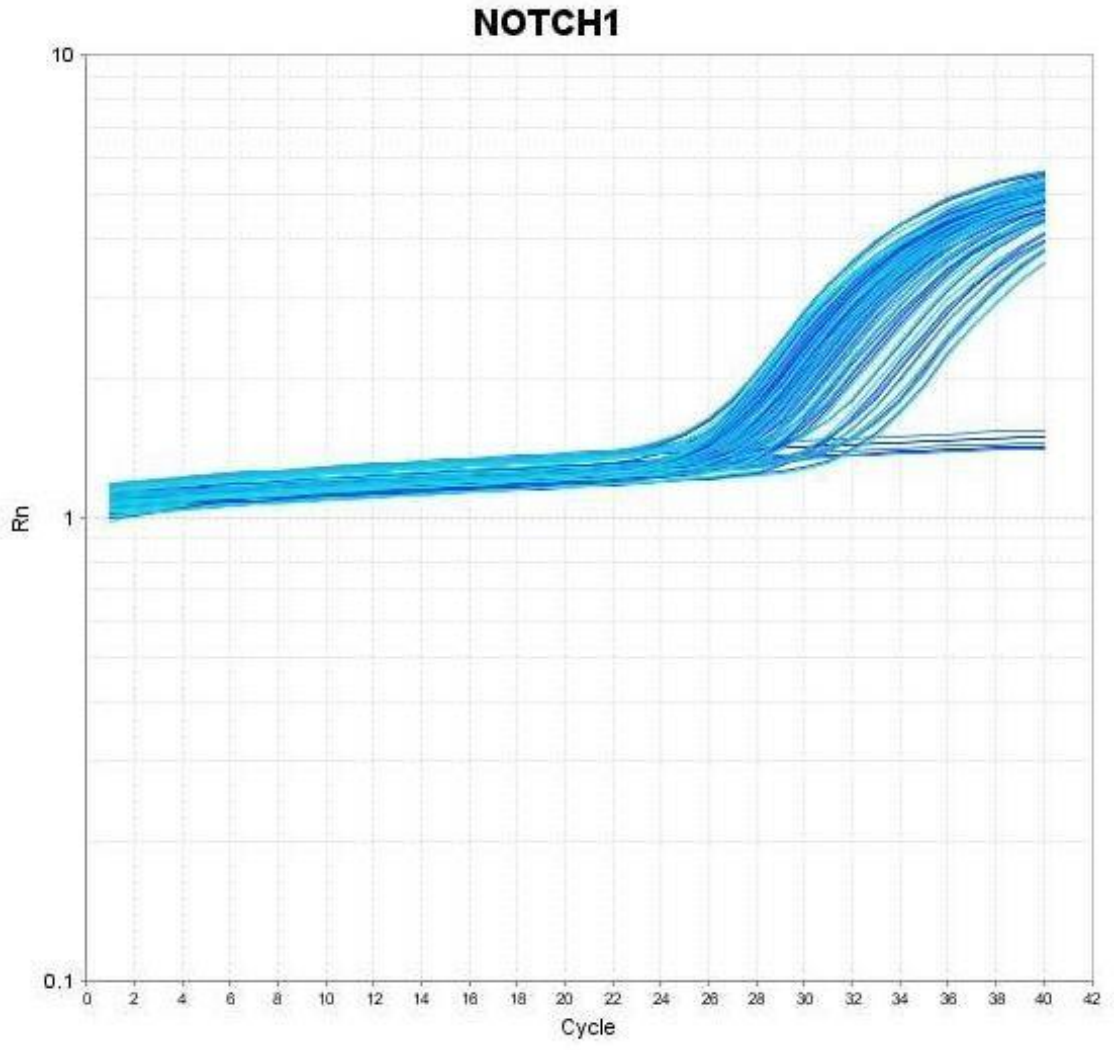
Tüm deney gruplarında toplam 100 örnekte RT-qPCR deneyleri gerçekleştirilmiş; MMP-9, PTEN ve Notch1 gen ifadeleri aynı örneğe ait internal kontrol gen olarak kullanılan  $\beta$ -Aktin ifadesine göre normalize edilmiştir. Şekil 6.1.1, 6.1.2, 6.1.3 ve 6.1.4’de MMP-9, PTEN ve Notch1 genlerine ait amplifikasyon eğrileri x ekseninde döngü sayısı ve y ekseninde Rn değeri olacak şekilde gösterilmiştir.



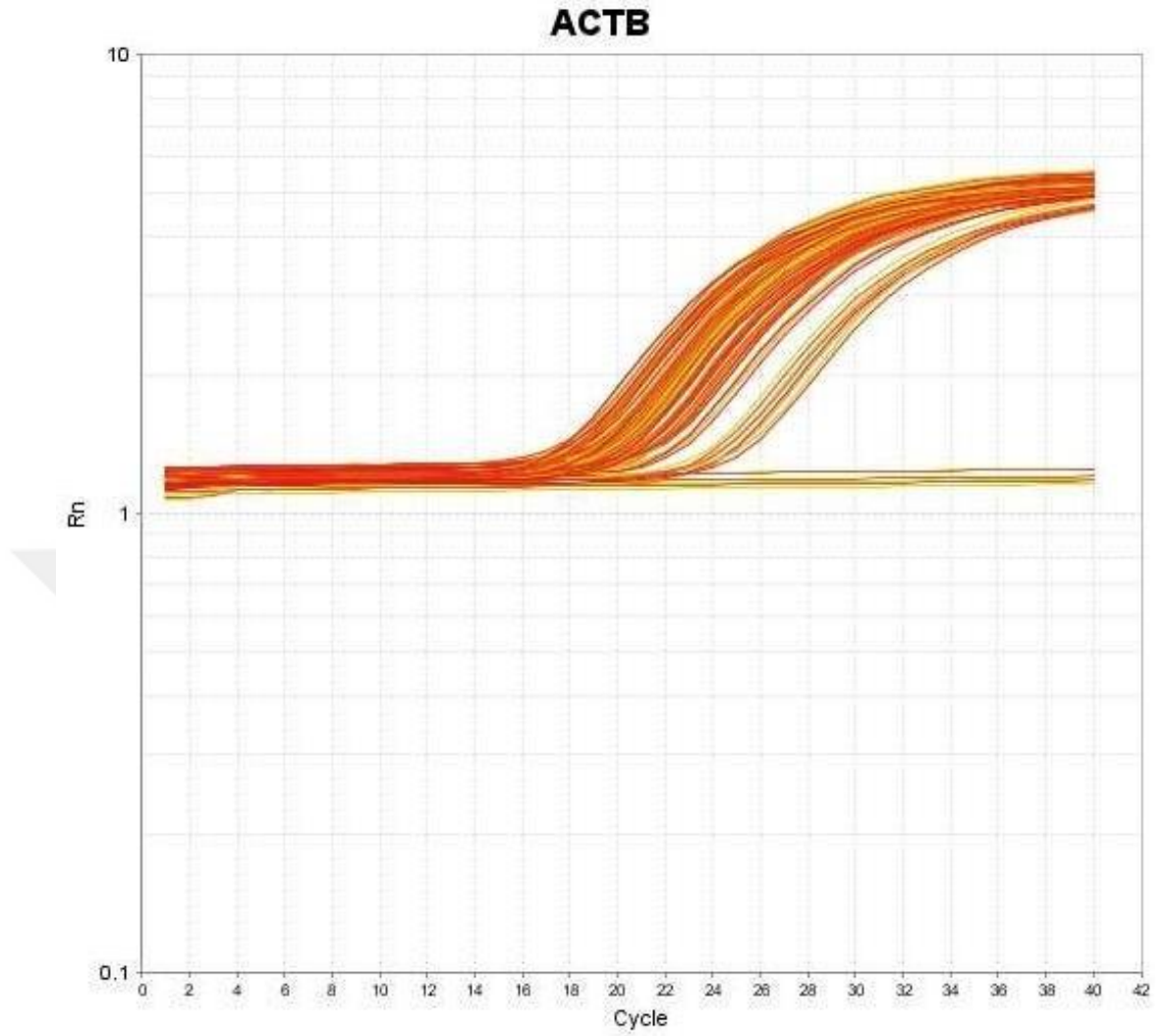
**Şekil 6.1.1.** MMP-9 genine ait amplifikasyon eğrisi



**Şekil 6.1.2.** PTEN genine ait amplifikasyon eğrisi



Şekil 6.1.3. Notch1 genine ait amplifikasyon eğrisi



**Şekil 6.1.4.**  $\beta$ -Aktin genine ait amplifikasyon eğrisi

Tüm örneklerde Rn değerleri belirlendikten sonra kontrol grubu (Grup 1) referans alınarak tüm örneklerdeki gen ifadesi düzeyi hesaplanmıştır ve göreceli miktar (relative quantity: RQ) değeri olarak tabloda verilmiştir (Tablo 6.1.1.). Grup 1 referans örneklerinde RQ=1 yani gen ekspresyon düzeyi %100 kabul edilerek deney gruplarına ait örneklerdeki gen ifadesi değişimi kat cinsinden belirlenmiştir.

Yapılan hesaplamalar sonucunda grup 2'de MMP-9 gen ifadesi %25 (RQ=1,25), Notch1 gen ifadesi %26 (RQ=1,26) artmış ve PTEN gen ifadesinin ise %20 (RQ=0,80) azalmış olduğu belirlenmiştir.

Grup 3’de MMP-9 gen ifadesi %50 (RQ=1,50), Notch1 gen ifadesi %21 (RQ=1,21) artmış ve PTEN gen ifadesi ise (RQ=1,04) değişmeden kalmıştır. Grup 4’te MMP-9 gen ifadesi değişmeden kalmış (RQ=1,01), Notch1 gen ifadesi %51 (RQ=1,51) artmış ve PTEN gen ifadesi ise %34 (RQ=0,66) azalmıştır.

Grup 5’te MMP-9 gen ifadesi %36 (RQ=1,36), Notch1 gen ifadesi %36 (RQ=1,36) artmış ve PTEN gen ifadesinin ise %23 (RQ=0,77) azalmış olduğu belirlenmiştir. Grup 6’da MMP-9 gen ifadesi %63 (RQ=1,63), Notch1 gen ifadesi %13 (RQ=1,13) ve PTEN gen ifadesi %32 (RQ=1,32) artmıştır. Grup 7’de MMP-9 gen ifadesi değişmeden kalmış (RQ=0,93), Notch1 gen ifadesi %24 (RQ=1,24) artmış ve PTEN gen ifadesi ise %21 (RQ=0,79) azalmıştır.

Grup 8’de MMP-9 gen ifadesi değişmeden kalmış (RQ=1,01), Notch1 gen ifadesi %23 (RQ=1,23) artmış ve PTEN gen ifadesi ise 2,75 kat (RQ=2,75) artmıştır. Grup 9’da MMP-9 gen ifadesi değişmeden kalmış (RQ=1,08), Notch1 gen ifadesi %36 (RQ=1,36) artmış ve PTEN gen ifadesi ise %20 (RQ=1,20) artmıştır.

Grup 10’da MMP-9 gen ifadesi %65 (RQ=1,65), Notch1 gen ifadesi %75 (RQ=1,75) ve PTEN gen ifadesi ise %65 (RQ=1,65) artmıştır (Tablo 6.1.1.)

**Tablo 6.1.1.** Deney gruplarından elde edilen RQ değerleri

| <b>Grup (G)</b>    | <b>MMP-9</b> | <b>Notch1</b> | <b>PTEN</b> |
|--------------------|--------------|---------------|-------------|
| <b>G1-1</b>        | 1            | 1             | 1           |
| <b>G1-2</b>        | 1            | 1             | 1           |
| <b>G1-3</b>        | 1            | 1             | 1           |
| <b>G1-4</b>        | 1            | 1             | 1           |
| <b>G1-5</b>        | 1            | 1             | 1           |
| <b>G1 ortalama</b> | 1            | 1             | 1           |
| <b>G2-1</b>        | 1,01         | 1,35          | 0,70        |
| <b>G2-2</b>        | 1,79         | 1,15          | 0,88        |
| <b>G2-3</b>        | 0,63         | 1,37          | 0,60        |
| <b>G2-4</b>        | 2,02         | 1,77          | 0,65        |
| <b>G2-5</b>        | 0,79         | 0,67          | 1,18        |
| <b>G2 ortalama</b> | 1,25         | 1,26          | 0,80        |
| <b>G3-1</b>        | 0,96         | 1,62          | 1,68        |
| <b>G3-2</b>        | 1,04         | 0,96          | 0,51        |
| <b>G3-3</b>        | 1,77         | 1,62          | 1,68        |
| <b>G3-4</b>        | 2,02         | 0,95          | 0,61        |



|                     |      |      |      |
|---------------------|------|------|------|
| <b>G3-5</b>         | 1,73 | 0,87 | 0,71 |
| <b>G3 ortalama</b>  | 1,50 | 1,21 | 1,04 |
| <b>G4-1</b>         | 1,67 | 1,41 | 0,54 |
| <b>G4-2</b>         | 0,66 | 2,21 | 0,99 |
| <b>G4-3</b>         | 1,24 | 1,22 | 0,63 |
| <b>G4-4</b>         | 0,88 | 1,05 | 0,56 |
| <b>G4-5</b>         | 0,58 | 1,67 | 0,59 |
| <b>G4 ortalama</b>  | 1,01 | 1,51 | 0,66 |
| <b>G5-1</b>         | 1,67 | 1,20 | 0,85 |
| <b>G5-2</b>         | 2,12 | 1,08 | 0,61 |
| <b>G5-3</b>         | 0,82 | 1,55 | 0,67 |
| <b>G5-4</b>         | 1,52 | 1,54 | 0,97 |
| <b>G5-5</b>         | 0,68 | 1,42 | 0,74 |
| <b>G5 ortalama</b>  | 1,36 | 1,36 | 0,77 |
| <b>G6-1</b>         | 1,66 | 0,98 | 0,91 |
| <b>G6-2</b>         | 3,16 | 1,17 | 0,69 |
| <b>G6-3</b>         | 1,50 | 1,47 | 0,68 |
| <b>G6-4</b>         | 0,37 | 0,98 | 3,83 |
| <b>G6-5</b>         | 1,44 | 1,05 | 0,51 |
| <b>G6 ortalama</b>  | 1,63 | 1,13 | 1,32 |
| <b>G7-1</b>         | 0,75 | 0,97 | 0,55 |
| <b>G7-2</b>         | 0,59 | 1,08 | 1,15 |
| <b>G7-3</b>         | 1,18 | 1,35 | 0,64 |
| <b>G7-4</b>         | 0,59 | 1,33 | 0,83 |
| <b>G7-5</b>         | 1,53 | 1,48 | 0,76 |
| <b>G7 ortalama</b>  | 0,93 | 1,24 | 0,79 |
| <b>G8-1</b>         | 0,85 | 1,38 | 0,53 |
| <b>G8-2</b>         | 1,76 | 1,19 | 1,03 |
| <b>G8-3</b>         | 1,34 | 0,91 | 8,61 |
| <b>G8-4</b>         | 0,22 | 1,34 | 2,93 |
| <b>G8-5</b>         | 0,89 | 1,35 | 0,69 |
| <b>G8 ortalama</b>  | 1,01 | 1,23 | 2,75 |
| <b>G9-1</b>         | 0,34 | 1,43 | 2,43 |
| <b>G9-2</b>         | 1,43 | 1,03 | 0,58 |
| <b>G9-3</b>         | 1,45 | 1,03 | 0,60 |
| <b>G9-4</b>         | 1,16 | 1,23 | 0,88 |
| <b>G9-5</b>         | 1,01 | 2,06 | 1,51 |
| <b>G9 ortalama</b>  | 1,08 | 1,36 | 1,20 |
| <b>G10-1</b>        | 1,40 | 2,04 | 2,44 |
| <b>G10-2</b>        | 2,02 | 1,25 | 0,72 |
| <b>G10-3</b>        | 1,59 | 3,87 | 3,79 |
| <b>G10-4</b>        | 2,16 | 0,75 | 0,74 |
| <b>G10-5</b>        | 1,08 | 0,84 | 0,53 |
| <b>G10 ortalama</b> | 1,65 | 1,75 | 1,65 |

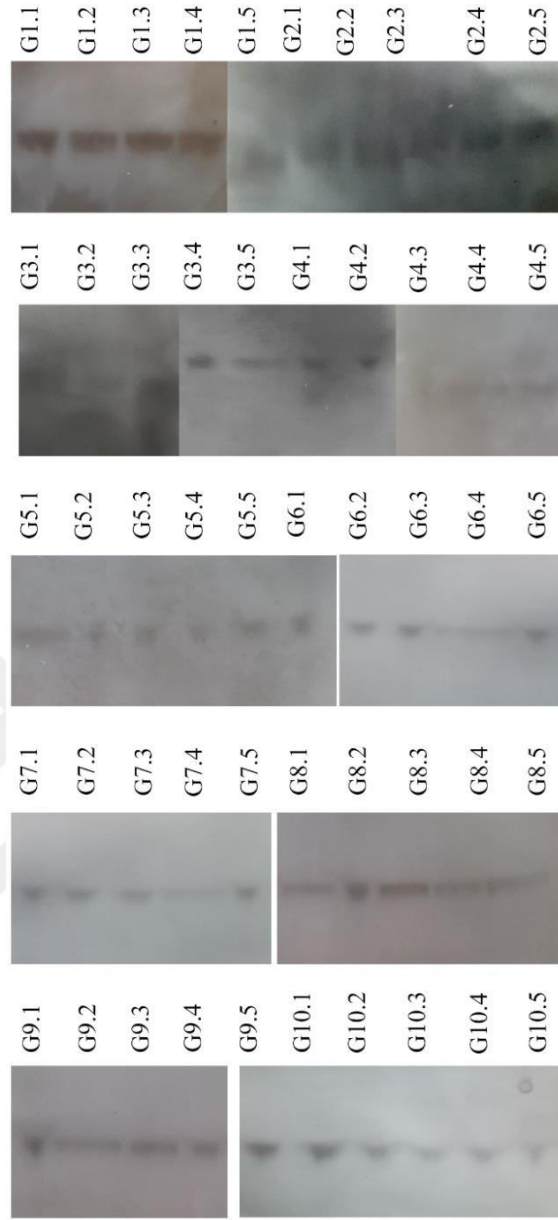
## 6.2. SDS-PAGE Sonrası Western-blot Sonuçları

Tüm deney gruplarında toplam 100 örnekte Western-blot deneyleri gerçekleştirilmiş; MMP-9, PTEN ve Notch1 protein ifadeleri aynı örneğe ait internal kontrol gen olarak kullanılan  $\beta$ -Aktin ifadesine göre normalize edilmiştir.

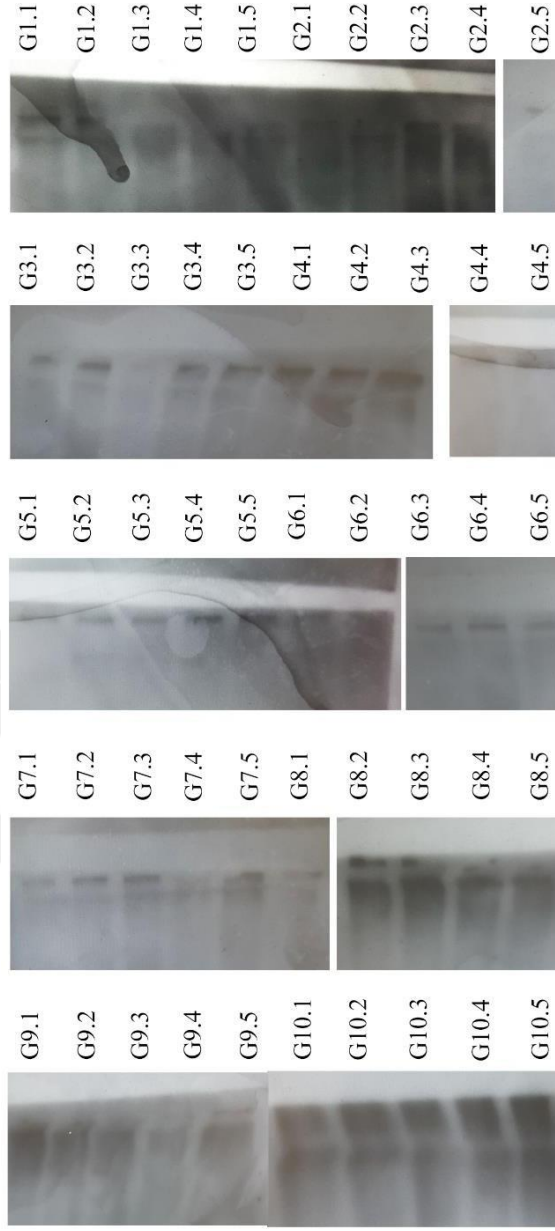
Resim 6.2.1., 6.2.2., 6.2.3.'de sırası ile MMP-9, PTEN ve Notch1 proteinlerine ait Western-blot sonuçları ve Resim 6.2.4.'te ise  $\beta$ -Aktin'e ait sonuçlar verilmiştir.



