

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOFİZİK ANABİLİM DALI

**FARKLI DOZLARDA DİYETLE ALINAN SODYUM
METABİSÜLFİTİN ÖĞRENME ÜZERİNE
ETKİLERİNDE GLUTAMATIN ROLÜ**

Ceren KENCEBAY MANAS

DOKTORA TEZİ

2017-ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOFİZİK ANABİLİM DALI

**FARKLI DOZLARDA DİYETLE ALINAN SODYUM
METABİSÜLFİTİN ÖĞRENME ÜZERİNE
ETKİLERİNDE GLUTAMATIN ROLÜ**

Ceren KENCEBAY MANAS

DOKTORA TEZİ

Tez Danışmanı
Prof. Dr. NARİN DERİN

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 2014.03.0122.002 proje numarası ile desteklenmiştir.

“Kaynakça gösterilerek tezimden yararlanılabilir.”

2017-ANTALYA

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Bu çalışma jürimiz tarafından Biyofizik Anabilim Dalı Programında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir. 10.03.2017

Tez Danışmanı:

Prof. Dr. Narin DERİN

Akdeniz Üniversitesi



Üye:

Prof. Dr. Piraye YARGIÇOĞLU

Akdeniz Üniversitesi



Üye:

Prof. Dr. Aysel AĞAR

Akdeniz Üniversitesi



Üye:

Doç. Dr Mete ÖZCAN

Fırat Üniversitesi



Üye:

Yrd. Doç. Dr Deniz AKPINAR

Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi



Onay:

Bu tez, Enstitü Yönetimi Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../..... tarih,/..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Narin DERİN

Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı beyan ederim.

Ceren KENCEBAY MANAS

İmza

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Narin DERİN

TEŐEKKÜR

Lisansüstü eğitimim süresince 'her konuda' şanslı hissetmemi sağlayan, kendisi tarafından yetiştirilmekten gurur duyduğum çok değerli tez danışmanım Prof. Dr. Narin DERİN'e,

Bilgilerinden, deneyimlerinden ve akademik bakış açılarından yararlanma olanağı bulduğum başta Prof. Dr. Piraye YARGIÇOĞLU AKKİRAZ olmak üzere tüm anabilim dalımızın öğretim üyelerine, bu araştırmanın gerçekleşmesine katkı sağlayan Prof. Dr. Mutay ASLAN, Doç. Dr. Dijle KİPMEN KORGUN, Doç. Dr. Mehmet BÜLBÜL ve Doç. Dr. Güzide Ayşe OCAK'a, deney sürecinde bana yardımcı olan Araş. Gör. Osman SİNEN ve Biyolog Vedat GÖK'e, Deney Hayvanları Ünitesi çalışanlarına, Sağlık Bilimleri Enstitüsü personellerine,

"Biz" olduğumuz ilk günden beri sabırla, inançla ve özveriyle hayatımı kolaylaştıran sevgili eşim Muzaffer Arıkan Manas'a,
Yaşama sevincim, oğlum Demirkan Rüzgar Manas'a
Eşsiz saf sevgileriyle beni yetiştiren, öğrendiğim her güzel şeyi yaşamıma yansıtmayı öğreten ve her zaman yanımda olan annem Hayrunnisa KENCEBAY,
babam Serdar KENCEBAY ve kardeşim Cansu KENCEBAY'a

Sonsuz saygı ve teşekkürü borç bilirim.

ÖZET

Amaç: Çalışmamızda farklı dozlarda diyetle alınan sodyum metabisülfidin öğrenme ve hafıza mekanizması üzerine etkilerinde glutamat döngüsünün rolü incelenmiştir.