**Resim 6.2.1.** MMP-9 proteinine ait Western-blot sonuçları



**Resim 6.2.2.** PTEN proteinine ait Western-blot sonuçları



**Resim 6.2.3.** Notch1 proteinine ait Western-blot sonuçları



**Resim 6.2.4.**  $\beta$ -Aktin proteinine ait Western-blot sonuçları

Tüm örneklerde Western-blot deneyleri gerçekleştirildikten sonra her bir örneğe ait protein bant yoğunluğu *ImageJ* Programı kullanılarak analiz edilmiştir. Her örnekte aynı örneğe ait  $\beta$ -Aktin bant yoğunluğuna göre aynı örnekteki bant yoğunluğu normalize edilmiştir.

Bu şekilde her bir örnekteki protein ifade düzeyi belirlenmiştir. Kontrol grubu (Grup 1) referans alınarak tüm örneklerdeki protein ifadesi düzeyi hesaplanmıştır ve kat değişim değeri olarak tabloda sunulmuştur (Tablo 6.2.1.).

**Tablo 6.2.1.** Tüm örneklerdeki protein ifadesi kat değişim değeri (r)

| Grup (G) | PTEN | MMP-9 | Notch1 |
|----------|------|-------|--------|
| G1       | 1,00 | 1,00  | 1,00   |
| G2       | 0,17 | 1,00  | 0,35   |
| G3       | 0,41 | 4,25  | 2,87   |
| G4       | 0,11 | 1,33  | 1,56   |
| G5       | 0,32 | 1,36  | 4,87   |
| G6       | 0,50 | 2,39  | 2,69   |
| G7       | 0,70 | 1,76  | 2,59   |
| G8       | 0,62 | 1,92  | 1,93   |
| G9       | 0,93 | 5,51  | 8,10   |
| G10      | 0,82 | 3,19  | 2,38   |

Grup 1 referans grup kabul edilmiş ve protein ifadesi “1” yani %100 kabul edilerek deney gruplarına ait örneklerdeki protein ifadesi değişimi kat cinsinden belirlenmiştir. Yapılan hesaplamalar sonucunda grup 2’de MMP-9 ifadesi değişmemiş, Notch1 ifadesi %65 ( $r=0,35$ ) azalmış ve PTEN ifadesinin ise %83 ( $r=0,17$ ) azaldığı belirlenmiştir.

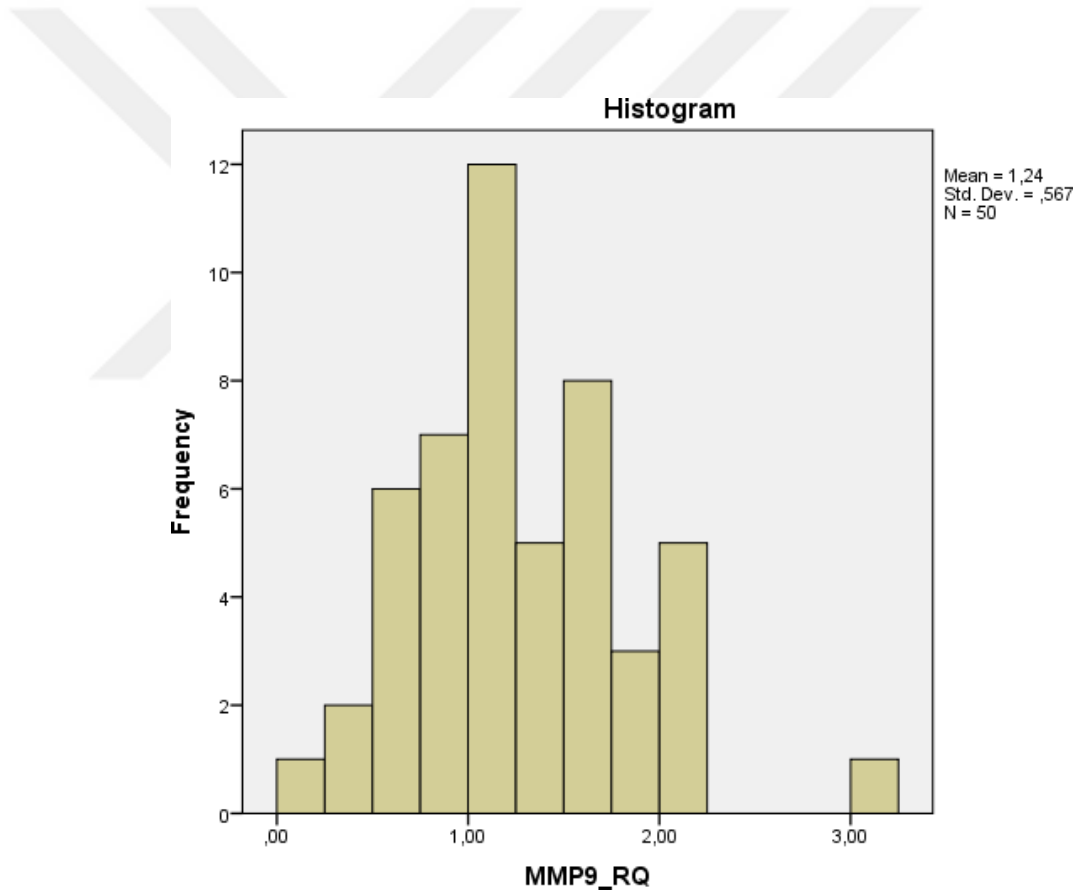
Grup 3’de MMP-9 ifadesi 4,25 kat, Notch1 ifadesi 2,87 kat artmış ancak PTEN ifadesi ise %59 ( $r=0,41$ ) azalmıştır. Grup 4’te MMP-9 ifadesi 1,33 kat, Notch1 ifadesi 1,51 kat artmış ve PTEN ifadesi ise %89 ( $r=0,11$ ) azalmıştır.

Grup 5’te MMP-9 ifadesi 1,36 kat, Notch1 ifadesi 4,87 kat artmış ve PTEN ifadesi ise %68 ( $r=0,32$ ) azalmıştır. Grup 6’da MMP-9 ifadesi 2,39 kat, Notch1 ifadesi 2,69 kat artmış ve PTEN ifadesi ise %50 ( $r=0,50$ ) azalmıştır.

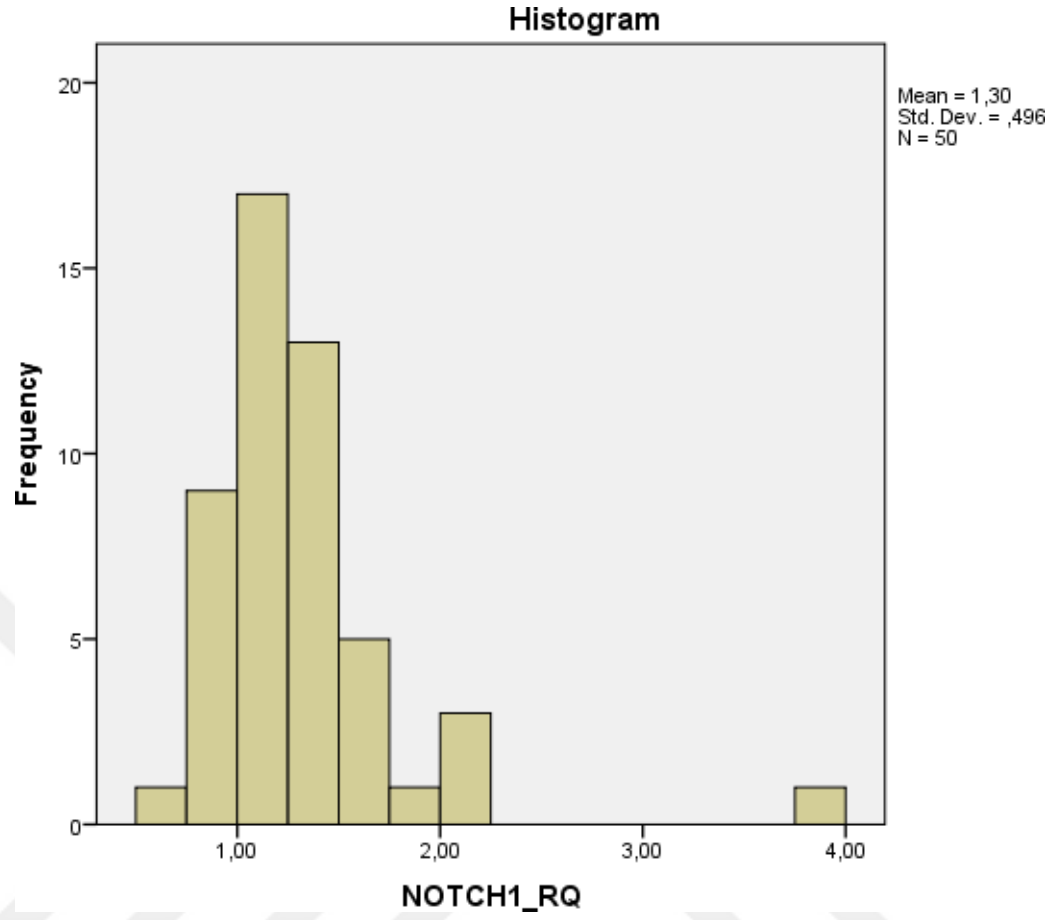
Grup 7’de MMP-9 ifadesi 1,76 kat, Notch1 ifadesi 2,59 kat artmış ve PTEN ifadesi ise %30 ( $r=0,70$ ) azalmıştır. Grup 8’de MMP-9 ifadesi 1,92 kat, Notch1 ifadesi 1,93 kat artmış ve PTEN ifadesi ise %38 ( $r=0,62$ ) azalmıştır.

Grup 9’da MMP-9 ifadesi 5,51 kat, Notch1 ifadesi ise 8,10 kat artmıştır bu grupta PTEN ifadesi ( $r=0,93$ ) değişmeden kalmıştır.

Grup 10’da MMP-9 ifadesi 3,19 kat, Notch1 ifadesi 2,38 kat artmış ve PTEN gen ifadesi ise %18 ( $r=0,82$ ) azalmıştır (Tablo 6.2.1.). Normallik varsayımı için incelenen histogram grafiklerde verilerin çarpık dağılıma yakın bir dağılım sergilediğini göstermektedir (Şekil 6.2.1., Şekil 6.2.2. ve Şekil 6.2.3).

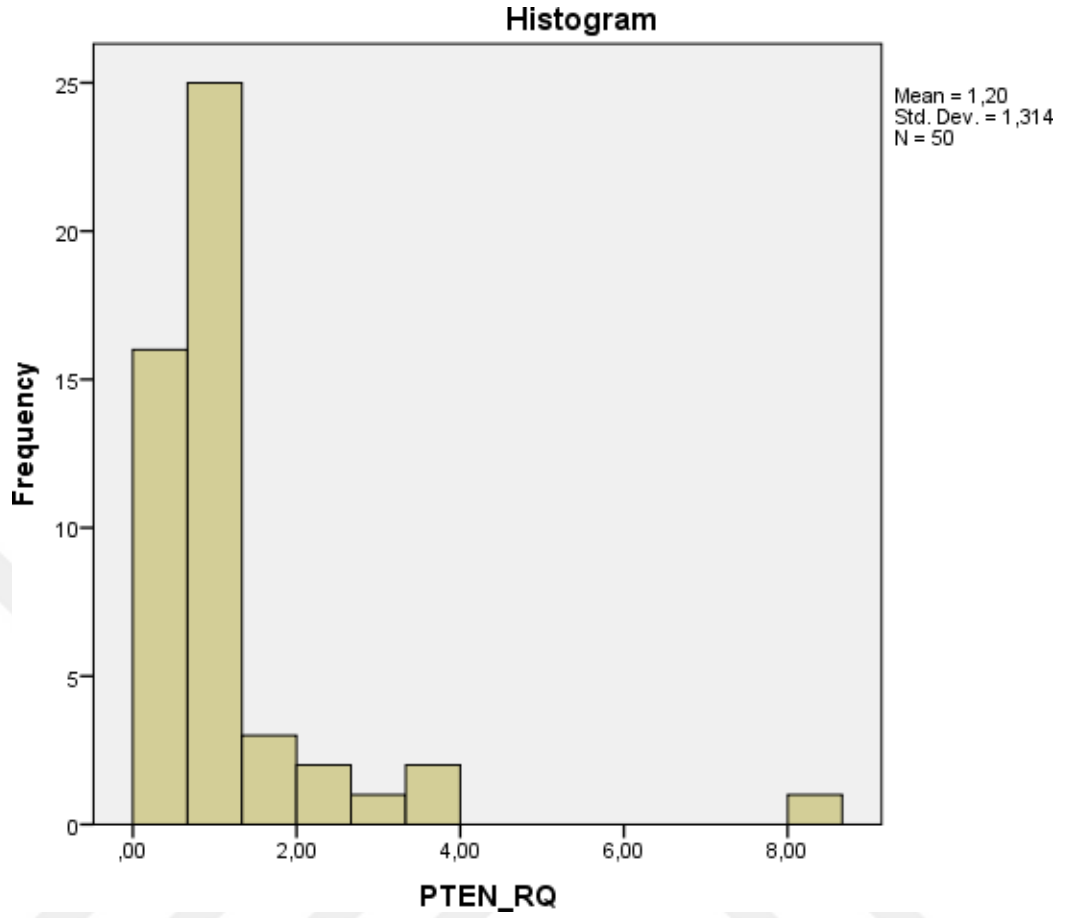


Şekil 6.2.1. Deneklerin RQ değerlerindeki MMP-9 değişkenine ait histogram



Şekil 6.2.2. Deneklerin RQ değerlerindeki Notch1 değişkenine ait histogram





**Şekil 6.2.3.** Deneklerin RQ değerlerindeki PTEN değişkenine ait histogram

Tablo 6.2.2.'de araştırma değişkenlerine ait tanımlayıcı istatistikler yer almaktadır. RQ değerlerinde en düşük ortalama 1,20 ile PTEN değerine, en yüksek ortalama ise 1,30 ile Notch1 değerine aittir. Western-blot değerlerinde ise en düşük ortalama 3994224,16 ile Notch1 değerine; en yüksek ortalama 21215642,82 değerine aittir. Değişkenlerin normal dağılım sergileyip sergilemediğini öğrenmek için basıklık ve çarpıklık değerlerine bakılmıştır. Çarpıklık değerleri 0,38 ile 4,18 aralığında basıklık değerleri ise -0,74 ile 20,98 aralığında yer almaktadır. Basıklık ve çarpıklık değerleri incelendiğinde sadece RQ puanlarında MMP-9 değişkeni ile Western-blot puanlarında  $\beta$ -Aktin değerlerinin normal dağılım sergilediği görülmektedir.

**Tablo 6.2.2.** Araştırma değişkenlerine ait tanımlayıcı istatistikler

| Analiz | Genler         | N  | Ort         | SS         | Çarpıklık | Basıklık |
|--------|----------------|----|-------------|------------|-----------|----------|
| RQ     | MMP-9          | 50 | 1,24        | ,57        | 75        | 1,23     |
|        | Notch1         | 50 | 1,30        | ,50        | 3,06      | 14,02    |
|        | PTEN           | 50 | 1,20        | 1,31       | 4,18      | 20,98    |
| WB     | $\beta$ -Aktin | 50 | 21215642,82 | 9979904,48 | ,38       | -,74     |
|        | PTEN           | 50 | 7147158,16  | 6414904,34 | 2,28      | 5,37     |
|        | MMP-9          | 50 | 4899217,88  | 3081270,36 | 2,16      | 7,34     |
|        | Notch1         | 50 | 3994224,16  | 3432474,28 | 2,45      | 8,79     |

RQ: göreceli miktar (*relative quantity*) ve WB: Western-blot'ı, SS ise standart sapmayı simgelemektedir.

Araştırma değişkenlerinin çoğunun normallik varsayımını karşılamaması ve gruplara düşen denek sayısının (n=5) az olması nedeniyle verilerin analizinde non-parametrik yöntemler kullanılmıştır. Bu kapsamda deney ve kontrol gruplarına göre RT-qPCR (RQ) ve Western-blot (r) değerlerinin karşılaştırılması için Kruskal Wallis H-Testi kullanılmıştır. Bu test sonucunda anlamlı farklılık görülen değişkenler arasında, farklılığın hangi gruplardan kaynaklandığını belirlemek için Mann Whitney U-Testi kullanılmıştır. Verilerin analizinde hata payı  $\alpha=0,01$  olarak belirlenmiştir.

### 6.3. Deney ve kontrol gruplarının RQ değerlerine ait karşılaştırmalar

Bu bölümde deney ve kontrol gruplarının RQ değerlerini karşılaştırmak amacıyla elde edilen bulgular yer almaktadır.

#### 6.3.1. Gruplar arası MMP-9 değerlerinin karşılaştırılmasına ait bulgular

Tablo 6.3.1.'de deney ve kontrol gruplarının MMP-9 değerlerine ait tanımlayıcı istatistikler yer almaktadır. Deneklere ait en düşük ortalama 7.grupta (0,93) gözlenirken, en yüksek ortalama 10.grupta (1,65) gözlenmektedir (Tablo 6.3.1.).

**Tablo 6.3.1.** MMP-9 RQ değerlerine ait tanımlayıcı istatistikler

| Gruplar  | N | Ort  | SS  |
|----------|---|------|-----|
| 1. Grup  | 5 | 1,00 | ,00 |
| 2. Grup  | 5 | 1,25 | ,62 |
| 3. Grup  | 5 | 1,50 | ,47 |
| 4. Grup  | 5 | 1,01 | ,45 |
| 5. Grup  | 5 | 1,36 | ,60 |
| 6. Grup  | 5 | 1,63 | ,99 |
| 7. Grup  | 5 | ,93  | ,41 |
| 8. Grup  | 5 | 1,01 | ,58 |
| 9. Grup  | 5 | 1,08 | ,45 |
| 10. Grup | 5 | 1,65 | ,44 |

Ort: Ortalamayı, SS ise standart sapmayı simgelemektedir.

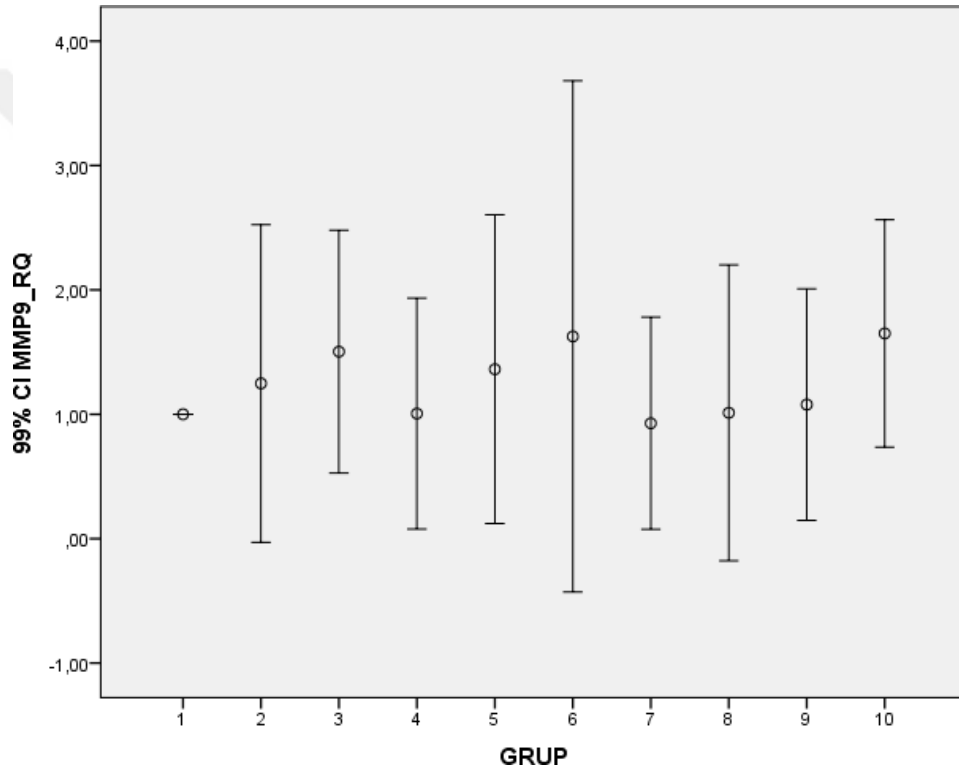
Tablo 6.3.2’de deney ve kontrol gruplarının MMP-9 değerlerinin karşılaştırılması amacıyla yapılan Kruskal Wallis H-Testi yer almaktadır (Tablo 6.3.2.).

**Tablo 6.3.2.** Gruplar arası MMP-9 RQ değerlerinin karşılaştırılması

| Gruplar  | N | Sıra Ortalamaları | Sd | $\chi^2$ | P  | Fark |
|----------|---|-------------------|----|----------|----|------|
| 1. Grup  | 5 | 19,00             |    |          |    |      |
| 2. Grup  | 5 | 26,10             |    |          |    |      |
| 3. Grup  | 5 | 34,00             |    |          |    |      |
| 4. Grup  | 5 | 18,70             |    |          |    |      |
| 5. Grup  | 5 | 28,70             |    |          |    |      |
| 6. Grup  | 5 | 31,40             | 9  | 10,848   | 29 | -    |
| 7. Grup  | 5 | 16,80             |    |          |    |      |
| 8. Grup  | 5 | 20,00             |    |          |    |      |
| 9. Grup  | 5 | 22,90             |    |          |    |      |
| 10. Grup | 5 | 37,40             |    |          |    |      |

Tablo 6.3.2.'de yer alan analize göre deney ve kontrol gruplarına göre deneklerin MMP-9 değerlerinde anlamlı farklılık görülmemektedir,  $\chi^2=10,848$ ;  $p>0,01$ .

Şekil 6.3.1.'de ise deney ve kontrol gruplarına göre MMP-9 değerlerinde gözlenen farklılık için yapılan hata çubuk grafiği yer almaktadır. Hata çubuk grafiği de grupların birbirine benzer sonuçlara sahip olduğunu göstermektedir (Şekil 6.3.1.).



Şekil 6.3.1. MMP-9 RQ değerlerine ait hata çubuk grafiği

### 6.3.2. Gruplar arası Notch1 değerlerinin karşılaştırılmasına ait bulgular

Tablo 6.3.3.'de deney ve kontrol gruplarının Notch1 değerlerine ait tanımlayıcı istatistikler yer almaktadır. Deneklere ait en düşük ortalama 1.grupta (1,00) gözlenirken, en yüksek ortalama 10.grupta (1,75) gözlenmektedir (Tablo 6.3.3.).

**Tablo 6.3.3.** Notch1 RQ değerlerine ait tanımlayıcı istatistikler

| Gruplar  | N | Ort  | SS   |
|----------|---|------|------|
| 1. Grup  | 5 | 1,00 | ,00  |
| 2. Grup  | 5 | 1,26 | ,40  |
| 3. Grup  | 5 | 1,20 | ,38  |
| 4. Grup  | 5 | 1,51 | ,45  |
| 5. Grup  | 5 | 1,35 | ,20  |
| 6. Grup  | 5 | 1,13 | ,20  |
| 7. Grup  | 5 | 1,24 | ,20  |
| 8. Grup  | 5 | 1,23 | ,19  |
| 9. Grup  | 5 | 1,35 | ,42  |
| 10. Grup | 5 | 1,75 | 1,29 |

Ort: Ortalamayı, SS ise standart sapmayı simgelemektedir.

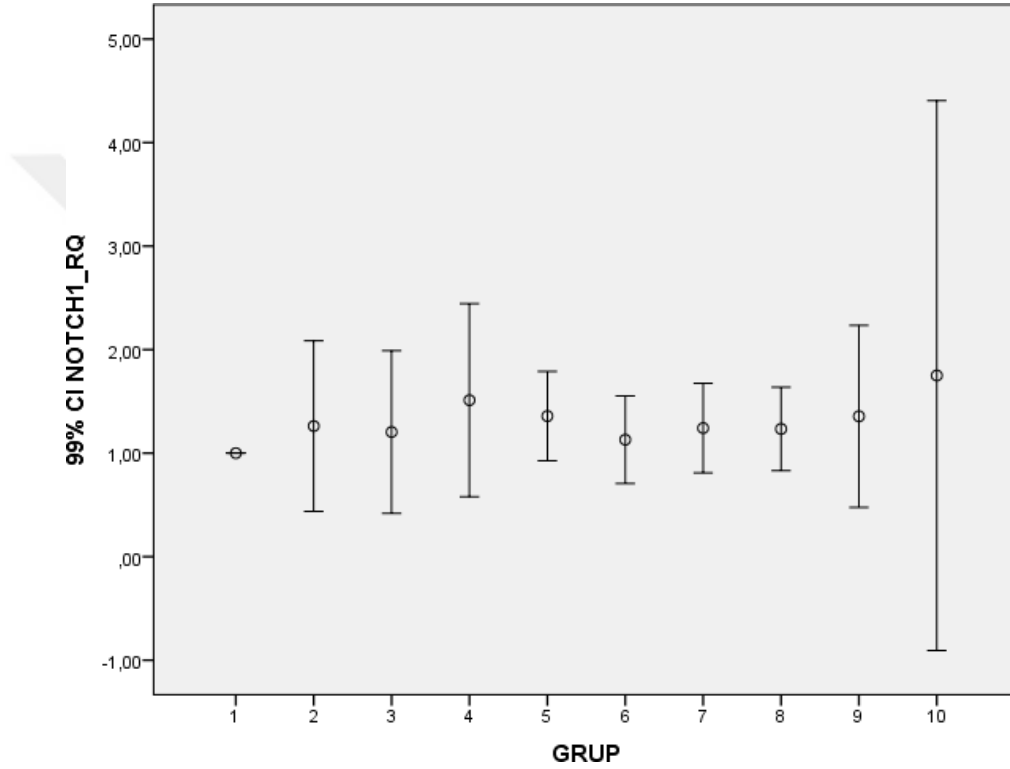
Tablo 6.3.4.'de deney ve kontrol gruplarının Notch1 değerlerinin karşılaştırılması amacıyla yapılan Kruskal Wallis H-Testi yer almaktadır (Tablo 6.3.4.).

**Tablo 6.3.4.** Gruplar arası Notch1 RQ değerlerinin karşılaştırılması

| Gruplar  | N | Sıra Ortalamaları | Sd | $\chi^2$ | P   | Fark |
|----------|---|-------------------|----|----------|-----|------|
| 1. Grup  | 5 | 13,00             |    |          |     |      |
| 2. Grup  | 5 | 27,00             |    |          |     |      |
| 3. Grup  | 5 | 20,80             |    |          |     |      |
| 4. Grup  | 5 | 34,90             |    |          |     |      |
| 5. Grup  | 5 | 33,10             |    |          |     |      |
| 6. Grup  | 5 | 19,90             | 9  | 8,771    | ,46 | -    |
| 7. Grup  | 5 | 25,90             |    |          |     |      |
| 8. Grup  | 5 | 25,20             |    |          |     |      |
| 9. Grup  | 5 | 29,20             |    |          |     |      |
| 10. Grup | 5 | 26,00             |    |          |     |      |

Tablo 6.3.4.'de yer alan analize göre deney ve kontrol gruplarına göre deneklerin Notch1 değerlerinde anlamlı farklılık görülmemektedir,  $\chi^2=8,771$ ;  $p>0,01$ .

Şekil 6.3.2.'de ise deney ve kontrol gruplarına göre Notch1 değerlerinde gözlenen farklılık için yapılan hata çubuk grafiği yer almaktadır. Hata çubuk grafiği de grupların birbirine benzer sonuçlara sahip olduğunu göstermektedir (Şekil 6.3.2.).



Şekil 6.3.2. Notch1 RQ değerlerine ait hata çubuk grafiği

### 6.3.3 Gruplar arası PTEN değerlerinin karşılaştırılmasına ait bulgular

Tablo 6.3.5.'de deney ve kontrol gruplarının PTEN değerlerine ait tanımlayıcı istatistikler yer almaktadır. Deneklere ait en düşük ortalama 4.grupta (0,66) gözlenirken, en yüksek ortalama 8.grupta (2,75) gözlenmektedir (Tablo 6.3.5.).

**Tablo 6.3.5.** PTEN RQ değerlerine ait tanımlayıcı istatistikler

| Gruplar  | N | Ort  | SS   |
|----------|---|------|------|
| 1. Grup  | 5 | 1.00 | .00  |
| 2. Grup  | 5 | .80  | .23  |
| 3. Grup  | 5 | 1.03 | .59  |
| 4. Grup  | 5 | .66  | .18  |
| 5. Grup  | 5 | .76  | .14  |
| 6. Grup  | 5 | 1.32 | 1.40 |
| 7. Grup  | 5 | .78  | .23  |
| 8. Grup  | 5 | 2.75 | 3.40 |
| 9. Grup  | 5 | 1.20 | .78  |
| 10. Grup | 5 | 1.64 | 1.42 |

Ort: Ortalamayı, SS ise standart sapmayı simgelemektedir.

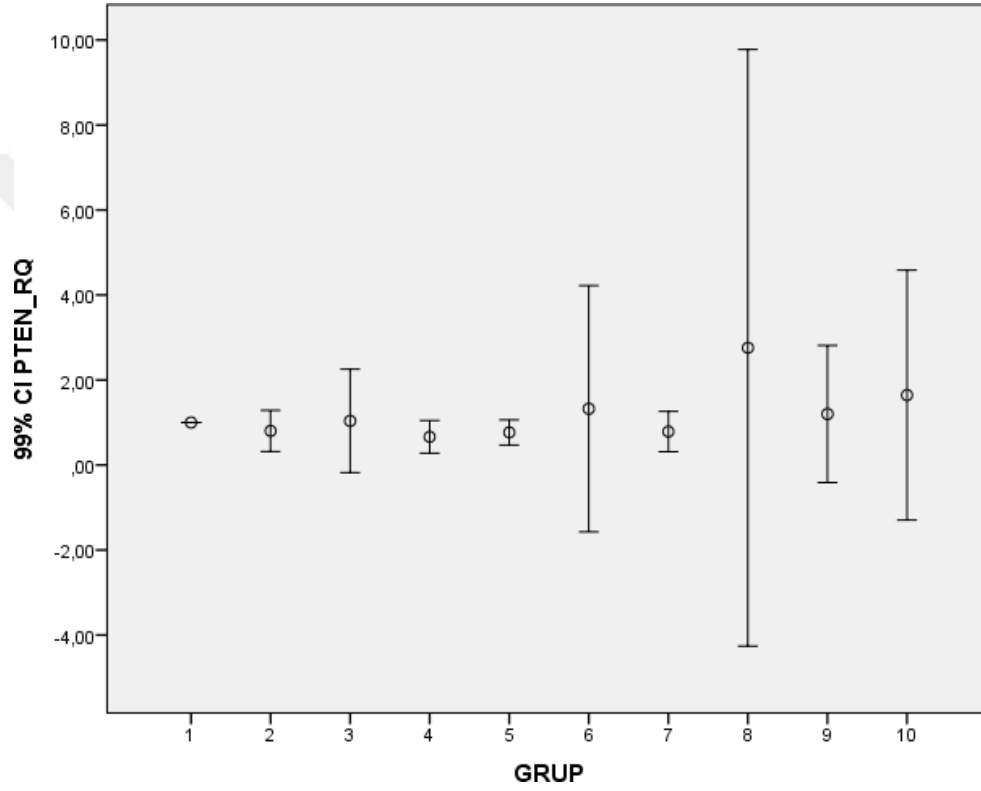
Tablo 6.3.6.'de deney ve kontrol gruplarının PTEN değerlerinin karşılaştırılması amacıyla yapılan Kruskal Wallis H-Testi yer almaktadır (Tablo 6.3.6.).

**Tablo 6.3.6.** Gruplar arası PTEN RQ değerlerinin karşılaştırılması

| Gruplar  | N | Sıra Ortalamaları | Sd | $\chi^2$ | P   | Fark |
|----------|---|-------------------|----|----------|-----|------|
| 1. Grup  | 5 | 36,00             |    |          |     |      |
| 2. Grup  | 5 | 23,60             |    |          |     |      |
| 3. Grup  | 5 | 24,60             |    |          |     |      |
| 4. Grup  | 5 | 13,60             |    |          |     |      |
| 5. Grup  | 5 | 22,80             |    |          |     |      |
| 6. Grup  | 5 | 23,80             | 9  | 7,727    | ,56 | -    |
| 7. Grup  | 5 | 22,80             |    |          |     |      |
| 8. Grup  | 5 | 31,80             |    |          |     |      |
| 9. Grup  | 5 | 27,00             |    |          |     |      |
| 10. Grup | 5 | 29,00             |    |          |     |      |

Tablo 6.3.6.'da yer alan analize göre deney ve kontrol gruplarına göre deneklerin PTEN değerlerinde anlamlı farklılık görülmemektedir,  $\chi^2=7,727$ ;  $p>0,01$ .

Şekil 6.3.3.'de ise deney ve kontrol gruplarına göre PTEN değerlerinde gözlenen farklılık için yapılan hata çubuk grafiği yer almaktadır. Hata çubuk grafiği de grupların birbirine benzer sonuçlara sahip olduğunu göstermektedir (Şekil 6.3.3.).

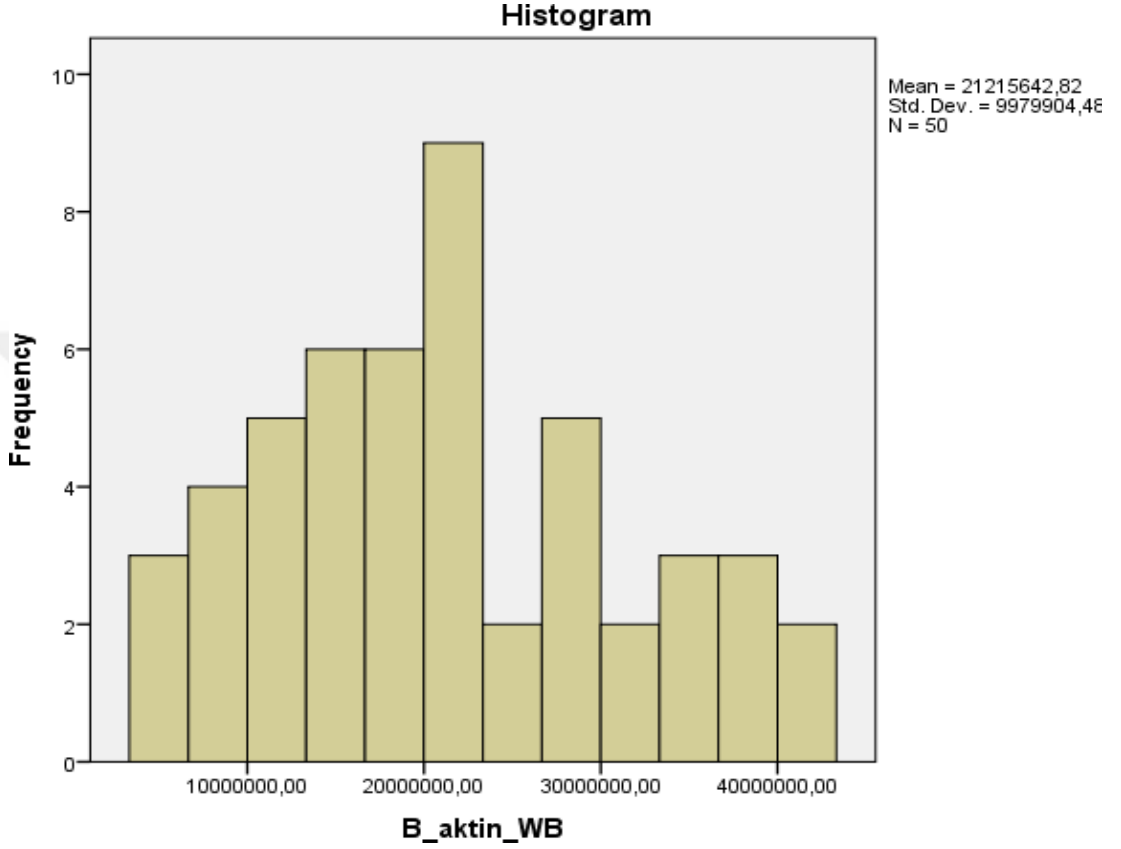


Şekil 6.3.3. PTEN RQ değerlerine ait hata çubuk grafiği

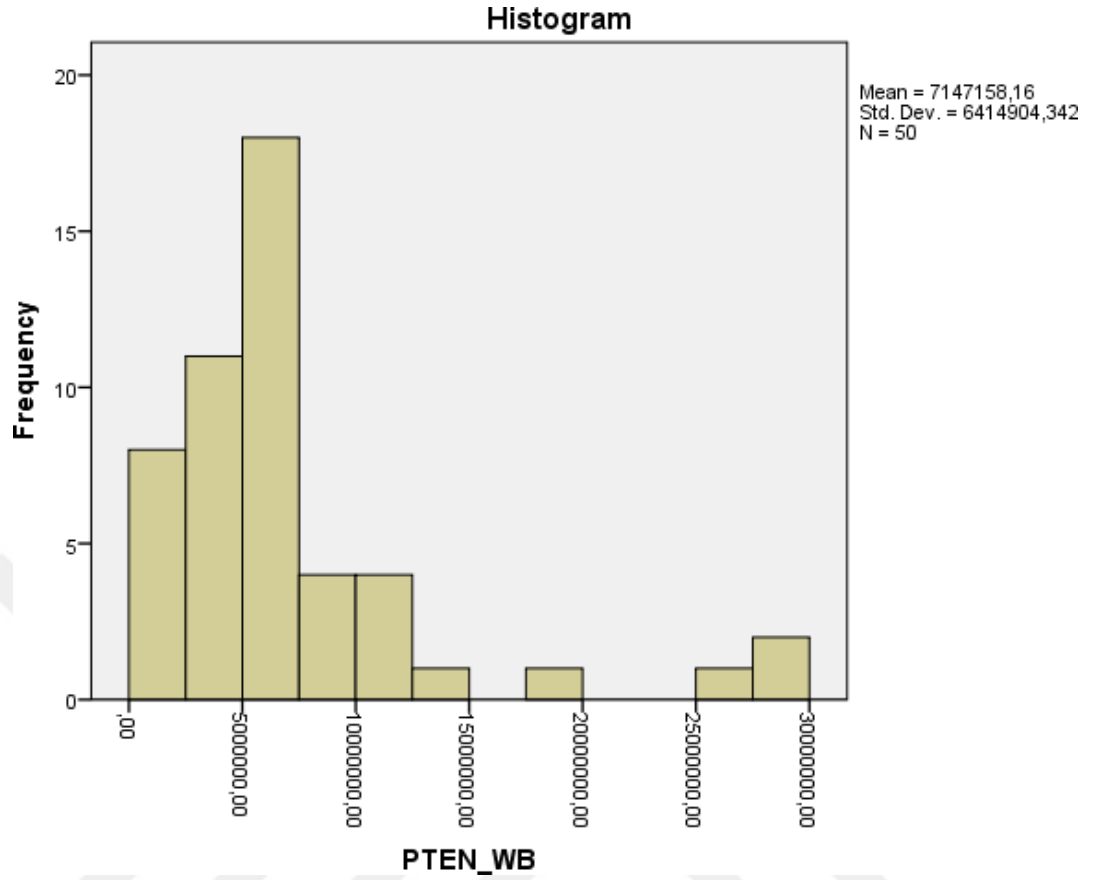


#### 6.4. Gruplar arası Western-blot değerlerine ait karşılaştırmalar

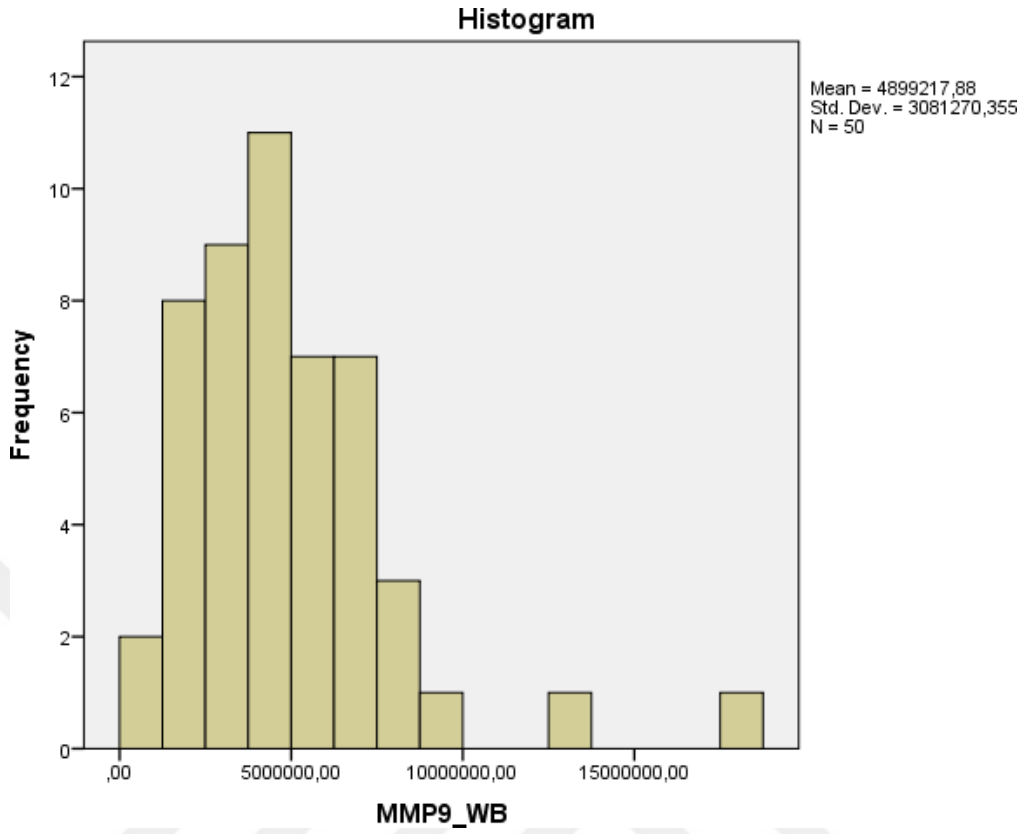
Bu bölümde deney ve kontrol gruplarının Western-blot değerlerini karşılaştırmak amacıyla elde edilen bulgular yer almaktadır.