Yöntem: 90 adet erkek Wistar sıçan üç gruba ayrılmıştır: Kontrol grubu [(K)], 100 mg/kg/gün dozunda sodyum metabisülfid uygulanan grup [S(100)] ve 260 mg/kg/gün dozunda sodyum metabisülfid uygulanan grup [S(260)]. Öğrenme deneyleri için açık alan testi ve radyal kollu labirent testleri uygulanmıştır. Mikrodializ yöntemiyle toplanan diyalizatta glutamat ve glutamin seviyeleri ölçülmüştür. Buna ek olarak, hipokampus da veziküler glutamat taşıyıcı-1 (VGLUT), eksitatör amino asit taşıyıcı-1, 2 ve 3 (EAAT1, EAAT2 ve EAAT3) düzeyleri reverse transkripsiyon-polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) yöntemiyle değerlendirilmiştir.

Bulgular: Sülfid uygulanan gruptaki sıçanların %80 doğruluk kriterine ulaşamadığı gözlenmiştir. Radyal kollu labirent testinde sülfidin referans ve çalışan hafıza hatalarını arttırdığı saptanmıştır. Açık alan testinde gruplar arasında bir fark bulunmamıştır. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında S(100) ve S(260) gruplarında hipokampal glutamat ve glutamin düzeylerinin azaldığı tespit edilmiştir. VGLUT1 ve EAAT2 mRNA düzeyleri arasında anlamlı fark bulunmazken, sülfidin EAAT1 ve EAAT3 mRNA düzeylerini doza bağlı olarak azalttığı gösterilmiştir.

Sonuç: Çalışmamızda farklı dozlarda diyetle alınan sülfidin öğrenme ve hafızayı bozduğu gösterilmektedir. Bu sonuçlar sülfidin öğrenme ve hafıza üzerindeki olumsuz etkilerinin glutamat döngüsü ile ilişkili olabileceğini işaret etmektedir.

Anahtar kelimeler: Sülfid, Öğrenme ve Hafıza, Glutamat, Glutamin

ABSTRACT

Objective: In our study, we investigated the effects of different dietary sodium metabisulfite doses on learning and memory processes associated with glutamate cycling.

Method: 90 male Wistar rats were divided into three groups: control [(C)], treated with 100 mg/kg/day sodium metabisulfite [S(100)] and treated with 260 mg/kg/day sodium metabisulfite [S(260)]. Radial arm maze and open field tests were performed in order to evaluate learning and memory. Glutamate and glutamine levels were determined in the dialysate collected by microdialysis. Additionally, vesicular glutamate transporter-1 (VGLUT1), excitatory amino acid transporter-1, 2 and 3 (EAAT1, EAAT2 and EAAT3) levels were measured by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) method in hippocampus.

Results: The rats in the sulfite-treated group did not reach the criteria of 80% correct choice. The sulfite groups showed more reference and working memory errors in radial arm maze task. No significant difference was observed among open field results of groups. The levels of glutamate and glutamine in hippocampus were decreased in S(100) and S(260) groups compared with the C group. While no significant difference was found among groups' mRNA levels of VGLUT1 and EAAT2, sulfite treatment caused a dose-dependent decrease in EAAT1 and EAAT3 mRNA levels.

Conclusion: Our study showed that different doses of dietary sulfite impaired learning and memory. These results implied that negative effects of sulfite in learning and memory might be mediated with glutamate cycle.

Key words: Sulfite, Learning and Memory, Glutamate, Glutamine

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
TABLolar DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Sülfıt	3
2.1.1. Sülfıt Maruziyeti	3
2.1.2. Sülfıt Metabolizması	5
2.1.3. Sülfıtın Yan Etkileri	6
2.1.4. Sülfıt Radikallerinin Oluşumu	7
2.1.5. Sülfıt Aracılığıyla Oluşan Radikallerin Biyomoleküllere Etkisi	9
2.1.6. Sülfıt Toksisitesi	11
2.2. Öğrenme ve Hafıza	11
2.2.1. Hafızanın Sınıflandırılması	11
2.2.2. Hipokampus	15
2.2.3. Hafızanın Nörokimyasal Mekanizması	16
2.2.4. Öğrenme ve Davranış Paradigmaları	19
2.3. Glutamat	21
2.3.1. Glutamat Sentezi	22
2.3.2. Glutamat Salınması	24
2.3.3. Glutamatın Geri Alımı	25
2.3.4. Glutamat Yıkımı	27
2.3.5. Glutamat Reseptörleri	29