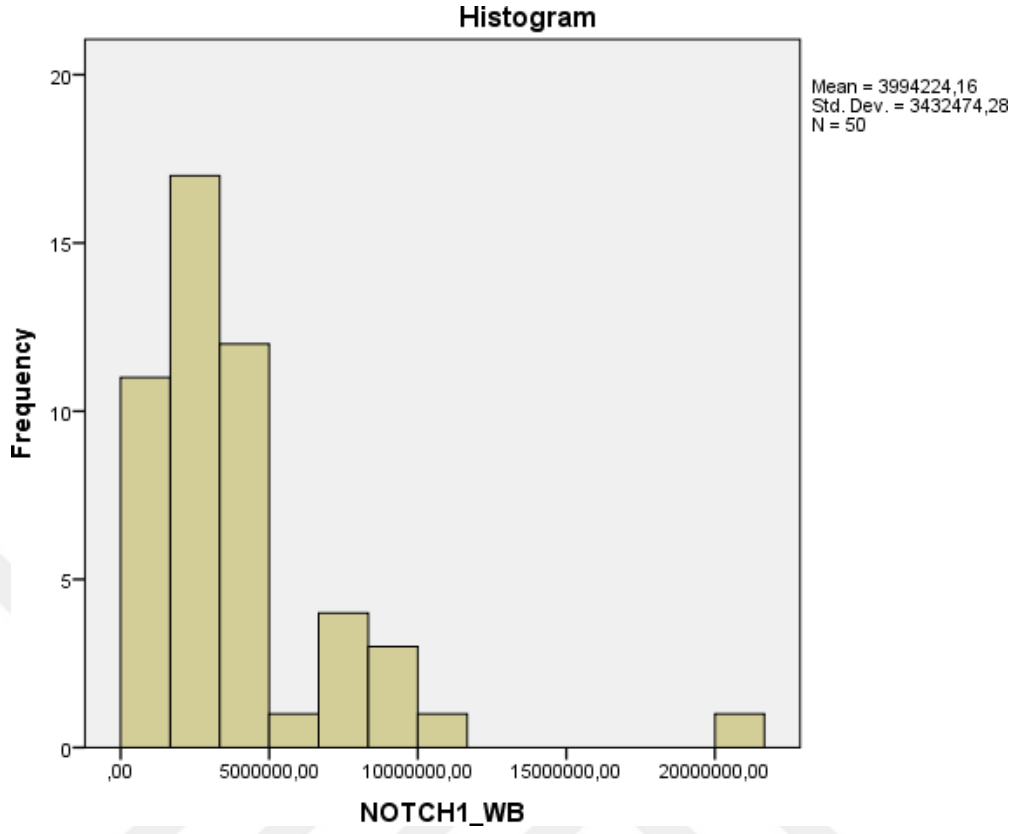
Şekil 6.4.1. Deneklerin “r” değerlerindeki  $\beta$ -Aktin değişkenine ait histogram



Şekil 6.4.2. Deneklerin “r” değerlerindeki PTEN değişkenine ait histogram



**Şekil 6.4.3.** Deneklerin “r” değerlerindeki MMP-9 değişkenine ait histogram



**Şekil 6.4.4.** Deneklerin “r” değerlerindeki Notch1 değişkenine ait histogram

#### **6.4.1. Gruplar arası $\beta$ -Aktin değerlerinin karşılaştırılmasına ait bulgular**

Tablo 6.4.1.’de deney ve kontrol gruplarının  $\beta$ -Aktin değerlerine ait tanımlayıcı istatistikler yer almaktadır. Deneklere ait en düşük ortalama 10.grupta (10873943,80) gözlenirken, en yüksek ortalama 1.grupta (34298176,20) gözlenmektedir (Tablo 6.4.1.).

**Tablo 6.4.1.**  $\beta$ -Aktin “r” değerlerine ait tanımlayıcı istatistikler

| Gruplar  | N | Ort         | SS          |
|----------|---|-------------|-------------|
| 1. Grup  | 5 | 34298176,20 | 7607623,42  |
| 2. Grup  | 5 | 30782846,20 | 9291840,15  |
| 3. Grup  | 5 | 16019044,60 | 4564758,26  |
| 4. Grup  | 5 | 28921325,40 | 10328908,21 |
| 5. Grup  | 5 | 25655193,40 | 3332944,90  |
| 6. Grup  | 5 | 21171365,00 | 3411483,32  |
| 7. Grup  | 5 | 14150733,60 | 9113200,59  |
| 8. Grup  | 5 | 18815234,60 | 2446300,23  |
| 9. Grup  | 5 | 11468565,40 | 6271919,92  |
| 10. Grup | 5 | 10873943,80 | 3770174,65  |

Ort: Ortalamayı, SS ise standart sapmayı simgelemektedir.

Tablo 6.4.2.’de deney ve kontrol gruplarının  $\beta$ -Aktin değerlerinin karşılaştırılması amacıyla yapılan Kruskal Wallis H-Testi yer almaktadır.

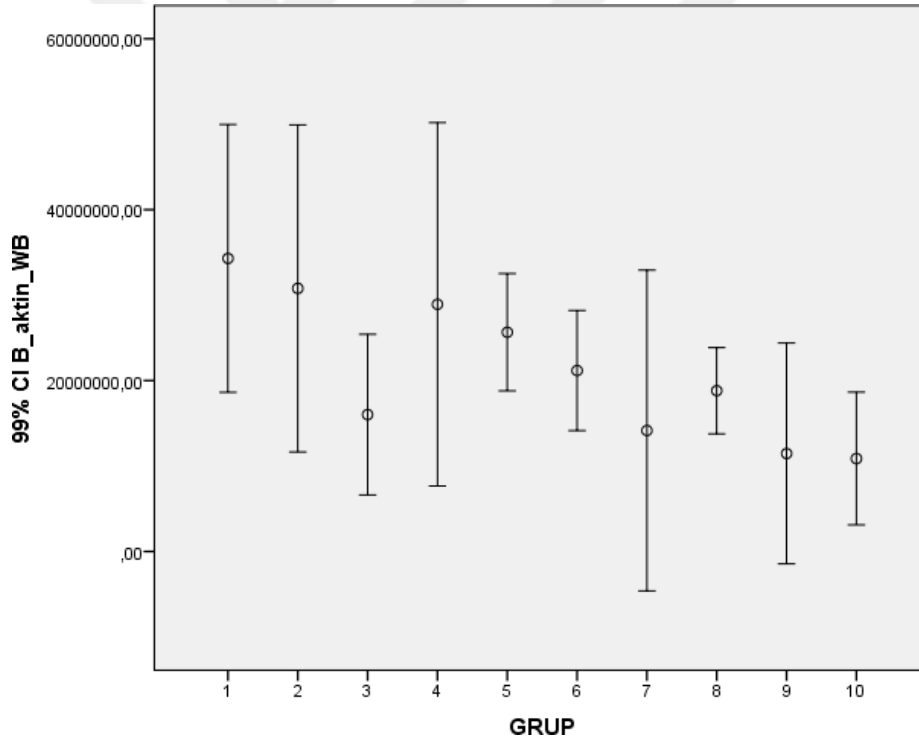
**Tablo 6.4.2.** Gruplar arası  $\beta$ -Aktin “r” değerlerinin karşılaştırılması

| GRUP     | N | Sıra Ortalamaları | Sd | $\chi^2$ | p Fark    |
|----------|---|-------------------|----|----------|-----------|
| 1. Grup  | 5 | 42,60             |    |          |           |
| 2. Grup  | 5 | 39,20             |    |          |           |
| 3. Grup  | 5 | 17,80             |    |          |           |
| 4. Grup  | 5 | 36,20             |    |          | 1 - 8, 10 |
| 5. Grup  | 5 | 34,80             |    |          | 2-10      |
| 6. Grup  | 5 | 26,80             | 9  | 31,409   | 000       |
| 7. Grup  | 5 | 14,20             |    |          | 5 - 8, 10 |
| 8. Grup  | 5 | 22,60             |    |          | 6-10      |
| 9. Grup  | 5 | 11,00             |    |          | 8-10      |
| 10. Grup | 5 | 9,80              |    |          |           |

Tablo 6.4.2.'de yer alan analize göre deney ve kontrol gruplarına göre deneklerin  $\beta$ -Aktin değerlerinde anlamlı farklılık görölmektedir,  $\chi^2=31,409$ ;  $p<0,01$ .

Gruplar arasındaki farklılığın hangi gruplardan kaynaklandığını belirlemek için tüm ikili gruplar Mann Whitney U-Testi yapılmıştır. Yapılan analiz sonucunda  $\beta$ -Aktin ortalamalarında 1.grup, 2.grup, 5.grup, 6.grup ve 8.grubun 10.gruba göre anlamlı oranda daha yüksek olduğu; 1.grup ve 5.grubun ise 8.gruba göre daha yüksek ortalamaya sahip olduğu bulunmuştur ( $p<0,01$ ).

Şekil 6.4.5'de ise deney ve kontrol gruplarına göre  $\beta$ -Aktin değerlerinde gözlenen farklılık için yapılan hata çubuk grafiği yer almaktadır. Hata çubuk grafiği de anlamlı farklılık görölen gruplar arasındaki farklılığı belirtmektedir (Şekil 6.4.5).



Şekil 6.4.5.  $\beta$ -Aktin "r" değerlerine ait hata çubuk grafiği

#### 6.4.2. Gruplar arası PTEN değerlerinin karşılaştırılmasına ait bulgular

Tablo 6.4.3.'de deney ve kontrol gruplarının PTEN değerlerine ait tanımlayıcı istatistikler yer almaktadır. Deneklere ait en düşük ortalama 4.grupta (2045479,00) gözlenirken, en yüksek ortalama 1.grupta (22456200,20) gözlenmektedir (Tablo 6.4.3.).

**Tablo 6.4.3.** PTEN “r” değerlerine ait tanımlayıcı istatistikler

| Gruplar  | N | Ort         | SS         |
|----------|---|-------------|------------|
| 1. Grup  | 5 | 22456200,20 | 8770394,71 |
| 2. Grup  | 5 | 3478942,60  | 2415542,76 |
| 3. Grup  | 5 | 4279606,20  | 2187396,95 |
| 4. Grup  | 5 | 2045479,00  | 854222,26  |
| 5. Grup  | 5 | 5302947,40  | 3311346,89 |
| 6. Grup  | 5 | 6898009,20  | 1642848,64 |
| 7. Grup  | 5 | 6454503,80  | 3207806,41 |
| 8. Grup  | 5 | 7693595,00  | 2608196,18 |
| 9. Grup  | 5 | 7001827,00  | 2761552,44 |
| 10. Grup | 5 | 5860471,20  | 4178433,51 |

Ort: Ortalamayı, SS ise standart sapmayı simgelemektedir.

Tablo 6.4.4.'de deney ve kontrol gruplarının PTEN değerlerinin karşılaştırılması amacı ile yapılan Kruskal Wallis H-Testi yer almaktadır (Tablo 6.4.4.).

**Tablo 6.4.4.** Gruplar arası PTEN “r” değerlerinin karşılaştırılması

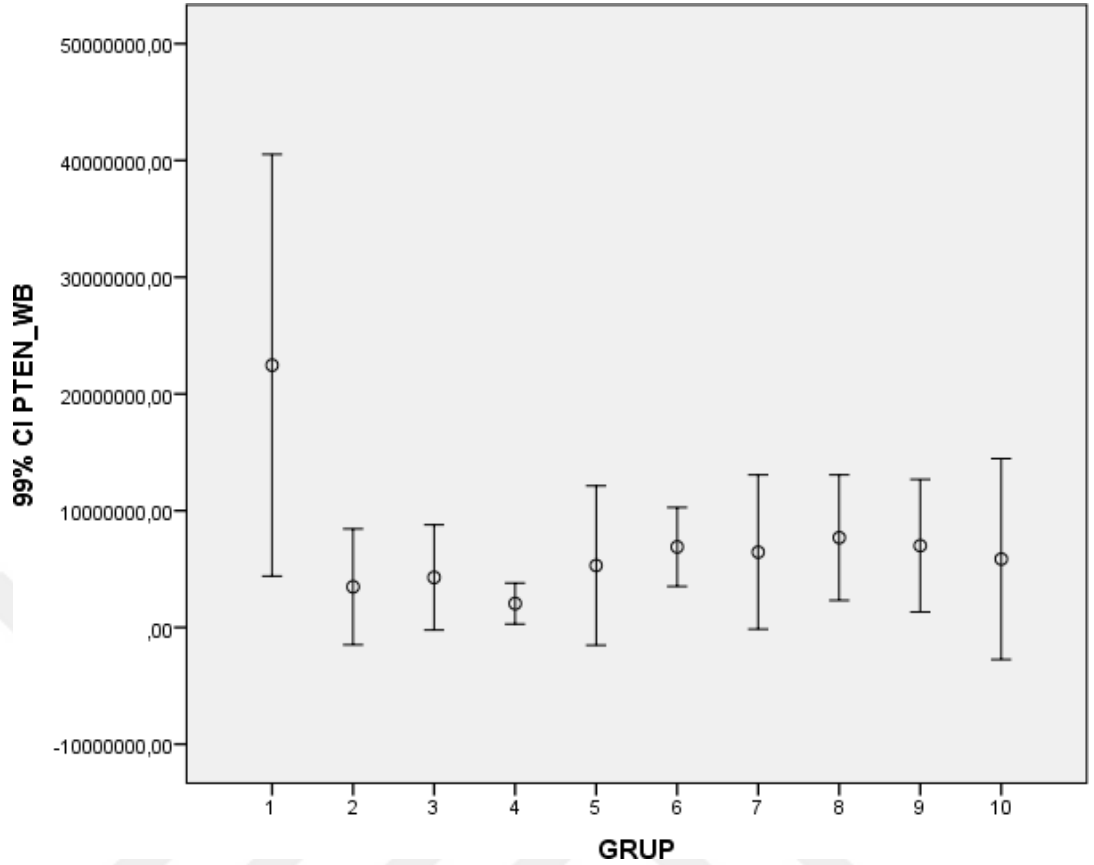
| Gruplar  | N | Sıra Ortalamaları | Sd | $\chi^2$ | P    | Fark        |
|----------|---|-------------------|----|----------|------|-------------|
| 1. Grup  | 5 | 46,60             |    |          |      |             |
| 2. Grup  | 5 | 14,80             |    |          |      |             |
| 3. Grup  | 5 | 18,60             |    |          |      |             |
| 4. Grup  | 5 | 7,00              |    |          |      |             |
| 5. Grup  | 5 | 22,00             | 9  | 25,508   | ,002 | 1 - 2, 3, 4 |
| 6. Grup  | 5 | 31,60             |    |          |      | 4 - 6, 8, 9 |
| 7. Grup  | 5 | 27,60             |    |          |      |             |
| 8. Grup  | 5 | 33,20             |    |          |      |             |
| 9. Grup  | 5 | 29,80             |    |          |      |             |
| 10. Grup | 5 | 23,80             |    |          |      |             |

Tablo 6.4.4.’de yer alan analize göre deney ve kontrol gruplarına göre deneklerin PTEN değerlerinde anlamlı farklılık görülmektedir,  $\chi^2=25,508$ ,  $p<0,01$ .

Gruplar arasındaki farklılığın hangi gruplardan kaynaklandığını belirlemek için tüm ikili gruplar arasında Mann Whitney U-Testi yapılmıştır. Yapılan analiz sonucunda PTEN ortalamalarında 1.grubun, 2.grup, 3.grup ve 4.gruba göre daha yüksek ortalamaya sahip olduğu; 4.grubun ise 6.grup, 8.grup ve 9.gruba göre daha düşük ortalamaya sahip olduğu görülmektedir ( $p<,01$ ).

Şekil 6.4.6.’da ise deney ve kontrol gruplarına göre PTEN değerlerinde gözlenen farklılık için yapılan hata çubuk grafiği yer almaktadır. Hata çubuk grafiği de anlamlı farklılık görülen gruplar arasındaki farklılığı belirtmektedir (Şekil 6.4.6.).





Şekil 6.4.6. PTEN “r” değerlerine ait hata çubuk grafiği

#### 6.4.3. Gruplar arası MMP-9 değerlerinin karşılaştırılmasına ait bulgular

Tablo 6.4.5.’de deney ve kontrol gruplarının MMP-9 değerlerine ait tanımlayıcı istatistikler yer almaktadır. Deneklere ait en düşük ortalama 7.grupta (2941032,80) gözlenirken, en yüksek ortalama 3.grupta (8017835,00) gözlenmektedir.

**Tablo 6.4.5.** MMP-9 “r” değerlerine ait tanımlayıcı istatistikler

| Gruplar  | N | Ort        | SS         |
|----------|---|------------|------------|
| 1. Grup  | 5 | 4039155,80 | 2980004,64 |
| 2. Grup  | 5 | 3626442,00 | 2243745,53 |
| 3. Grup  | 5 | 8017835,00 | 3004692,02 |
| 4. Grup  | 5 | 4524367,40 | 2861272,74 |
| 5. Grup  | 5 | 4102155,00 | 844052,45  |
| 6. Grup  | 5 | 5961136,40 | 1957349,07 |
| 7. Grup  | 5 | 2941032,80 | 2323233,74 |
| 8. Grup  | 5 | 4254561,60 | 1112883,19 |
| 9. Grup  | 5 | 7438896,20 | 6235988,88 |
| 10. Grup | 5 | 4086596,60 | 1849494,72 |

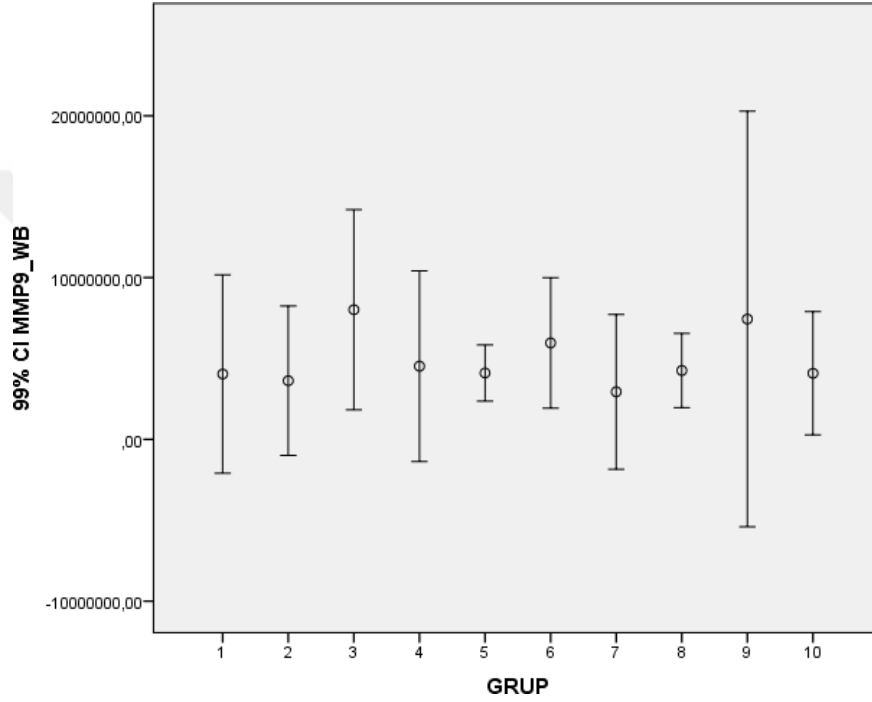
Tablo 6.4.6.’da deney ve kontrol gruplarının MMP-9 değerlerinin karşılaştırılması amacıyla yapılan Kruskal Wallis H-Testi yer almaktadır.

**Tablo 6.4.6.** Gruplar arası MMP-9 “r” değerlerinin karşılaştırılması

| Gruplar  | N | Sıra Ortalamaları | Sd | $\chi^2$ | p   | Fark |
|----------|---|-------------------|----|----------|-----|------|
| 1. Grup  | 5 | 19,80             |    |          |     |      |
| 2. Grup  | 5 | 18,60             |    |          |     |      |
| 3. Grup  | 5 | 42,20             |    |          |     |      |
| 4. Grup  | 5 | 24,80             |    |          |     |      |
| 5. Grup  | 5 | 23,00             |    |          |     |      |
| 6. Grup  | 5 | 35,20             | 9  | 15,472   | ,08 | -    |
| 7. Grup  | 5 | 13,60             |    |          |     |      |
| 8. Grup  | 5 | 24,40             |    |          |     |      |
| 9. Grup  | 5 | 31,80             |    |          |     |      |
| 10. Grup | 5 | 21,60             |    |          |     |      |

Tablo 6.4.6.'da yer alan analize göre deney ve kontrol gruplarına göre deneklerin MMP-9 değerlerinde anlamlı farklılık görülmemektedir,  $\chi^2=15,472$ ;  $p>0,01$ .

Şekil 6.4.7'de ise deney ve kontrol gruplarına göre MMP-9 değerlerinde gözlenen farklılık için yapılan hata çubuk grafiği yer almaktadır. Hata çubuk grafiği de grupların birbirine benzer sonuçlara sahip olduğunu göstermektedir (Şekil 6.4.7).



Şekil 6.4.7. MMP-9 "r" değerlerine ait hata çubuk grafiği

#### 6.4.4. Gruplar arası Notch1 değerlerinin karşılaştırılmasına ait bulgular

Tablo 6.4.7.'de deney ve kontrol gruplarının Notch1 değerlerine ait tanımlayıcı istatistikler yer almaktadır. Deneklere ait en düşük ortalama 2.grupta (836528,60) gözlenirken, en yüksek ortalama 5.grupta (9793545,80) gözlenmektedir (Tablo 6.4.7.).

**Tablo 6.4.7.** Notch1 “r” değerlerine ait tanımlayıcı istatistikler

| Gruplar  | N | Ort        | SS         |
|----------|---|------------|------------|
| 1. Grup  | 5 | 2688017,20 | 1322877,36 |
| 2. Grup  | 5 | 836528,60  | 655865,34  |
| 3. Grup  | 5 | 3603736,80 | 1391742,14 |
| 4. Grup  | 5 | 3525844,00 | 1008258,04 |
| 5. Grup  | 5 | 9793545,80 | 6228596,96 |
| 6. Grup  | 5 | 4463517,40 | 3983578,88 |
| 7. Grup  | 5 | 2874939,20 | 1376034,70 |
| 8. Grup  | 5 | 2839085,80 | 980198,73  |
| 9. Grup  | 5 | 7284677,20 | 1634632,96 |
| 10. Grup | 5 | 2032349,60 | 218968,08  |

Ort, ortalamayı, SS ise standart sapmayı simgelemektedir.

Tablo 6.4.8.’de deney ve kontrol gruplarının Notch1 değerlerinin karşılaştırılması amacıyla yapılan Kruskal Wallis H-Testi yer almaktadır.

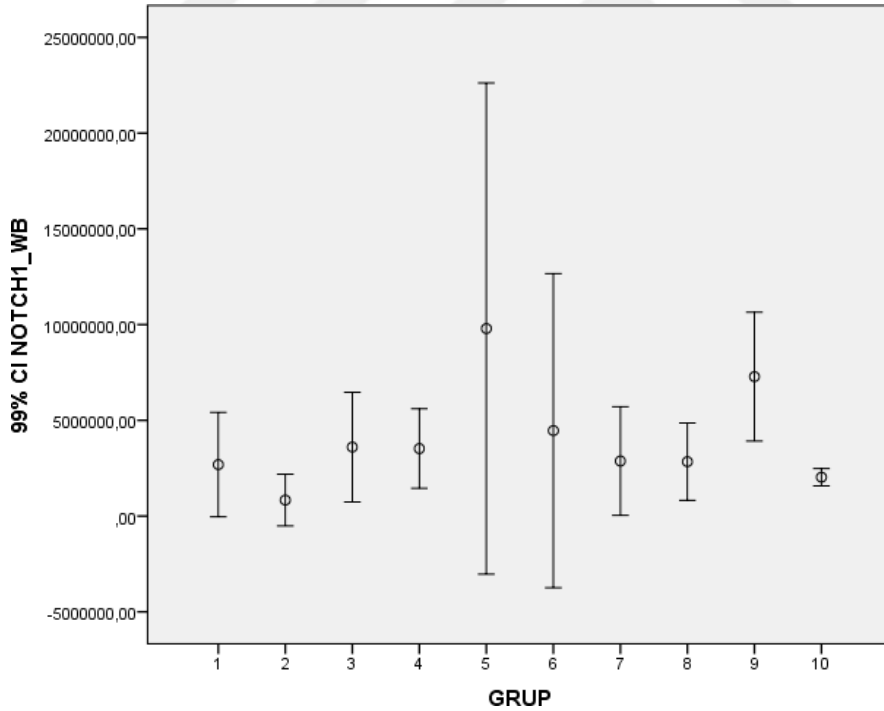
**Tablo 6.4.8.** Gruplar arası Notch1 “r” değerlerinin karşılaştırılması

| Gruplar  | N | Sıra Ortalamaları | sd | $\chi^2$ | P    | Fark               |
|----------|---|-------------------|----|----------|------|--------------------|
| 1. Grup  | 5 | 20,60             |    |          |      |                    |
| 2. Grup  | 5 | 5,40              |    |          |      | 1 - 5, 9           |
| 3. Grup  | 5 | 27,60             |    |          |      | 2 - 3, 4, 5, 9, 10 |
| 4. Grup  | 5 | 28,20             |    |          |      | 3 - 9              |
| 5. Grup  | 5 | 44,00             | 9  | 29,179   | ,001 | 4 - 9, 10          |
| 6. Grup  | 5 | 25,00             |    |          |      | 5 - 7, 8, 10       |
| 7. Grup  | 5 | 22,40             |    |          |      | 7 - 9              |
| 8. Grup  | 5 | 22,80             |    |          |      | 8 - 9              |
| 9. Grup  | 5 | 43,80             |    |          |      | 9 - 10             |
| 10. Grup | 5 | 15,20             |    |          |      |                    |

Tablo 6.4.8.'de yer alan analize göre deney ve kontrol gruplarına göre deneklerin Notch1 değerlerinde anlamlı farklılık görülmektedir,  $\chi^2=29,179$ ;  $p<0,01$ .

Gruplar arasındaki farklılığın hangi gruplardan kaynaklandığını belirlemek için tüm ikili gruplar arasında Mann Whitney U-Testi yapılmıştır. Yapılan analiz sonucunda Notch1 ortalamalarında 9.grubun, 1.grup, 3.grup, 4.grup, 7.grup, 8.grup ve 10.gruba göre daha yüksek ortalamaya sahip olduğu; 5.grubun 1.grup, 7.grup, 8.grup ve 10.gruba göre daha yüksek ortalamaya sahip olduğu görülmektedir. 2.grubun ise 3.grup, 4.grup, 5.grup, 9.grup ve 10.gruba göre daha düşük ortalamaya sahip olduğu görülmektedir.

Şekil 6.4.8.'de ise deney ve kontrol gruplarına göre Notch1 değerlerinde gözlenen farklılık için yapılan hata çubuk grafiği yer almaktadır. Hata çubuk grafiği de anlamlı farklılık görülen gruplar arasındaki farklılığı belirtmektedir (Şekil 6.4.8.).



Şekil 6.4.8. Notch1 "r" değerlerine ait hata çubuk grafiği

## 7. TARTIŞMA

Literatürde yer alan kanıt değeri yüksek araştırmalar incelendiğinde; CB'lerin hipokampüse bağlı bellek fonksiyonu ile ilişkili olduğunun raporlandığı görülmektedir (10). Ayrıca, CB1R agonistlerinin, bilişi (kognisyonu) bozmakta ve sinaptik iletimin uzun vadeli potansiyasyonunu yani LTP'yi önlemektedir denilmektedir (11). Ancak hipokampal LTP üzerindeki endojen olarak oluşturulan CB'lerin (eCB) etkisinin belirsiz kaldığı da aynı çalışmada vurgulanmaktadır (11). Ancak literatürde; MSS'de CB1R, periferel sinir sisteminde ise CB2R aracılığı ile işlev gören CB nörotransmitter AEA, CB1 antagonistlerinden AM251, CB2 antagonisti AM630 ve GPCR55'in potent ve selektif antagonisti olan ML193'ün moleküler düzeyde birlikte değerlendirildiği herhangi bir araştırmaya rastlanmamıştır.

Bu araştırmada AEA, AM251, AM630 ve ML193 uygulanan sıçanlarda MMP-9 gen ve protein seviyesi değişimi ile birlikte, PTEN ve Notch1 genlerinin değişiminin karşılaştırılması amaçlandı. Bu sayede, LTP ve hipokampüse bağlı hafızanın kazanılması açısından önemli olduğu vurgulanan MMP-9 seviyesinin, hangi CBR'nin indüksiyon ya da inhibisyonu ve/veya GPCR55'in inhibisyonu ile değişeceği konusunda netlik sağlanabilecektir.

Aguayo ve ark.'ları (112); hipokampüste tek bir stres maruziyetinin, muhtemel ESM bileşenlerinde değişiklik gerektiren uyarıcı sinapsları yeniden şekillendiren nöroplastik süreçler sayesinde, bellek oluşumunu kolaylaştırdığını belirtmişlerdir. ESM bileşenlerini ve  $\beta$ -distrolikan ( $\beta$ -DG<sub>43</sub>) gibi sinaptik proteinleri parçalayan bir enzim olan MMP-9'un akut stres yanıtı sırasında sıçan hipokampüsünde aktivitelerini ve dağılımını değiştirdiği hipotezini test etmişlerdir. İkibuçuk saatlik kısıtlı stresten sonra, (i)  $\beta$ -DD43 bölünmesinin eşlik ettiği, tüm hipokampal ekstraktlarda MMP-9 seviyelerinin ve potansiyel aktivitesinin arttığını ve (ii) stratum radiatum ve hipokampüsün moleküler tabakası gibi dendritik alanlarda, MMP-9 immünoreaktivitesinin önemli bir artışını tespit ettiklerini bildirmişlerdir. 24 saatlik stres sonrası, (i) MMP-9 net aktivitesinin somatik alanda, yani stratum piramidal ve granül hücre katmanlarında ve ayrıca sinaptik alanda, özellikle stratum radiatumda ve hipokampüsün moleküler tabakasında yükseldiğini ve (ii) hipokampal sinaptonörozom fraksiyonlarının, yarılmış  $\beta$ -DG<sub>43</sub> sabit seviyesine göre potansiyel

enzimatik aktivitesinin değişimi olmaksızın MMP-9 ile zenginleştirildiğini bulmuşlardır. Bu bulgular stresin, MMP-9 seviyelerinde, net aktivitede ve hipokampüste subselüler dağılımında kendine özgü bir yanıtı tetiklediğini ve bunun da stres yanıtı sırasında substratların işlenmesinde rol oynadığını gösterdiği çıkarımında bulunmuşlardır (112).

Stern ve ark.'ları (113); farmakolojik takviyeler sayesinde korku hafızasını modüle edebilmek, korku koşullandırma süreçlerinde verilen koşulsuz uyarının yoğunluğunun, oluşturulacak hafızanın niteliksel ve niceliksel yönlerini etkilediğini vurgulamışlardır. Sıçanlarda bağlamsal eşleştirme için kullanılan şok yoğunluğunu değiştirerek, beyin içerisinde kannabidiolün (3,0-30 mg/kg IP) konsolidasyonu ve buna bağlı sonuçlara zarar verip vermediği, bunun nasıl ve nerede gerçekteştiğini özel ve daha genel uzun vadeli korku anılarını indükleyerek araştırmışlardır. Kannabidiolün, kısa süreli korku hafızası üzerinde hiçbir etkisi olmadığını ve gecikmiş tedavisinin artık konsolidasyon sürecini etkilemediğini raporlamışlardır. Dorsal hipokampus (DH) korku hafızası ve genellemeyi modüle ettiği için ve CB1 ile CB2 reseptörlerinin konsolidasyona katkıda bulunduğu için, bu maddelerin kannabidiol etkilerine katılımlarını araştırdıklarından bahsetmişlerdir (113). CB1R antagonisti / ters agonisti AM251 veya CB2R antagonisti / ters agonisti AM630 ile hem sistemik hem de intra-DH tedavisinin, bozucu CBD'nin konsolidasyon üzerindeki etkilerini önlediğini raporlamışlardır. CBD'nin ECB iletimi üzerindeki etkilerinin muhtemelen dolaylı olduğundan, sistemik veya intra-DH verildiğinde FAAH inhibitörü URB597'nin CBD'ye benzer etkilerini gördüklerini açıklamışlardır. Sonuç olarak, CBD'nin, DH CB1R ve CB2R'nin, AEA aracılı aktivasyonu yoluyla farklı korku anılarının birleştirilmesini bozduğunu gösterdiğinin altını çizmişlerdir (113).

Hurst ve ark.'ları (114); GPCR55, lizofosfatidilinositol (LPI) ve ECB olan AEA ile THC dahil diğer bileşikler tarafından aktive edildiğini, LPI, GPCR55'in güçlü endojen bir ligandı ve ne GPCR55 ne de LPI'ların beyindeki işlevlerinin iyi anlaşılmadığını vurguladıkları araştırmalarında; ECB'lerin, beyin sinaptik plastisitesini modüle ettiğinin iyi bilinmesine karşın, LPI'nin beyin plastisitesi üzerindeki potansiyel rolünün hiç gösterilmediğini, bu yüzden de, sadece GPCR55 ekspresyonunu değil, aynı zamanda sinaptik plastisitenin de yaygın bir şekli olan endojen ligandının uzun süreli potansiyelde oynayabileceği rolü incelemişlerdir (114).

Elektrofizyoloji ve davranış analizleri ile birlikte RT-qPCR kullanarak, hipokampal GPCR55 ekspresyonunu ve fonksiyonunu test ettikleri çalışmanın sonucunda, RT-qPCR sonuçları, GPCR55'in hem sıçanların hem de farelerin hipokampüsünde eksprese edildiğini göstermektedir yorumunda bulunmuşlardır (114).

İmmünohistokimya ve tek hücreli PCR, hipokampüste CA1 ve CA3 katmanlarının piramidal hücrelerinde GPCR55 proteinini göstermekte olduğunu, GPCR55 endojen agonist LPI'nın GPR55 + / + farelerinin hipokampal dilimlerine uygulanmasının, CA1 LTP'yi önemli ölçüde arttırdığını belirttikleri çalışmada, bu etkinin, GPCR55- / - farelerde mevcut olmadığını raporlamışlardır ve GPCR55 antagonisti CID 16020046 tarafından bloke edildiğini belirtmişlerdir. Aynı zamanda, LPI olan veya olmayan GPCR55 - / - ve GPCR55 + / + farelerinin eşleştirilmiş nabız oranlarını da incelediklerinde, GPCR55 + / + farelerinde, LPI ile çift nabız-nabız oranlarında anlamlı artış kaydetmişlerdir. Davranışsal olarak, GPCR55 - / - ve GPCR55 + / + fareleri, yeni nesne tanıma, radyal kol labirenti veya *Morris* su labirenti dahil olmak üzere bellek görevlerinde farklılık göstermemekle birlikte, radyal kol labirentindeki performans ve artmış labirent görevinin, GPCR55 - / - farelerinin daha yüksek bir hareketsiz davranış sıklığına sahip olduğunu göstermektedir yorumunda bulunmuşlardır. Bu sonucun, hipokampal sinaptik plastisitede, LPI'nin etkisini gösterdiğini vurgulamışlardır (114).

Basavarajappa ve ark.'ları (115); kemirgenlerde, AEA ve 2-AG gibi birçok eksojen ve eCB'nin, bazı hipokampal bellek süreçlerinde önemli bir rol oynadığının gösterilmiş olması ile birlikte, endojen AEA'nın bu süreçleri düzenlediği mekanizmaların iyi anlaşılmadığı için araştırmalarını gerçekleştirdiklerini belirtmişlerdir. AEA'nın LTP, hipokampal bağımlı öğrenme ve hafıza görevleri, pERK1 / 2, pCaMKIV ve pCREB sinyal olayları üzerindeki etkileri hem CB1R yabancıl tip (WT) hem de nakavt farelerde (KO), LTP hipokampal bağımlı öğrenme ve hafıza görevlerinin, FAAH'ın bir inhibitörü olan URB597'nin uygulanmasının ardından değerlendirildiğini vurgulamışlardır. URB597'nin akut olarak uygulanmasının, araçla karşılaştırıldığında, hipokampüste ve neokortekste 2-AG veya CB1R seviyelerini etkilemeden arttırdığını raporlamışlardır (115).



Hipokampal dilimlerde, URB597, CB1R WT'de LTP'ye zarar verdiğini, ancak KO yavrularında zarar vermediğini raporlamışlardır. URB597, CB1R WT farelerinde Y-labirent testinde nesne tanıma, kendiliğinden değişme ve uzaysal hafızaya zarar verdiğini ancak KO farelerinde zarar vermediğini sunarak, URB597, WT veya KO farelerinde toplam ERK seviyelerini etkilemeden, WT'de ERK fosforilasyonunu arttırdığının altı çizilmiştir. URB597, WT'de CaMKIV ve CREB fosforilasyonuna zarar verdiğini, ancak KO farelerinde zarar vermediğini, CB1R KO fareleri, WT yavru farelerine kıyasla daha düşük bir pCaMKIV / CaMKIV oranına ve daha yüksek pCREB / CREB oranına sahiptir demişlerdir.

Bu sonuçların, farmakolojik olarak yükselmiş AEA'nın LTP'yi bozduğunu, öğrenmeyi ve hafızayı azalttığını ve CB1R'lerin aktivasyonu yoluyla CaMKIV ve CREB fosforilasyonunu inhibe ettiğini göstermekte ve toplu olarak, bu bulguların, ayrıca AEA'nın normal konsantrasyonların ötesindeki farmakolojik yükselmesinin de alta yatan fizyolojik yanıtlar için zararlı olduğuna dikkat çekmişlerdir (115).

Lin ve ark.'ları (116); son zamanda gerçekleştirilen araştırmalar içerisinde, korku hafızasında ve uzun süreli sinaptik plastisitede ECB'lerin katkısı ile ilgili çelişkili sonuçlara rastlandığını belirtmişlerdir. Bu yüzden, erişkin farelerde, hem farmakaminoid reseptör tip 1 antagonisti AM281'in hem de AEA geri alım inhibitörü AM404'ün, bağlamsal korku hafızasının oluşumu üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Hem i.p. hem de AM281'in intra-hipokampal enjeksiyonlarının, bağlamsal korku hafızasını artırırken, yüksek bir AM404 dozunun bu etkiyi inhibe ettiğini belirtmişlerdir. Bu bulguların, CB1 reseptör aracılı sinyallemenin, bağlamsal korku hafızası oluşumuna negatif katkıda bulunduğunu vurgulamışlardır. Hipokampal dilimlerdeki CA1 piramidal nöronlarında LTP indüksiyonunu araştırmışlardır. Ayrıca AM281'in LTP'nin indüksiyonunu bozduğuna ek olarak, AM281 tarafından LTP'nin bloke edilmesinin, GABA (A) reseptörünün seçici bir antagonisti olan pikrotoksinin, banyo uygulamasıyla tamamen önlendiğini raporlamışlardır. Birlikte ele alındığında, bu sonuçlar CB1 reseptörünün aktivasyonunun bir GABA (A) reseptör aracılı mekanizma yoluyla, LTP'nin indüksiyonuna katkıda bulunabileceği hipotezini öne sürmüşlerdir (116).

Lees ve ark.'ları (117); önceki çalışmaların, CB'lerin *in-vivo* bilişi bozduğunu ve CB1R aktivasyonu yoluyla *in-vitro* bir aday deney ve hafıza modeli olan LTP'yi bloke ettiğini gösterdiği için, varsayılan kannabinomimetik özelliklere sahip endojen bir uyku indükleyici yağ olan, cis-oleamid (cOA)'ın, cOA'nın kannabinomimetik olduğunu ve hipokampal dilimde iki farklı uyarım modeli aracılığıyla sinaptik koşullandırma üzerine etkilerini sentetik ve eCB'ler ile karşılaştırmalı bir çalışma olarak yürütmüşlerdir. CB1 agonistleri, R (+) - (2,3-dihidro-5-metil-3- [4-morfolinil] metil] pirol [1,2,3-de] -1, 4-benzoksazin-6-il) (1-naftalenil) metanon monometansülfonat WIN55212-2 ve AEA'nın, -ancak cOA- değil, yüksek frekans uyarımını (HFS) -LTP'yi bloke ettiğini, R (+) - WIN55212-2 ve cOA (stereoselektif olarak), tetra-burst-LTP'ye yanıtları zayıflattığını, ancak AEA'nın bunu zayıflatmadığını ve AEA taşıma inhibitörü, AM404'ün ise HFS-LTP'yi zayıflattığı sonucunu gözlemlemişlerdir. Bu durumun, CB1R antagonisti [N- (piperidin-1-il) -5- (4-klorofenil) -1- (2,4-diklorofenil) -4-metil-1H-pirazol-3-karboksamid hidroklorür]'in (SR141716A) tarafından tersine çevrildiğini, ancak vanilloid reseptör agonisti kapsaisin tarafından taklit edilmeyen bir etkiyi göstermekte olduğu sonucunu görmüşlerdir. AEA'nın parçalanmasından sorumlu enzim ve FAAH inhibitörü olan (1,1,1-trifluoro10(Z)-nonadecen-2-one (TFNO)'nun, tek başına veya cOA ile birlikte HFS-LTP'yi bloke edemediğinin aksine, bu kombinasyonun, tetra-burst-LTP'yi hafifletmede kendi başına cOA kadar etkili olduğunun altını çizmişlerdir. GABA (A) reseptör bloker pikrotoksin varlığında, tetra-burst-LTP üzerindeki cOA etkilerinin önlenemediğini, ancak bu durumun SR141716A ön tedavisi ile önlenmediğini raporlamışlardır (117).