3. GEREÇ VE YÖNTEM	33
3.1. Gruplandırma ve Deney Protokolü	33
3.2. Öğrenme Deneyleri	34
3.2.1. Sekiz Kollu Radyal Labirent Testi	34
3.2.2. Açık Alan Testi	35
3.3. Mikrodiyaliz Yöntemi	35
3.4. Hematoksilen Eozin Boyaması ile Kanülasyonunun Doğrulanması	36
3.5. Kütle Spektrometresi (Mass Spectrometry) ile Glutamat ve Glutamin Tayini	36
3.6. RT-PCR Analizi ile VGLUT1,EAAT1 EAAT2 ve EAAT3 Düzeylerinin Tayini	37
3.7. İstatistiksel Analiz	39
4. BULGULAR	40
4.1. Genel Görünüm	40
4.2. Sekiz Kollu Radyal Labirent Sonuçları	40
4.3. Açık Alan Testi Sonuçları	42
4.4. Hematoksilen Eozin Boyaması ile Kanülasyonunun Doğrulanması	42
4.5. Kütle Spektrometresi (Mass Spectrometry) ile Glutamat ve Glutamin Tayini Sonuçları	43
4.6. VGLUT1 Düzeyinin RT-PCR Analizi Sonuçları	44
4.7. EAAT1, EAAT2 ve EAAT3 Düzeylerinin RT-PCR Analizi Sonuçları	44
5. TARTIŞMA	46
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	51
KAYNAKLAR	52
ÖZGEÇMİŞ	67

SİMGELER VE KISALTMALAR

4-HNE	:	4-hidroksi-2-nonenal
A	:	Alanin
AC	:	Adenilat siklaz
aCSF	:	Ticari yapay serebrospinal sıvı
AH	:	Alzheimer hastalığı
ADI	:	Günlük kabul edilebilir
ALS	:	Amyotrofik lateral skleroz
AMPA	:	α -amino-3-hidroksi-5-metil-isoksazol-4-propionik asit
ANOVA	:	One-way varyans analizi
ASC	:	Alanin, serin, sistein taşıyan sistem
ASCT	:	ASC taşıyıcı
ATP	:	Adenozin trifosfat
C	:	Sistein
Ca⁺²	:	Kalsiyum
CaMKII	:	Kalsiyum/kalmodulin kinaz II
cAMP	:	Siklik adenozin monofosfat
CREB	:	CAMP-duyarlı eleman bağlama proteini
DNA	:	Deoksiribonükleik asit
e⁻	:	Elektron
EAAT	:	Eksitatör amino asit taşıyıcı
ESI	:	Elektrosprey iyonizasyon
FAO	:	Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü
FDA	:	Gıda ve İlaç İdaresi
GDH	:	Glutamat dehidrogenaz
GLAST	:	Glutamat aspartat taşıyıcı
GLUD	:	Glutamat dehidrogenaz geni
GLT-1	:	Glial glutamat taşıyıcı-1
GS	:	Glutamin sentetaz
H₂O₂	:	Hidrojen peroksit
HE	:	Hematoksilen eozin
HRP	:	Horseradish peroksidaz

HSO₃⁻	:	Bisülfıt
IET	:	İntramoleküler elektron transfer
IP3	:	İnositol-3-fosfat
iGluR	:	İyonotropik glutamat reseptörleri
JECFA	:	FAO/WHO Uzman Komitesi
K⁺	:	Potasyum
KA	:	Kainik asit
KGA	:	Gls1 geni-böbrek tipi
L[·]	:	Lipid serbest radikali
LGA	:	Gls2 geni karaciğer-tipi
LH	:	Membran lipidlerini
LO[·]	:	Oksil radikali
LOO[·]	:	Lipid peroksit radikali
LOO[·]	:	Peroksil radikali
LOOH	:	Lipid hidroperoksit
LTP	:	Uzun süreli güçlenme
MDA	:	Malondialdehid
Mg⁺²	:	Magnezyum
mGluR	:	Metabotropik glutamat reseptörleri
Mo	:	Molibdenyum
MRM	:	Multiple reaction monitoring
MSS	:	Merkezi sinir sistemi
Na⁺²	:	Sodyum
Na₂S₂O₅	:	Sodyummetabisülfıt
NADP	:	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NH₂	:	Amin
NMDA	:	N-metil D-aspartat
NOS	:	Nitrik oksit sentaz
O₂	:	Oksijen
O₂^{·-}	:	Süperoksit radikali
OH[·]	:	Hidroksil radikali
ONOO⁻	:	Peroksinitrit
PKC	:	Protein Kinaz C