Bu bulgular, cOA'nın, ne CB1R'yi doğrudan aktive etmediğini ne de FAAH inhibisyonu yoluyla AEA'nın titrelerini arttırmak için önerilen "çevre" etkisi yoluyla hareket etmediğini göstermektedir yorumunu getirmişlerdir. cOA'nın tetra-burst koşullandırma üzerindeki seçici etkilerinin ise GABAerjik iletimin modülasyonunu gösterebileceğini ve AEA alım inhibisyonunun, ancak FAAH'ın bloke edilmemesi durumunun, ECB'lerin sinaptik konsantrasyonlarını etkili bir şekilde arttırmakta olduğu sonuçları üzerinde durmuşlardır (117).

Terranova ve ark.'ları (118); daha önce literatürde, THC ve sentetik CB agonisti olan HU-210 [(-) - 11-OH-delta 8-dimetilheptil tetrahidrokanabinol]'ün, sıçan hipokampal dilimlerinde, LTP indüksiyonunu önlediğinin bildirildiğini belirtmişlerdir. Bu yüzden, hem bir başka sentetik CB agonisti olan, WIN55212-2R - (3 ve 10 mikromM) ve CBR'nin endojen ligandı olarak kabul edilen AEA'nın (10 mikromM), LTP oluşumunu, *Schaffer* teminat-CA1 alan kompleksinde inhibe ettiğini doğrulamayı araştırmışlardır. Araştırma sonuçlarında; CB1R'nin güçlü ve seçici bir antagonisti olan SR141716A'nın 0,1-10 mikromolar dozlarında, konsantrasyona bağlı olarak, hem WIN55212-2 hem de AEA tarafından indüklenen LTP'nin inhibisyonunu tersine çevirdiğini gözlemlemişlerdir. Bu verilerin, CBR agonistlerinin, CB1 reseptör aktivasyonu yoluyla hipokampal LTP oluşumunu inhibe ettiğini ve AEA'nın bellek süreçlerinde yer alan bir endojen nöro-messenger adayı olabileceğini vurgulamışlardır (118).

Wiera ve ark.'ları (4); LTP'nin, yaygın bir şekilde bir bellek substratı olarak algılandığını ve hipokampal CA3-CA1 yolunda, LTP'nin farklı formlarının, NMDA reseptörlerine (nmdaLTP) veya L-tipi voltaj-kapılı kalsiyum kanallarına (vdccLTP) bağlı olduğunu belirttikleri çalışmalarında, LTP'nin ayrıca çeşitli enzimlerin aracılık ettiği hücre dışı proteoliz ile etkili bir şekilde düzenlendiğinin de iyi bilindiğini hatırlatmışlardır. Bu nedenle çalışmaları esnasında, farelerde hipokampal dilimlerin bu farklı LTP formlarının spesifik olarak farklı MMP'ler tarafından düzenlenip düzenlenmediğini araştırmışlar. Bulgular arasında; CA3-CA1 yolunda, MMP-3 inhibisyonunun veya nakavtın (*knock-out*) geç fazlı LTP'ye zarar verdiğini bulduklarını bildirmişlerdir. Ayrıca, ilginç bir şekilde, geç fazlı LTP de MMP-9 blokajı ile azaldığını bildirmişlerdir. Hem MMP-3 hem de MMP-9 inhibe edildiğinde hem erken hem de geç faz LTP'nin bozulduğunu gözlemlediklerinin altını çizmişlerdir.

İmmünooblotlama, *in-situ* zimografi ve immünofloresan kullanarak, LTP indüksiyonunun, MMP-3 ekspresyonunda ve CA1 *stratum radiatum*'daki aktivitede bir artış ile ilişkili olduğunu bulduklarını ifade etmişlerdir (4).

MMP-3 inhibisyonu ve *knock-out*, vdccLTP'nin indüksiyonunu, nmdaLTP üzerinde hiçbir etkisi olmaksızın önlediğini bildirmişlerdir. L-tipi kanala bağımlı LTP'nin hiyaluronik asit sindirimi ile bozulduğunun bilinmekte olduğunu,

hyaluronidaz ile dilim tedavisinin, LTP'de MMP-3 blokajının etkisini önlediğini ve ayrıca bu LTP formunda, MMP-3'ün kritik rolünü doğruladığını da bulduklarını dile getirdikleri araştırmalarında, CA3-CA1 yolunun tersine, MF-CA3 projeksiyonundaki LTP'nin, MMP-3'e bağlı olmadığını önemini vurgulamışlardır. Bu sonucun da MMP'lerin hareketlerinin yol özgüllüğünü göstermekte olabileceği çıkarımında bulunmuşlardır (4).

Genel olarak, çalışmalarından elde ettikleri sonuçlarda; “peri-sinaptik MMP-3'ün aktivasyonunun, CA1 bölgesinde L-tipi kanal bağımlı LTP'yi desteklediğini, oysa nmdaLTP'nin sadece MMP-9'a bağlı olduğunu göstermektedir. Farklı türlerde LTP'nin, bellek oluşumu ve geri kazanımının farklı fazları ile ilişkilidir, ancak altta yatan moleküler sinyal yolları yeterince anlaşılmamıştır” ifadelerine yer vermişlerdir.

Ekstrasellüler proteazlar nöroplastisite fenomeninde önemli oyuncular olarak ortaya çıkmış olmakla birlikte, çalışmalarında, CA3-CA1 hipokampal projeksiyonunda L-tipi kalsiyum kanal bağımlı LTP'nin, MMP-9 tarafından düzenlenen NMDAR-bağımlı LTP'nin aksine MMP-3 aktivitesi tarafından kritik olarak düzenlendiğinin bulunduğunu öne sürmüşlerdir. Dahası, LTP'nin indüksiyonu, MMP-3 ekspresyonunda ve aktivitesinde bir artış ile ilişkilendirildiğini bildirerek, bir ana ESM bileşeni olan hyaluronanın sindiriminin, LTP'nin MMP-3'e bağımlı bileşenini bozduğunu bulduklarını raporlamışlardır (4).

Bu sonuçlar, farklı MMP'lerin belirli tip LTP için moleküler anahtar olarak hareket edebileceğini göstermektedir.

Szepesi ve ark.'ları (5); dendritik dalların, nöronal dendritlerden uzanan ve eksitator sinapsların çoğunu barındıran küçük membranöz çıkıntılar olduğunu belirttikleri araştırmalarında, çok fazla kanıtın, hücre dışı hareket eden ve  $Zn^{++}$  bağımlı endopeptidazlar aile olarak kabul edilen MMP'lerin, dendritik dal morfolojisini hızla modüle edebildiğini gösterdiğini belirtmişlerdir. Omurga kafa çıkıntılarının (SHP'ler), dendritik dal kafasından uzanan, değiştirilmiş nöronal aktiviteye yanıt olarak, postsinaptik yapısal yeniden biçimlenmenin bir formunu temsil eden, *filopodia* benzeri süreçler olduğunu bildirmişlerdir. Çözünmüş hipokampal kültürlerdeki kimyasal olarak LTP indüksiyonunun (cLTP), SHP'lerin oluşumunu kontrol eden MMP-9 aktivitesini yükselttiğini göstermişlerdir. MMP'lerin aktivitesinin veya mikrotübül

dinamiğinin bloke edilmesi, SHP'lerin ortaya çıkışını ortadan kaldırdığına ek olarak, oto aktif rekombinant MMP-9'un, organotipik hipokampal dilimlerdeki SHP'lerin oluşumunu teşvik etmekte olduğunu raporlamışlardır (5).

Ayrıca, SHP'lere sahip olan dalların, cLTP üzerine post-sinaptik AMPAR'ı kazanmış ve AMPAR'ın sinaptik iletimi MMP'ler tarafından kontrol edilmiştir ibaresine yer verdikleri araştırma sonuçlarında, MMP-9'un, SHP'lerin oluşumu ve cLTP üzerine postsinaptik reseptör dağılımının kontrolünde işlevsel olarak rol oynadığının güçlü bir şekilde gösterdiğinin altını çizmişlerdir (5).

Dziembowska ve ark.'ları (119); nöronal stimülasyona yanıt olarak yeni proteinlerin lokal, sinaptik sentezi, sinaptik morfojeninin düzenlenmesinde önemli bir rol oynamakta olduğunu ve son çalışmalarda, protein bileşenlerinin parçalanması yoluyla, periküler ortamı düzenleyen bir endopeptidaz olan MMP-9'un, omurga morfolojisi ve sinaptik plastisitenin düzenlenmesinde kritik bir rol oynadığını gösterdiği bildirilmiştir (119). Bu bilgilerden yola çıkarak çalışmalarında, MMP-9'un, mRNA'nın lokal translasyon ve protein salınımı için dendritlere taşınıp taşınmadığını belirlemeye çalışmışlardır. İlk olarak, MMP-9'un mRNA'nın dendritik taşınmasının, glutamat uygulanmış primer hipokampal nöronal kültürlerde ve cLTP'den sonra yetişkin anestezi uygulanmış farelerde, DG granül hücrelerinde görüldüğünü bildirmişlerdir.

İkinci olarak ise, MMP-9'un, mRNA'nın hızlı, aktiviteye bağımlı poliadenilasyonu; mRNA'nın aktif olarak polisomik translasyonu ile ilişkisi ve *de novo* MMP-9 protein sentezinin, sıçan hipokampusünden izole edilen sinaptonörozomlardan elde edildiğini belirtmişlerdir. Üçüncü olarak, kültürlenmiş hipokampal nöronların glutamat uyarımı, doğal substratı  $\beta$ -distroliktan ayrılmasıyla ölçüldüğü gibi, MMP-9 aktivitesinde dakikalar gibi hızlı süreler içerisinde bir artışa neden olduğunu raporlamışlardır. Bu aktivitenin, poliadenilasyon inhibitörü ile azaltıldığını, böylece, MMP-9 translasyonunun, protein fonksiyonu ile bağlandığını gözlemlemişlerdir. MMP-9'un, mRNA'nın dendritlere taşındığını ve lokal olarak çevrildiğini ve proteinin aktiviteye bağımlı bir şekilde salındığını göstermekte olan bu bulgulardan yola çıkarak, diğer dendritik olarak sentezlenmiş proteinler ile uyum

içinde hareket eden, lokal olarak salınmış MMP-9'un, aktive sinapsların yapısal ve fonksiyonel plastisitesine katkıda bulunabilir yorumunu getirmişlerdir (119).

Wiera ve ark.'ları (3); sinaptik plastisite mekanizmaları, MMP familyası üyeleri de dahil olmak üzere kompleks proteaz sistemi tarafından aracılık edilen proteolitik aktiviteyi içermektedir. Özellikle MMP-9, *Schaffer* kollateral-CA1 yolunda LTP idamesinde ve hipokampus bağımlı belleğin elde edilmesinde kritik olduğunu, bu laboratuvardan yapılan son çalışmaların, LTP indüksiyonu ve ekspresyonunun büyük ölçüde presinaptik olduğunu, MMP'lerin blokajının LTP'nin sürekliliğini bozduğunu ve LTP indüksiyonunun artan MMP-9 ekspresyonu ile ilişkili olduğunu, MF-CA3projeksiyonunda ortaya çıktığını ispat etmektedir yorumunda bulunmuşlardır (3).

Burada, MMP-9 KO farelerinden ve MMP-9'u aşırı eksprese eden transgenik sıçanlardan gelen akut beyin dilimlerini endojen MMP-9'daki manipülasyonların MF-CA3 projeksiyonunda LTP'yi nasıl etkilediğini tespit etmek için kullanmışlardır. Her iki tipteki transgenik model normal sinaptik iletim ve kısa süreli plastisite gösterdiğini ve ilginç bir şekilde, nakavt farelerin ve aşırı eksprese eden sıçanların dilimlerinde indüklenen LTP'nin sürekliliğinin neredeyse ortadan kaldırıldığını gözlemlemişlerdir. Bununla birlikte, aktif MMP-9'un varlığında, kademeli bir fEPSP oto- potansiyasyonu gözlemlendiğini ve tetanizasyon, KO farelerde işaretli bir LTP'ye neden olduğunu bildirmişlerdir. Ek olarak, WT farelerden alınan MMP-9 uygulanmış dilimlerde, fEPSP oto potansiyasyonu da meydana geldi ve kısmen tıkalı LTP oluştu şeklinde açıklama getirmişlerdir. Bu durum, eksojen proteazın, boş farelerde LTP'yi restore edebileceğini gösterirken, WT farelerde MMP-9 fazlalığının LTP'ye zarar verdiğini göstermektedir yorumunda bulunmuşlardır. Transgenik sıçanlarda LTP bakımının kısmi MMP blokajı ile yeniden oluşturulabileceğini ancak doymamış konsantrasyonlarda MMP inhibitörünün etkisiz olduğunu düşündüklerini bildirmektedirler (3).

Sonuç olarak, MF-CA3 yolunda LTP bakımının ince ayarlı MMP-9 aktivitesini gerektirdiği ve MMP-9 seviyesinin bazı nöropatolojilerde gözlemlendiği şekilde bilişsel süreçler için zararlı olabileceği ihtimali literatürde ortaya konulmaktadır, şeklinde açıklamışlardır (3).

Literatürde MMP'lerin, ESM'yi yeniden modellemede ve öğrenme ve bellekte kritik rol oynayan bir endopeptidazlar ailesini içermekte olduğu bildirilmektedir. İnsan beyinde en az 24 farklı MMP alt tipi tanımlanmış, ancak MMP'nin nöronal plastisite üzerindeki alt tipine özgü eylemleri hakkında çok az şey bilinmekte olduğu vurgulanmıştır. Eksitator sinaptik iletimin, LTP ve dendritik ve somatik nöronal uyarılabilirliğin ölçeklendirilmesinin, bellek depolama alt tabakaları olarak kabul edildiğine dair söylemde bulunulmuştur (120).

Brzdak ve ark.'ları (120); MMP-3 ve MMP-2 / 9'un, hipokampal beyin dilimlerinde, uyarıcı postsinaptik potansiyel (EPSP)-*to-spike* (E-S) potansiyasyonunun, indüksiyonunu ve ekspresyonunu şekillendirmede farklı şekilde rol oynayabildiğini bulduklarını belirttikleri çalışmalarında, MMP-3 ve MMP-2/9'a ait proteolizin, daha önce, sinaptik NMDAR'ın *in-vitro* bütünlüğünü veya hareketliliğini etkilediği gösterildiğinin bilindiğini söylemişlerdir. Bununla birlikte, MMP-NMDAR etkileşimlerinin, fonksiyonel sonuçları hakkında büyük ölçüde bilinmeyen içerdiğini bildirdikleri araştırmalarında, MMP alt tiplerinin, fare hipokampal akut beyin dilimlerindeki E-S plastisitesi ve NMDAR fonksiyonundaki rolünü araştırmışlardır.

CA1 alanı içindeki E-S potansiyasyonunda MMP-3 / NMDAR aktivitesi için zamansal gereksinimin büyük ölçüde örtüştüğünü ve MMP-2 aktivitesi değil, MMP-2/9 aktivitesinin, LTP indüksiyonunu takiben, NMDAR'ların işlev kazanması için çok önemli olabileceğini vurgulamışlardır (120).

MMP-3 inhibisyonunu takiben E-S plastisitesindeki fonksiyonel değişiklikler büyük ölçüde aktiviteye bağlı gen transkripsiyonunun bir işareti olan cFos proteininin ekspresyonu ile ilişkilidir yorumunu getirdikleri çalışmalarında, rekombinant MMP-3'ün, NMDAR aracılı alan potansiyellerinde ve somatodendritik Ca<sup>++</sup> dalgalarında bir kazanç sağladığını belirtmişlerdir. Bu sonuçlardan yola çıkarak; uzun süreli hipokampal E-S potansiyasyonunun, down regüle sinyalleşme kaskadlarının ve gen transkripsiyonunun aktivasyonu için hayati olan NMDAR aracılı postsinaptik Ca<sup>++</sup> girişini destekleyen geçici MMP-3 aktivitesi gerektirdiğini göstermektedir. Çıkarımında bulunmuşlardır (120).

Tsilibary ve ark.'ları (121); son çalışmaların, sinaptik plastisite, öğrenme ve hafızadaki hücre dışı proteazları göstermekle birlikte, özellikle trombin, doku

plazminojen aktivatörü, nörotripsin ve nöropsin yanı sıra MMP'lerin, özellikle MMP-9 gibi serin proteazlar için güçlü kanıtlar olduğunu bildirmişlerdir. Bu enzimlerin rolünün, gen ekspresyonu ve protein ve enzimatik aktivite seviyelerinde ekspresyon modelleri ve KO fareler, spesifik inhibitörler, vb. dahil olmak üzere, fonksiyonel çalışmalar üzerinde deneysel sonuçlarla desteklenmekte olduğunu bildirmişlerdir. Buna karşın, çalışmaların, hücre dışı proteolizinin esas olarak ESM ve perisinaptik yapıları gevşetmekten sorumlu olmadığını, bunun yerine ESM, transsinaptik proteinler ve büyüme faktörlerinin latent formundan sinyal moleküllerinin salınmasına izin verdiğini göstermektedir yorumunu yapmışlardır. Özellikle bu enzimlerin, majör nöropsikiyatrik bozukluklarda, muhtemelen şizofreni, bipolar, otizm spektrum bozuklukları ve uyuşturucu bağımlılığı gibi hastalıkların altında yatan sinaptik aberasyonlara, katkıda bulduklarını gösteren endikasyonlar da bulunmaktadır çıkarımında bulunmuşlardır (121).

Bu çalışmada RT-qPCR deneylerinde; AEA ve ters agonist uygulamalarının, MMP-9 gen ifadesinde değişime neden olup olmadığı araştırılmış ancak grup içinde ve gruplar arasında gen ifadelerinde kat değişimleri gözlenmiş olsa bile, bu değişimlerin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür. Western-blot sonuçları istatistiksel olarak değerlendirildiğinde ise literatüre göre en çok etkilenmesi beklenen gen ve ürünü olan MMP-9 ifadesinde gözlenen değişimler anlamlı bulunmamıştır ( $P>0,01$ ).

Antiproliferatif etkileri bilinen ECB olan AEA'nın Notch sinyal yolağı üzerine etkisinin analiz edildiği bir çalışmada; AEA'nın Norch1 aktivasyonunu arttırdığı bildirilmektedir (122).

Bu çalışmada da AM251 uygulanan grupta ve AEA ile ters agonisti olan AM630'un birlikte uygulandığı grupta Notch1 protein miktarının arttığı görüldü.

Homozigot PTEN ile indüklendiği varsayılan kinaz-1 (PINK1) nakavt farelerde kortikostriatal sinapslarda dopamine bağımlı CB1 reseptör işlev bozukluğunun araştırıldığı bir çalışmada; AEA seviyelerinde önemli bir farklılığın olmadığını ve PINK1-/- farelerde, CB1R agonistlerinin bağlanma yeteneğinde, önemli bir azalma bulunduğunu raporlamışlardır (123).



Bu araştırmada; AM630 uygulanan grup ile CB reseptör inhibitörlerinin beraber uygulandığı gruplardan rezeke edilen hipokampal dokulardaki PTEN protein ifadesinde artış belirlenmiştir. Ayrıca, gözlenen PTEN artışının, bu gruplarda MMP-9 ifadesini baskılaması beklenirken, bu gruplarda MMP-9 ifadesinin değişmediği gözlemlendi.

Tsien (124), korkutucu şartlandırma gibi çok uzun süreli hafızaların (anıların), olgun nöronları örten ve sinaps oluşumunu kısıtlayan özel bir ESM olan perinöronal ağ'da, deliklerin paterni olarak depolanmasını önerdiğini bildirmiştir.

Nörogenezis, sinaptik plastisite ve emosyonel durum gibi çeşitli fizyolojik olaylar büyük oranda hipokampal dokular ile ilişkilidir ve bu olayların düzenlenmesinde CB sistem yer alır (125). CBR üzerinde etkili olan ECB sistem, insan fizyolojik, davranışsal, immünolojik ve metabolik fonksiyonlarının çeşitli yönlerini düzenler (125).

Hipertansiyon, kalp yetmezliği, obezite, diabetes mellitus, metabolik sendrom, açlık, kronik stress, depresyon ve diğer psikiyatrik hastalıklarla da ilgilidir (126). Ayrıca bu system, *Alzheimer*, Parkinson, multiple sklerozis, epilepsi ve hiperkortizolizm gibi birçok hastalığın da fizyolojik ya da fizyopatolojik süreçlerinde rol almaktadır (127).

ECB'ler, uzun zincirli çoklu doymamış yağ asitlerinden "talep üzerine" sentezlenir ve hücreler üzerinde parakrin veya otokrin bir şekilde etki eder (128). Başta hipokampus olmak üzere beynin farklı bölgelerinde bulunmaktadır (129). Çalışmalar, talamus, korteks, amigdala ve hipokampus dahil olmak üzere korku tepkisinde yer alan çeşitli beyin bölgelerinde ECB'lerin ekspresyonunu göstermektedir (130).