PLC	:	Fosfolipaz C
RME	:	Referans hafıza hatası
S	:	Serin
Sito-c	:	Sitokrom c
SNAT	:	Na ⁺ -bağlı nötral amino asit taşıyıcı
SO₂	:	Sülfür dioksit
SO₃[•]	:	Sülfür trioksit radikali
SO₃⁻²	:	Sülfat
SO₄[•]	:	Sülfat radikali
SO₄⁻²	:	Sülfat
SO₅[•]	:	Peroksisülfat radikali
SOX	:	Sülfat oksidaz
VGLUT	:	Veziküler glutamat taşıyıcı
WHO	:	Dünya sağlık örgütü
WME	:	Çalışan hafıza hatası
X_c⁻	:	Sistin-glutamat değiş-tokuşcu proteini

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1	Endojen Sülfid Sentezi	4
Şekil 2.2	SOX'un Reaksiyon Mekanizması	5
Şekil 2.3.	Uzun Süreli Hafıza Türleri	12
Şekil 2.4	LTP'nin Moleküler Mekanizması	18
Şekil 2.5	Öğrenme ve Davranış Paradigmaları	21
Şekil 2.6	Glutamatın Kimyasal Yapısı	21
Şekil 2.7	Glutamat-Glutamin Döngüsü	29
Şekil 3.1	Sekiz Kollu Radyal Labirent	34
Şekil 4.1	Tüm gruplara ait % 80 doğruluk kriterine ulaşılan gün sayısı	40
Şekil 4.2	1. ve 10. Günler Arasında Referans Hafıza Hatası Sayıları	41
Şekil 4.3	1. ve 10. Günler Arasında Çalışan Hafıza Hatası Sayıları	41
Şekil 4.4	Kanül Hattı Bölgesi	42
Şekil 4.5	Hipokampusta Ölçülen Glutamat Konsantrasyonu	43
Şekil 4.6	Hipokampusta Ölçülen Glutamin Konsantrasyonu	43
Şekil 4.7	VGLUT1 Düzeyinin RT-PCR Analizi Sonuçları	44
Şekil 4.8	EAAT1, EAAT2 ve EAAT3 Düzeylerinin RT-PCR Analizi Sonuçları	45

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 3.1	Real-time PCR için kullanılan primerlerin sekansları	38
Tablo 4.1	Açık alan testinde girilen kare sayısı, kat edilen toplam Mesafe ve ortalama hız sonuçları	42
Tablo 4.2	Hipokampusta Ölçülen Glutamat-Glutamin Konsantrasyonları	44



1. GİRİŞ

Antimikrobiyal ve antioksidan bir ajan olan sülfid, koruyucu olarak gıda, ilaç ve kozmetik endüstrisinde sıkça kullanılmaktadır (Cabre ve ark., 1990; Woo ve ark., 2003). Sülfidin ekzojen maruziyeti, katkı maddesi olarak eklendiği ürünlerin tüketilmesi, endojen maruziyeti ise aminoasit metabolizması sonucu gerçekleşmektedir. Sülfid dokularda sülfid oksidaz (SOX) enzimi aracılığıyla zararsız bileşiklere metabolize edilmektedir. Fakat alman sülfidin metabolize edilemeyecek miktarda olması veya SOX aktivitesinin düşük olması sonucu sülfid radikalleri meydana gelmektedir. Bu radikaller protein, lipid ve nükleik asitlerle reaksiyona girerek hücresel hasara neden olmaktadır (Reist ve ark., 1998; Meng ve ark., 2005). Ekibimiz 100 mg/kg/gün dozundaki sülfidin beyin dokusunda nörodejenerasyona ve apoptozise neden olduğunu göstermiştir (Kencebay ve ark., 2013). Bu bulgudan yola çıkarak nörotoksik etkileri bilinen sülfidin öğrenme ve hafızayı etkileyebileceği fikri akla gelmektedir. Nitekim yapılan çalışmalarda sülfidin hipokampal dokuda bulunan piramidal nöronlarda hasar meydana getirdiği, sıçanlarda öğrenme parametresi olan aktif sakınma cevaplarını ve uzaysal hafızayı bozduğu gösterilmiştir (Akdogan ve ark., 2011; Ozsoy ve ark., 2012; Noorafshan ve ark., 2013). Hipokampusta gerçekleşen öğrenme ve hafıza sürecinde rol alan ana nörotransmitterin glutamat olduğu bilinmektedir. Nöronlarda sentezlenen glutamat veziküller glutamat taşıyıcı (VGLUT) aracılığıyla veziküllerde depolanmakta ve presinaptik alana gelen uyarılara cevaben sinaptik boşluğa salınmaktadır (Danbolt, 2001). Alzheimer hastalığı (AH) olan fareler üzerinde yapılan bir çalışmada, hipokampusta VGLUT1 düzeyinin azaldığı, bu azalmanın öğrenme ve hafıza bozukluğu ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Liraz ve ark., 2013). Sinaptik aralığa salınan glutamat, reseptörlerine bağlanarak hücresel cevaba neden olmaktadır. Sinaptik boşluktaki reseptörlerine bağlanmayan fazla glutamat ise eksitator amino asit taşıyıcılar (EAAT) tarafından geri alınmaktadır (Bergles ve ark., 1999; Danbolt, 2001). Hipokampusta yüksek ekspresyona sahip olan EAAT'ların öğrenme ve hafıza sürecinde önemli rolleri olduğu düşünülmektedir. EAAT2-knockout hayvanlarda hücre ölümü, demiyelinizasyon ve aksonal hasar gözlenmektedir (Rothstein ve ark., 1996). Heo ve arkadaşları T-labirent ile uzaysal hafıza eğitimi verilmiş ve

verilmemiş fareler üzerinde deneyler yapmış, uzaysal hafıza eğitimi verilmiş farelerin hipokampus dokusunda EAAT2 düzeylerinde artış olduğunu rapor etmişlerdir (Heo ve ark., 2012).

Daha önce yapılan çalışmalarda gıdalar yoluyla günlük alınabilecek farklı dozlardaki sodyum metabisülfite sığın beyin dokusundaki etkileri ortaya konmasına rağmen, öğrenme üzerindeki etkileri ve mekanizmaları hala tam olarak bilinmemektedir. Bu nedenle çalışmamızda farklı dozlarda diyetle alınan sodyum metabisülfite öğrenme ve hafıza üzerine etkileri öğrenme deneyleri ile değerlendirilmiş olup glutamat ve glutamin düzeyleri, VGLUT1, EAAT1, EAAT2 ve EAAT3 seviyeleri belirlenerek sülfite nörotoksitesine bağlı öğrenme ve hafıza değişikliklerinin mekanizmasının açıklanması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