*Alzheimer* ve Parkinson gibi nörodejeneratif hastalıklar sıklıkla yaşlanmaya bağlı ortaya çıkarken, amiyotrofik lateral skleroz ve *Huntington* hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıklar genç yaşlarda da ortaya çıkabilmektedir. Başka bir deyişle nörodejenerasyon hem yaşlanma hem de genetik faktörlerle ilişkilidir (131).

Demans, bilinç düzeyinde, başta bellek olmak üzere zihinsel ve sosyal yeteneklerin, kişinin günlük yaşam aktivitelerini etkileyecek derecede yıkılmasıdır. Primer dejeneratif demans grubunda ilerleyici kognitif bozukluklarla kendini gösteren hastalıklar grubunda en çok *Alzheimer* hastalığı ile karşılaşılmaktadır (131, 132).

*Alzheimer* hastalığı hafif, orta ve ileri derece şeklinde derecelendirilir (133). *Alzheimer* hastalığında klinik belirtiler; amnezi, afazi, apraksi ve agnozidir (134). Epizodik hafızanın bozulması/yitimi ve dizoryantasyonu önemli ana belirtileridir. Epizodik bellek özellikle hipokampus ve bu dokunun bozulması ile ilgilidir (135, 136).

Sadece nörodejeneratif hastalıklar değil, aynı zamanda, travmatik beyin hasarı, inme ve glioblastomlar ile ilgili araştırmalarda da bu sistem popülarizm kazanmıştır (137). Kronik fokal epilepsinin en yaygın formu olan temporal lob epilepsisi, yüksek bir bilişsel bozukluk prevalansı ile ilişkilidir, ancak altta yatan sorumlu patolojik mekanizmalar bilinmemektedir (138-140). Nörodejeneratif hastalık ilişkisi öne sürülen epilepide, *Dravet* sendromu ve *Lennox-Gastaut* sendromu olan çocuklarda, CB kullanımının potansiyel etkinliği araştırılmıştır (139-141).

Bu sonuçlar, ECB sistemik manüpilasyonlarının, hafıza kaybı ile ilişkili nörodejeneratif bozuklukları değiştirebileceğini göstermektedir. Bu da araştırmanın diğer önemli bir yönüdür.

Bu doktora tez araştırmasında, elde edilen veriler, sıçan hipokampal dokuları üzerinde gerçekleştirilen analizler sonrası elde edilmiştir. Hayvansal dokulardan elde edilen hücresel yanıtlar ile insan dokularından elde edilen hücresel yanıtların, doku hassasiyetleri gibi birçok farklılıklardan kaynaklanan yanıltıcı sonuçlar verdiği de kanıt değeri yüksek araştırmalarda raporlanmaktadır (142-146). Bu bizim araştırmamızın limitasyonudur.

## 8. SONUÇ

Bu doktora tez çalışmasında, grup 1 örnekler hem RT-qPCR analizleri hemde Western-blot analizlerinde referans örnek olarak kabul edilmiştir. Bu gruba hiçbir şey uygulanmamıştır. Grup 2 ve grup 3, agonist ve antagonist ilaçlar için kullanılan çözücülerin uygulandığı kontrol gruplarıdır. Yapılan analizler sonucunda kullanılan çözücülerin gen veya protein ifadesinde anlamlı bir değişime neden olmadığı görülmüştür. RT-qPCR deneylerinde; ilaç uygulamalarının, MMP-9, Notch1 ve PTEN gen ifadelerinde değişime neden olup olmadığı araştırılmıştır. Grup içinde ve gruplar arasında gen ifadelerinde kat değişimler gözlemlense bile, bu değişimlerin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür.

Fakat Western-blot sonuçları istatistiksel olarak değerlendirildiğinde en çok etkilenmesi beklenen gen ve ürünü olan MMP-9 ifadesinde gözlenen değişimler anlamlı bulunmazken ( $P>0,01$ ), AM251 uygulanan grup 5'te ve agonist AEA ile antagonist AM630'ün combine olarak uygulandığı grup 9'da Notch1 protein miktarının arttığı görülmüştür. Sadece antagonist AM630 uygulanan grup 6 ile ligand ve CB reseptör inhibitörlerinin beraber kullanıldığı grup 8, 9 ve 10'dan elde edilen hipokampal dokulardaki PTEN protein ifadesindeki artışın istatistiksel olarak da anlamlı olduğu belirlenmiştir ( $P<0,01$ ).

Bir haftalık ilaç uygulamasının gen ifadesinde değişime neden olmadan daha akut bir şekilde protein miktarında artışa neden olmuştur. Bu durum hipokampal hücrelerin uygulanan ilaçlara verdiği hızlı bir yanıt yorumlanmıştır. Uygulamalar MMP-9 gen veya protein düzeyinde değişime neden olmamıştır ancak MMP-9'un aktive ettiği yolaklardan biri olan Notch1 ifadesinde artış gözlenmiştir. Gözlenen Notch1 aktivasyonunun bu uygulama grubu için MMP-9'dan bağımsız olduğunu göstermektedir. Antagonist AM630 (Grup 6); agonist AEA ile antagonist AM251'in birlikte uygulandığı (Grup 8); agonist AEA ile birlikte antagonist AM630'un birlikte uygulandığı (Grup 9) ve agonist AEA ile kombine antagonist ML193'ün uygulandığı (Grup 10)'da gözlenen PTEN artışının bu gruplarda MMP-9 ifadesini baskılaması beklenirken bu gruplarda MMP-9 ifadesi değişmeden kalmıştır.

Hafıza ile ilişkili hastalıkların tedavisinde CB sistem üzerinden etki göstererek kullanılacak olan ilaçların geliştirilmesi için, hipokampal hücrelerde MMP-9 ifadesinin PTEN sinyal yolağı dışında başka sinyal yolakları tarafından kontrol ediliyor olabileceğini ve bu sinyal yolaklarının da araştırılması gerektiğini göstermektedir.



## 9. KAYNAKLAR

1. Padamsey Z, McGuinness L, Bardo SJ, Reinhart M, Tong R, Hedegaard A, et al. Activity-Dependent Exocytosis of Lysosomes Regulates the Structural Plasticity of Dendritic Spines. *Neuron*. 93(1): 132-46, 2017.
2. Wójtowicz T, Mozrzymas JW. Matrix metalloprotease activity shapes the magnitude of EPSPs and spike plasticity within the hippocampal CA3 network. *Hippocampus*. 24(2): 135-53, 2014.
3. Wiera G, Wozniak G, Bajor M, Kaczmarek L, Mozrzymas JW. Maintenance of long-term potentiation in hippocampal mossy fiber-CA3 pathway requires fine-tuned MMP-9 proteolytic activity. *Hippocampus*. 23(6): 529-43, 2013.
4. Wiera G, Nowak D, van Hove I, Dziegiel P, Moons L, Mozrzymas JW. Mechanisms of NMDA Receptor- and Voltage-Gated L-Type Calcium Channel-Dependent Hippocampal LTP Critically Rely on Proteolysis That Is Mediated by Distinct Metalloproteinases. *J Neurosci*. 37(5): 1240-56, 2017.
5. Szepesi Z, Bijata M, Ruszczycki B, Kaczmarek L, Włodarczyk J. Matrix metalloproteinases regulate the formation of dendritic spine head protrusions during chemically induced long-term potentiation. *PLoS One*. 8(5): e63314, 2013.
6. Sweatt J.D. Long-Term Potentiation: A Candidate Cellular Mechanism for Information Storage in the CNS p.295-326. In: Byrne JH Editor. *Learning and Memory: A Comprehensive Reference*. Academic Press, 2008.
7. Ulugöl A. The endocannabinoid system as a potential therapeutic target for pain modulation. *Balkan Med J*. 31(2): 115-20, 2014.
8. Bilir KA, Anli G, Ozkan E, Gunduz O, Ulugol A. Involvement of spinal cannabinoid receptors in the antipruritic effects of WIN 55,212-2, a cannabinoid receptor agonist. *Clin Exp Dermatol*. 43(5): 553-8, 2018.
9. Munawar N, Oriowo MA, Masocha W. Antihyperalgesic Activities of Endocannabinoids in a Mouse Model of Antiretroviral-Induced Neuropathic Pain. *Front Pharmacol*. 8: 136, 2017.

10. Colangeli R, Pierucci M, Benigno A, Campiani G, Butini S, Di Giovanni G. The FAAH inhibitor URB597 suppresses hippocampal maximal dentate afterdischarges and restores seizure-induced impairment of short and long-term synaptic plasticity. *Sci Rep.* 7(1): 11152, 2017.
11. Silva-Cruz A, Carlström M, Ribeiro JA, Sebastião AM. Dual Influence of Endocannabinoids on Long-Term Potentiation of Synaptic Transmission. *Front Pharmacol.* 8: 921, 2017.
12. Elkouss D, Pérez-García D. Memory effects can make the transmission capability of a communication channel uncomputable. *Nat Commun.* 9(1): 1149, 2018.
13. Verwijk E, Comijs HC, Kok RM, Spaans HP, Tielkes CE, Scherder EJ, et al. Short- and long-term neurocognitive functioning after electroconvulsive therapy in depressed elderly: a prospective naturalistic study. *Int Psychogeriatr.* 26(2): 315-24, 2014.
14. Song D, Yang Q, Lang Y, Wen Z, Xie Z, Zheng D, et al. Manipulation of hippocampal CA3 firing via luminospins modulates spatial and episodic short-term memory, especially working memory, but not long-term memory. *Neurobiol Learn Mem.* 155: 435-45, 2018.
15. Kemenes I, O'Shea M, Benjamin PR. Different circuit and monoamine mechanisms consolidate long-term memory in aversive and reward classical conditioning. *Eur J Neurosci.* 33(1): 143-52, 2011.
16. Cowan N. What are the differences between long-term, short-term, and working memory? *Prog Brain Res.* 169: 323-38, 2008.
17. Gorodetski L, Zeira R, Lavian H, Korngreen A. Long-term plasticity of glutamatergic input from the subthalamic nucleus to the entopeduncular nucleus. *Eur J Neurosci.* 48(5): 2139-51, 2018.
18. Lüscher C, Malenka RC. NMDA receptor-dependent long-term potentiation and long-term depression (LTP/LTD). *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 4(6): a005710, 2012.
19. Hu J, Schacher S. Persistent Associative Plasticity at an Identified Synapse Underlying Classical Conditioning Becomes Labile with Short-Term Homosynaptic Activation. *J Neurosci.* 35(49): 16159-70, 2015.

20. Rotenberg A, Mayford M, Hawkins RD, Kandel ER, Muller RU. Mice expressing activated CaMKII lack low frequency LTP and do not form stable place cells in the CA1 region of the hippocampus. *Cell*. 87(7): 1351-61, 1996.
21. Mayford M, Siegelbaum SA, Kandel ER. Synapses and memory storage. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 4(6): a005751, 2012.
22. Bailey CH, Kandel ER, Si K. The persistence of long-term memory: a molecular approach to self-sustaining changes in learning-induced synaptic growth. *Neuron*. 44(1): 49-57, 2004.
23. Kandel ER. The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science*. 294: 1030-8, 2001.
24. Liu RY, Neveu C, Smolen P, Cleary LJ, Byrne JH. Superior long-term synaptic memory induced by combining dual pharmacological activation of PKA and ERK with an enhanced training protocol. *Learn Mem*. 24(7): 289-97, 2017.
25. Shentu YP, Huo Y, Feng XL, Gilbert J, Zhang Q, Liuyang ZY, et al. CIP2A Causes Tau/APP Phosphorylation, Synaptopathy, and Memory Deficits in Alzheimer's Disease. *Cell Rep*. 24(3): 713-23, 2018.
26. Chang PK, Prenosil GA, Verbich D, Gill R, McKinney RA. Prolonged ampakine exposure prunes dendritic spines and increases presynaptic release probability for enhanced long-term potentiation in the hippocampus. *Eur J Neurosci*. 40(5): 2766-76, 2014.
27. Molnar E. Long-term potentiation in cultured hippocampal neurons. *Semin Cell Dev Biol*. 22(5): 506-13, 2011.
28. Tang Y, Ye M, Du Y, Qiu X, Lv X, Yang W, et al. EGFR signaling upregulates surface expression of the GluN2B-containing NMDA receptor and contributes to long-term potentiation in the hippocampus. *Neuroscience*. 304: 109-21, 2015.
29. Obenaus A, Mody I, Baimbridge KG. Dantrolene-Na (Dantrium) blocks induction of long-term potentiation in hippocampal slices. *Neurosci Lett*. 98(2): 172-8, 1989.

30. Yagami T, Koma H, Yamamoto Y. Pathophysiological Roles of Cyclooxygenases and Prostaglandins in the Central Nervous System. *Mol Neurobiol.* 53(7): 4754- 71, 2016.
31. Gjoneska E, Pfenning AR, Mathys H, Quon G, Kundaje A, Tsai LH, et al. Conserved epigenomic signals in mice and humans reveal immune basis of Alzheimer's disease. *Nature.* 518(7539): 365-9, 2015.
32. Valek L, Häussler A, Dröse S, Eaton P, Schröder K, Tegeder I. Redox-guided axonal regrowth requires cyclic GMP dependent protein kinase 1: Implication for neuropathic pain. *Redox Biol.* 11: 176-91, 2017.
33. Berger SM, Fernández-Lamo I, Schönig K, Fernández Moya SM, Ehses J, Schieweck R, et al. Forebrain-specific, conditional silencing of *Staufen2* alters synaptic plasticity, learning, and memory in rats. *Genome Biol.* 18(1): 222, 2017.
34. Asokan MM, Williamson RS, Hancock KE, Polley DB. Sensory overamplification in layer 5 auditory corticofugal projection neurons following cochlear nerve synaptic damage. *Nat Commun.* 9(1): 2468, 2018.
35. Bliss TV, Cooke SF. Long-term potentiation and long-term depression: a clinical perspective. *Clinics (Sao Paulo).* 66(Suppl 1): 3–17, 2011.
36. Afifi A, Bergman R. *Functional Neuroanatomy Text and Atlas.* 2nd edition (LANGE Basic Science), New York: Lange Medical Books-McGraw Hill; 2005.
37. Arifoğlu Y. Öğrenme ve Belleğin Nöroanatomisi. s.15-80, İçinde: Işık A, editör. *Her Yönüyle Alzheimer Hastalığı.* Som Kitap, İstanbul, 2012.
38. Stephen S. Sternberg MD. *Histology for pathologists.* p.248. Lippincott Philadelphia-New York: Raven Publishers; 1995.
39. Berry M, Bannister L, Standring S. *Gray's Anatomy.* p.1124 In: Williams P, Bannister L, Berry M, Collins P, Dyson M, Dussek J, et al., editors. 38th Edition, New York: Churchill Livingstone; 1995.
40. İkinci A, Beyin İskemisi Sonrasında Uygulanan Etil Piruvatın Sıçan Hipokampusünün Nöron Sayısı Üzerine Etkisi. KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, s.5-6, Trabzon, 2011.



41. Meydan S, Testosteron hormonu uygulanan sıçanlarda hipokampus morfolojik yapısının immunohistokimyasal olarak incelenmesi. Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Uzmanlık Tezi, s.1-7, Elâzığ, 2008.
42. Duvernoy HM, Cattin F, Risold PY. Structure, Functions, and Connections p.5-38 In: Duvernoy HM, Cattin F, Risold PY. Editors. The human hippocampus: Functional anatomy, vascularization and serial sections with MRI. Springer, 2005.
43. Amaral D, Lavenex P. Hippocampal Neuroanatomy p.93-8 In: Andersen P, Morris R, Amaral D, Bliss T, O'Keefe J Editors. The hippocampus book. New York, NY, US: Oxford University Press, 2007.
44. Bakırcı S, Deneysel Sepsis Oluşturulan Erişkin Sıçanların Beyinlerinde Nörogenezin İncelenmesi. Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Uzmanlık Tezi, s. 1-6, Bursa, 2009.
45. Warner-Schmidt JL, Duman RS. Hippocampal neurogenesis: opposing effects of stress and antidepressant treatment. *Hippocampus*. 16(3): 239-49, 2006.
46. Moscarello JM, Maren S. Flexibility in the face or fear: Hippocampal-prefrontal regulation of fear and avoidance. *Curr Opin Behav Sci*. 19: 44-9, 2018.
47. Seress L. Interspecies comparison of the hippocampal formation shows increased emphasis on the regio superior in the Ammon's horn of the human brain. *J Hirnforsch*. 29(3): 335-40, 1988.
48. Douglas R, Peterson J, Douglas D. The ontogeny of a hippocampus-dependent response in two rodent species. *Behav Biol*. 8(1): 27-37, 1973.
49. Bayer S, Altman J. Hippocampal development in the rat: Cytogenesis and morphogenesis examined with autoradiography and low-level X-irradiation. *J Comp Neurol*. 158: 55-80, 1974.
50. Eichenbaum H, Cohen, NJ. Hipocampus. In: Eichenbaum H, Cohen, NJ. From Conditioning to Conscious Recollection: Memory Systems of the Brain. New York, NY, US: Oxford University Press, 2001.
51. O'Keefe J, Nadel L. The Hippocampus as a Cognitive Map. Oxford: Clarendon Pres; 1978.

52. O'Mara S. The subiculum: what it does, what it might do, and what neuroanatomy has yet to tell us. *JAnat.* 207(3): 271-82, 2005.
53. Witter AD. The Rat Nervous System. p.635-704. In: Paxinos G editor. *Hippocampal Formation*. 3<sup>rd</sup> Edition, Elsevier, 2004.
54. Zhao C, Deng W, Gage FH. Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell.* 132(4): 645-60, 2008.
55. Kaptan Z, Üzüm G. Erişkin Hipokampal Nörogenezin Öğrenme ve Hafıza Fonksiyonlarındaki Rolü. *Turk J Neurol* 22: 149-55, 2016.
56. Schmidt B, Marrone DF, Markus EJ. Disambiguating the similar: the dentate gyrus and pattern separation. *Behav Brain Res.* 226(1): 56-65, 2012.
57. Elahi-Mahani A, Heysieattalab S, Hosseinmardi N, Janahmadi M, Seyedaghamiri F, Khoshbouei H. Glial cells modulate hippocampal synaptic plasticity in morphine dependent rats. *Brain Res Bull.* 140: 97-106, 2018.
58. Ohline SM, Abraham WC. Enviromental enrichment effects on synaptic and cellular physiology of hippocampal neurons. *Neuropharmacology.* S0028-3908(18)30162-X, 2018.
59. Bruel-Jungerman E, Davis S, Rampon C, Laroche S. Long-term potentiation enhances neurogenesis in the adult dentate gyrus. *J Neurosci.* 26(22): 5888-93, 2006.
60. Quadrato G, Benevento M, Alber S, Jacob C, Floriddia EM, Nguyen T, et al. Nuclear factor of activated T cells (NFATc4) is required for BDNF-dependent survival of adult-born neurons and spatial memory formation in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109(23): E1499-508, 2012.
61. Gouignard N, Andrieu C, Theveneau E. Neural crest delamination and migration: Looking forward to the next 150 years. *Genesis.* 56(6-7): e23107, 2018.
62. Wojtowicz JM. Adult neurogenesis. From circuits to models. *Behav Brain Res.* 227(2): 490-6, 2012.
63. Nakayama M, Inoue T, Naito M, Nakayama K, Ohara N. Attenuation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway by *Porphyromonas gingivalis* gingipains RgpA, RgpB, and Kgp. *J Biol Chem.* 290(8): 5190-202, 2015.

64. Horwood JM, Dufour F, Laroche S, Davis S. Signalling mechanisms mediated by the phosphoinositide 3-kinase/Akt cascade in synaptic plasticity and memory in the rat. *Eur J Neurosci.* 23(12): 3375-84, 2006.
65. Fruman DA, Chiu H, Hopkins BD, Bagrodia S, Cantley LC, Abraham RT. The PI3K Pathway in Human Disease. *Cell.* 170(4): 605-635, 2017.
66. Cho JW, Jung SY, Kim DY, Chung YR, Choi HH, Jeon JW, et al. PI3K-Akt-Wnt Pathway Is Implicated in Exercise-Induced Improvement of Short-term Memory in Cerebral Palsy Rats. *Int Neurorol J.* 22(Suppl 3): S156-164, 2018.
67. Yi J, Chen B, Yao X, Lei Y, Ou F, Huang F. Upregulation of the lncRNA MEG3 improves cognitive impairment, alleviates neuronal damage, and inhibits activation of astrocytes in hippocampus tissues in Alzheimer's disease through inactivating the PI3K/Akt signaling pathway. *J Cell Biochem.* 120(10): 18053-65, 2019.
68. Li H, Kang T, Qi B, Kong L, Jiao Y, Cao Y, et al. Neuroprotective effects of ginseng protein on PI3K/Akt signaling pathway in the hippocampus of D-galactose/A $\beta$ 1-42 inducing rats model of Alzheimer's disease. *J Ethnopharmacol.* 179: 162-9, 2016.
69. Tamura M, Gu J, Matsumoto K, Aota S, Parsons R, Yamada KM. Inhibition of cell migration, spreading, and focal adhesions by tumor suppressor PTEN. *Science.* 280(5369): 1614-7, 1998.
70. Myers MP, Stolarov JP, Eng C, Li J, Wang SI, Wigler MH, et al. PTEN, the tumor suppressor from human chromosome 10q23, is a dual specificity phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94 (17): 9052-7, 1997.
71. Stambolic V, Suzuki A, de la Pompa JL, Brothers GM, Mirtsos C, Sasaki T, et al. Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. *Cell.* 95(1): 29-39, 1998.
72. Yağcı E, Güneş HV. Notch Signaling Pathway and Carcinogenesis. *Osmangazi Journal of Medicine.* 39: 109-16, 2017.
73. Pagie S, Gérard N, Charreau B. Notch signaling triggered via the ligand DLL4 impedes M2 macrophage differentiation and promotes their apoptosis. *Cell Commun Signal.* 16(1): 4, 2018.

74. Bae JS, Kim SM, Lee H. The Hippo signaling pathway provides novel anti-cancer drug targets. *Oncotarget*. 8(9): 16084-98, 2017.
75. Shen W, Sun J. Dynamic Notch Signaling Specifies Each Cell Fate in *Drosophila* Spermathecal Lineage. *G3 (Bethesda)*. 7(5): 1417-27, 2017.
76. Hu C, Zeng L, Li T, Meyer MA, Cui MZ, Xu X. Nicastrin is required for amyloid precursor protein (APP) but not Notch processing, while anterior pharynx-defective 1 is dispensable for processing of both APP and Notch. *J Neurochem*. 136(6): 1246-58, 2016.
77. Costa RM, Honjo T, Silva AJ. Learning and memory deficits in Notch mutant mice. *Curr Biol*. 13(15): 1348-54, 2003.
78. Sargin D, Botly LC, Higgs G, Marsolais A, Frankland PW, Egan SE, et al. Disrupting Jagged1-Notch signaling impairs spatial memory formation in adult mice. *Neurobiol Learn Mem*. 103: 39-49, 2013.
79. Alberi L, Liu S, Wang Y, Badie R, Smith-Hicks C, Wu J, et al. Activity-induced Notch signaling in neurons requires Arc/Arg3.1 and is essential for synaptic plasticity in hippocampal networks. *Neuron*. 69(3): 437-44, 2011.
80. Zhao Y, Qiao X, Tan TK, Zhao H, Zhang Y, Liu L, et al. Matrix metalloproteinase 9-dependent Notch signaling contributes to kidney fibrosis through peritubular endothelial–mesenchymal transition. *Nephrol Dial Transplant*. 32(5): 781–91, 2017.
81. Dias BG, Goodman JV, Ahluwalia R, Easton AE, Andero R, Ressler KJ. Amygdala-dependent fear memory consolidation via miR-34a and Notch signaling. *Neuron*. 83(4): 906-18, 2014.
82. Reel B. Matriks Metalloproteinaz Enzimleri ve Ateroskleroz. *Turkiye Klinikleri J Med Sci*. 26(5): 527-37, 2006.
83. Karaarslan N, Gurbuz MS, Caliskan T, Ayan E, Aker FV, Berkman MZ. The Effect of Matrix Metalloproteinase-3 on the Prognosis and Biological Behaviour of Meningiomas. *Turk Neurosurg*. 26(5): 678-83, 2016.

84. Iulita MF, Ganesh A, Pentz R, Flores Aguilar L, Gubert P, et al. Identification and Preliminary Validation of a Plasma Profile Associated with Cognitive Decline in Dementia and At-Risk Individuals: A Retrospective Cohort Analysis. *J Alzheimers Dis.* 67(1): 327-41, 2019.
85. Wei H, Wang S, Zhen L, Yang Q, Wu Z, Lei X, et al. Resveratrol attenuates the blood-brain barrier dysfunction by regulation of the MMP-9/TIMP-1 balance after cerebral ischemia reperfusion in rats. *J Mol Neurosci.* 55(4): 872-9, 2015.
86. Duffy MJ, Maguire TM, Hill A, McDermott E, O'Higgins N. Metalloproteinases: role in breast carcinogenesis, invasion and metastasis. *Breast Cancer Res.* 2(4): 252-7, 2000.
87. Xing Y, Shepherd N, Lan J, Li W, Rane S, Gupta SK, et al. MMPs/TIMPs imbalances in the peripheral blood and cerebrospinal fluid are associated with the pathogenesis of HIV-1-associated neurocognitive disorders. *Brain Behav Immun.* 65: 161-72, 2017.
88. Qiao ZK, Li YL, Lu HT, Wang KL, Xu WH. Expression of tissue levels of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in renal cell carcinoma. *Word J Surg Oncol* 11: 1, 2013.
89. Yilmaz I, Gokay NS, Bircan R, Saracoglu GV, Dervisoglu S, Gokce A. How different methodologies of harvesting and analysing the samples affect the test results in determining joint mediators. *Arthritis.* 2013:631959, 2013.
90. MMP9 matrix metalloproteinase 9 [*Homo sapiens* (human)]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4318>, Erişim Tarihi: 20 Haziran 2019.
91. Console-Bram LM, Zhao P, Abood ME. Protocols and Good Operating Practices in the Study of Cannabinoid Receptors. *Methods Enzymol.* 593: 23-42, 2017.
92. Salaga M, Zatorski H, Zielińska M, Mosinska P, Timmermans JP, Kordek R, et al. Highly selective CB2 receptor agonist A836339 has gastroprotective effect on experimentally induced gastric ulcers in mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 390(10): 1015-27, 2017.

93. Janero DR, Korde A, Makriyannis A. Ligand-Assisted Protein Structure (LAPS): An Experimental Paradigm for Characterizing Cannabinoid-Receptor Ligand-Binding Domains. *Methods Enzymol.* 593: 217-35, 2017.
94. Yeliseev A, Gawrisch K. Expression and NMR Structural Studies of Isotopically Labeled Cannabinoid Receptor Type II. *Methods Enzymol.* 593: 387-403, 2017.
95. Console-Bram L, Ciuciu SM, Zhao P, Zipkin RE, Brailoiu E, Abood ME. N-arachidonoyl glycine, another endogenous agonist of GPR55. *Biochem Biophys Res Commun.* 490(4): 1389-93, 2017.
96. Barrie N, Kuruppu V, Manolios E, Ali M, Moghaddam M, Manolios N. Endocannabinoids in arthritis: current views and perspective. *Int J Rheum Dis.* 20(7): 789-97, 2017.
97. Woodhams SG, Chapman V, Finn DP, Hohmann AG, Neugebauer V. The cannabinoid system and pain. *Neuropharmacology.* 124: 105-20, 2017.
98. Lu Y, Anderson HD. Cannabinoid signaling in health and disease. *Can J Physiol Pharmacol.* 95(4): 311-27, 2017.
99. Luongo L, Starowicz K, Maione S, Di Marzo V. Allodynia Lowering Induced by Cannabinoids and Endocannabinoids (ALICE). *Pharmacol Res.* 119: 272-7, 2017.
100. Le Boisselier R, Alexandre J, Lelong-Boulouard V, Debryne D. Focus on cannabinoids and synthetic cannabinoids. *Clin Pharmacol Ther.* 101(2): 220-9, 2017.
101. Petrosino S, Di Marzo V. The pharmacology of palmitoylethanolamide and first data on the therapeutic efficacy of some of its new formulations. *Br J Pharmacol.* 174(11): 1349-65, 2017.
102. Fitzcharles MA, Häuser W. Cannabinoids in the Management of Musculoskeletal or Rheumatic Diseases. *Curr Rheumatol Rep.* 18(12): 76, 2016.
103. Kerbrat A, Ferré JC, Fillatre P, Ronzière T, Vannier S, Carsin-Nicol B, et al. Acute Neurologic Disorder from an Inhibitor of Fatty Acid Amide Hydrolase. *N Engl J Med.* 375(18): 1717-25, 2016.

104. La Porta C, Bura SA, Llorente-Onaindia J, Pastor A, Navarrete F, García-Gutiérrez MS, et al. Role of the endocannabinoid system in the emotional manifestations of osteoarthritis pain. *Pain*. 156(10): 2001-12, 2015.
105. Wasserman E, Tam J, Mechoulam R, Zimmer A, Maor G, Bab I. CB1 cannabinoid receptors mediate endochondral skeletal growth attenuation by  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol. *Ann N Y Acad Sci*. 1335: 110-9, 2015.
106. Gómez R, Conde J, Scotece M, López V, Lago F, Gómez Reino JJ, et al. Endogenous cannabinoid anandamide impairs cell growth and induces apoptosis in chondrocytes. *J Orthop Res*. 32(9): 1137-46, 2014.
107. Davis MP. Cannabinoids in pain management: CB1, CB2 and non-classic receptor ligands. *Expert Opin Investig Drugs*. 23(8): 1123-40, 2014.
108. La Porta C, Bura SA, Negrete R, Maldonado R. Involvement of the endocannabinoid system in osteoarthritis pain. *Eur J Neurosci*. 39(3): 485-500, 2014.
109. Fowler CJ, Holt S, Nilsson O, Jonsson KO, Tiger G, Jacobsson SO. The endocannabinoid signaling system: pharmacological and therapeutic aspects. *Pharmacol Biochem Behav*. 81(2): 248-62, 2005.
110. Rockwell CE, Kaminski NE. A cyclooxygenase metabolite of anandamide causes inhibition of interleukin-2 secretion in murine splenocytes. *J Pharmacol Exp Ther*. 311(2): 683-90, 2004.
111. Fowler CJ. Possible involvement of the endocannabinoid system in the actions of three clinically used drugs. *Trends Pharmacol Sci*. 25(2): 59-61, 2004.
112. Aguayo FI, Pacheco AA, García-Rojo GJ, Pizarro-Bauerle JA, Doberti AV, Tejos M, et al. Matrix Metalloproteinase 9 Displays a Particular Time Response to Acute Stress: Variation in Its Levels and Activity Distribution in Rat Hippocampus. *ACS Chem Neurosci*. 9(5): 945-56, 2018.
113. Stern CAJ, da Silva TR, Raymundi AM, de Souza CP, Hiroaki-Sato VA, Kato L, et al. Cannabidiol disrupts the consolidation of specific and generalized fear memories via dorsal hippocampus CB<sub>1</sub> and CB<sub>2</sub> receptors. *Neuropharmacology*. 125: 220-30, 2017.

114. Hurst K, Badgley C, Ellsworth T, Bell S, Friend L, Prince B, et al. A putative lysophosphatidylinositol receptor GPR55 modulates hippocampal synaptic plasticity. *Hippocampus*. 27(9): 985-98, 2017.
115. Basavarajappa BS, Nagre NN, Xie S, Subbanna S. Elevation of endogenous anandamide impairs LTP, learning, and memory through CB1 receptor signaling in mice. *Hippocampus*. 24(7): 808-18, 2014.
116. Lin QS, Yang Q, Liu DD, Sun Z, Dang H, Liang J, et al. Hippocampal endocannabinoids play an important role in induction of long-term potentiation and regulation of contextual fear memory formation. *Brain Res Bull*. 86(3-4): 139-45, 2011.
117. Lees G, Dougalis A. Differential effects of the sleep-inducing lipid oleamide and cannabinoids on the induction of long-term potentiation in the CA1 neurons of the rat hippocampus in vitro. *Brain Res*. 997(1): 1-14, 2004.
118. Terranova JP, Michaud JC, Le Fur G, Soubrié P. Inhibition of long-term potentiation in rat hippocampal slices by anandamide and WIN55212-2: reversal by SR141716 A, a selective antagonist of CB1 cannabinoid receptors. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol*. 352(5): 576-9, 1995.
119. Dziembowska M, Milek J, Janusz A, Rejmak E, Romanowska E, Gorkiewicz T, et al. Activity-dependent local translation of matrix metalloproteinase-9. *J Neurosci*. 32(42): 14538-47, 2012.
120. Brzdak P, Włodarczyk J, Mozrzyk JW, Wojtowicz T. Matrix Metalloprotease 3 Activity Supports Hippocampal EPSP-to-Spike Plasticity Following Patterned Neuronal Activity via the Regulation of NMDAR Function and Calcium Flux. *Mol Neurobiol*. 54(1): 804-16, 2017.
121. Tsilibary E, Tzinia A, Radenovic L, Stamenkovic V, Lebitko T, Mucha M, et al. Neural ECM proteases in learning and synaptic plasticity. *Prog Brain Res*. 214: 135-57, 2014.
122. Frampton G, Coufal M, Li H, Ramirez J, DeMorrow S. Opposing actions of endocannabinoids on cholangiocarcinoma growth is via the differential activation of Notch signaling. *Exp Cell Res*. 316(9): 1465-78, 2010.



123. Madeo G, Schirinzi T, Maltese M, Martella G, Rapino C, Fezza F, et al. Dopamine-dependent CB1 receptor dysfunction at corticostriatal synapses in homozygous PINK1 knockout mice. *Neuropharmacology*. 101: 460-70, 2016.
124. Tsien RY. Very long-term memories may be stored in the pattern of holes in the perineuronal net. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 110(30): 12456-61, 2013.
125. Joshi N, Onaivi ES. Endocannabinoid System Components: Overview and Tissue Distribution. *Adv Exp Med Biol*. 1162: 1-12, 2019.
126. García-Baos A, Alegre-Zurano L, Cantacorps L, Martín-Sánchez A, Valverde O. Role of cannabinoids in alcohol-induced neuroinflammation. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 104: 110054, 2021.
127. Maurya N, Velmurugan BK. Therapeutic applications of cannabinoids. *Chem Biol Interact*. 293: 77-88, 2018.
128. Horn H, Böhme B, Dietrich L, Koch M. Endocannabinoids in Body Weight Control. *Pharmaceuticals (Basel)*. 11(2): 55, 2018.
129. Çakır M, Tekin S, Doğanyiğit Z, Erden Y, Soytürk M, Çiğremiş Y, Sandal S. Cannabinoid type 2 receptor agonist JWH-133, attenuates Okadaic acid induced spatial memory impairment and neurodegeneration in rats. *Life Sci*. 15; 217: 25-33, 2019.
130. Almeida V, Levin R, Peres FF, Suiama MA, Vendramini AM, Santos CM, Silva ND, Zuardi AW, Hallak JEC, Crippa JA, Abílio VC. Role of the endocannabinoid and endovanilloid systems in an animal model of schizophrenia-related emotional processing/cognitive deficit. *Neuropharmacology*. 155: 44-53, 2019.
131. Hussain R, Zubair H, Pursell S, Shahab M. Neurodegenerative Diseases: Regenerative Mechanisms and Novel Therapeutic Approaches. *Brain Sci*. 8(9): 177, 2018.
132. Duong S, Patel T, Chang F. Dementia: What pharmacists need to know. *Can Pharm J (Ott)*. 150(2): 118-29, 2017.
133. Birks JS, Harvey RJ. Donepezil for dementia due to Alzheimer's disease. *Cochrane Database Syst Rev*. 6(6): CD001190, 2018.

134. Erkinen MG, Kim MO, Geschwind MD. Clinical Neurology and Epidemiology of the Major Neurodegenerative Diseases. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 10(4): a033118, 2018.
135. Apostolova LG. Alzheimer Disease. *Continuum (Minneapolis, Minn.)*. 22(2): 419-34, 2016.
136. Wang XX, Zhang B, Xia R, Jia QY. Inflammation, apoptosis and autophagy as critical players in vascular dementia. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 24(18): 9601-14, 2020.
137. Cristino L, Bisogno T, Di Marzo V. Cannabinoids and the expanded endocannabinoid system in neurological disorders. *Nat Rev Neurol.* 16(1): 9-29, 2020.
138. Tai XY, Koeppe M, Duncan JS, Fox N, Thompson P, Baxendale S, Liu JY, Reeves C, Michalak Z, Thom M. Hyperphosphorylated tau in patients with refractory epilepsy correlates with cognitive decline: a study of temporal lobe resections. *Brain.* 139(Pt9): 2441-55, 2016.
139. Bernasconi N. Is epilepsy a curable neurodegenerative disease? *Brain.* 139 (Pt9): 2336-7, 2016.
140. Gaston TE, Szaflarski JP. Cannabis for the Treatment of Epilepsy: an Update. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 18(11): 73, 2018.
141. Morano A, Fanella M, Albini M, Cifelli P, Palma E, Giallonardo AT, Di Bonaventura C. Cannabinoids in the Treatment of Epilepsy: Current Status and Future Prospects. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 16: 381-96, 2020.
142. Kaya YE, Karaarslan N, Sirin DY, Ozbek H, Kaplan N, Yilmaz I. Investigation of the Effects of Methylphenidate, an Amphetamine Derivative, on Intervertebral Disc Tissue Cell Cultures and Matrix Structures. *Turk Neurosurg.* 29(5):734-42, 2019.
143. Akgun FS, Sirin DY, Yilmaz I, Karaarslan N, Ozbek H, Simsek AT, Kaya YE, Kaplan N, Akyuva Y, Caliskan T, Ates O. Investigation of the effect of dipyrone on cells isolated from intervertebral disc tissue. *Exp Ther Med.* 18(1):216-24, 2019.

144. Kaplan N, Yilmaz I, Karaarslan N, Kaya YE, Sirin DY, Ozbek H. Does Nimodipine, a Selective Calcium Channel Blocker, Impair Chondrocyte Proliferation or Damage Extracellular Matrix Structures? *Curr Pharm Biotechnol.* 20(6):517-24, 2019.
145. Karaarslan N, Yilmaz I, Ozbek H, Yasar Sirin D, Kaplan N, Caliskan T, Ozdemir C, Akyuva Y, Ates O. Are radio-contrast agents commonly used in discography toxic to the intact intervertebral disc tissue cells? *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 124(2):181-9, 2019.
146. Karaarslan N, Yilmaz I, Ozbek H, Sirin DY, Kaplan N, Akyuva Y, Gonultas A, Ates O. Are Specific Gene Expressions of Extracellular Matrix and Nucleus Pulposus Affected by Primary Cell Cultures Prepared from Intact or Degenerative Intervertebral Disc Tissues? *Turk Neurosurg.* 29(1):43-52, 2019.

## 10. ETİK KURUL ONAYI



**T.C.**  
**İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ**  
**Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı**

E-İmzalıdır

Sayı : 38828770-604.01.01-E.10835  
Konu : Etik Kurulu Kararı

13/03/2019

**Sayın Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK**

Üniversitemiz Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kuruluna yapmış olduğunuz “Anandamid ve antagonistlerinin MMP-9 ilişkili hipokampüse bağlı hafıza üzerine sıçanlardaki etkilerinin farmakomoleküler düzeyde incelenmesi” isimli başvurunuz incelenmiş olup, etik kurulu kararı ekte sunulmuştur.

Bilgilerinize rica ederim.

Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK  
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu  
(İMÜ-HADYEK) Başkanı

Ek:  
-Karar Formu (1 sayfa)

Bu belge 5070 sayılı e-İmza Kanununa göre Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK tarafından 13.03.2019 tarihinde e-imzalanmıştır. Evrağımızı <https://ebys.medipol.edu.tr/e-imza> linkinden 31432D6CX0 kodu ile doğrulayabilirsiniz.

İstanbul Medipol Üniversitesi

Kavacık Mah. Ekinciler Cad. No.19 Kavacık Kavşağı - Beykoz  
34810 İstanbul

Tel: 444 85 44

İnternet: [www.medipol.edu.tr](http://www.medipol.edu.tr)  
Ayrıntılı Bilgi İçin : [bilgi@medipol.edu.tr](mailto:bilgi@medipol.edu.tr)



T.C.  
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ  
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (İmü-Hadyek) Kararı

| Toplantı Tarihi | Karar No | İlgi | Proje Yürütücüsü       |
|-----------------|----------|------|------------------------|
| 13/03/2019      | 12       |      | Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK |

“Anandamid ve antagonistlerinin MMP-9 ilişkili hipokampüse bağlı hafıza üzerine sıçanlardaki etkilerinin farmakomoleküler düzeyde incelenmesi” başlıklı bilimsel araştırma etik kurulumuzda görüşülmüş olup, çalışmanın etik kurallara uygun olduğuna “Oybirliği” ile karar verilmiştir.

Etik Onay Geçerlilik Süresi: 01/03/2019 – Altı (6) ay.

| GÖREVİ | ADI SOYADI                        | İMZA |
|--------|-----------------------------------|------|
| Başkan | Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK            |      |
| Üye    | Dr. Öğr. Üyesi Turan DEMİRCAN     |      |
| Üye    | Dr. Öğr. Üyesi Sultan Sibel ERDEM |      |
| Üye    | Dr. Öğr. Üyesi Mehmet OZANSOY     |      |
| Üye    | Dr. Öğr. Üyesi Taha KELEŞTEMUR    |      |
| Üye    | Uzm.Vet. Hek. Ekrem Musa ÖZDEMİR  |      |
| Üye    | Cem GÜNEŞ                         |      |
| Üye    | Burak Sefa DERİBAŞ                |      |