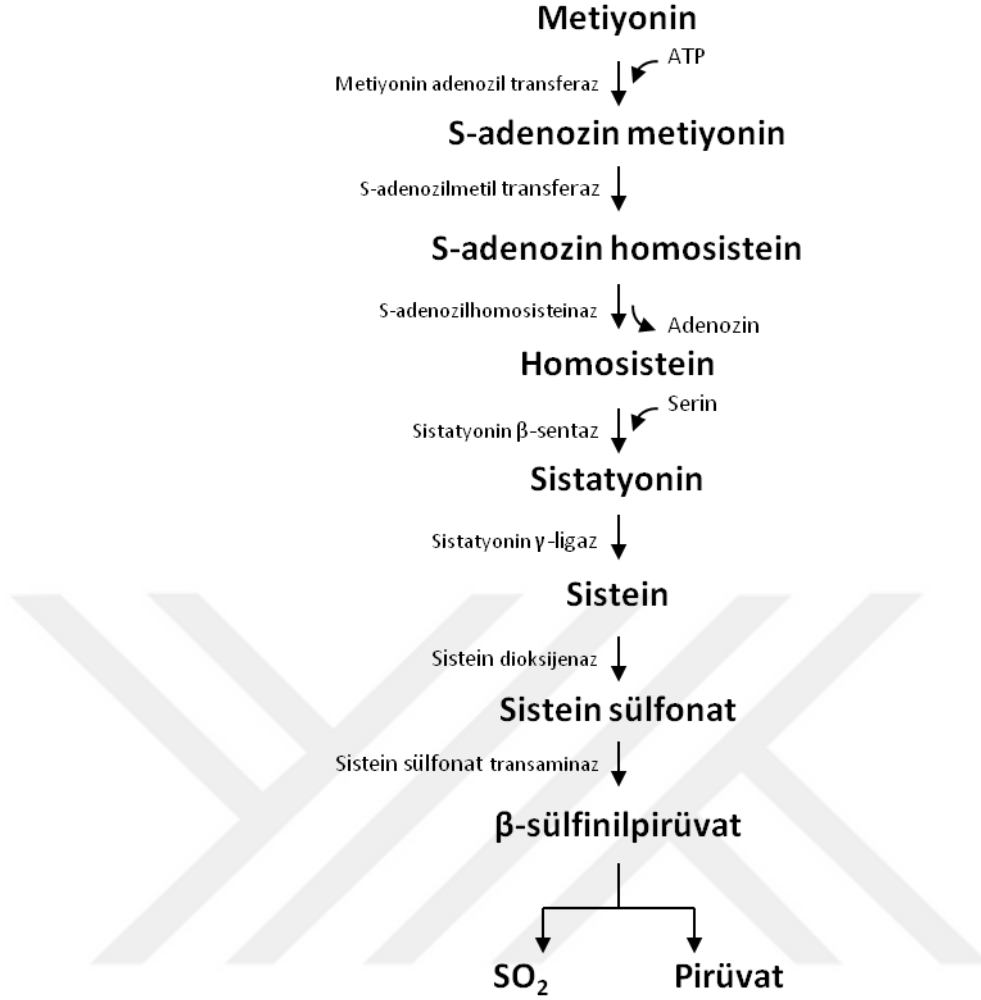
2.1. Sülfıt

Protein, nükleik asit ve aminoasit gibi biyomoleküllerin yapısında bulunan sülfıt aynı zamanda katkı maddesi ve koruyucu olarak birçok sektörde kullanılmaktadır (Gunnison ve Jacobsen, 1987).

2.1.1. Sülfıt Maruziyeti

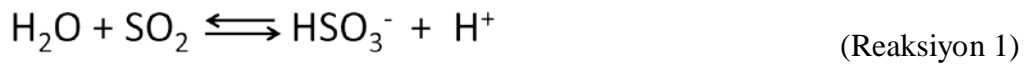
Antimikrobiyal, antioksidan, enzim inhibitörü ve indirgeyici bir ajan olan sülfıtın gıdalarda renk değişimlerini stabilize ettiği, renk bozulmalarını engellediği, lezzet ve dayanıklılığı arttırdığı bilinmektedir (Vally ve Misso, 2012). Sülfıt şarap, bira, alkolsüz içecekler, kurutulmuş ve işlenmiş yiyecekler, deniz ve et ürünleri gibi gıdalarda değişik dozlarda kullanılmaktadır. Çoğu ülkede taze yiyecekler, et ürünleri, bira ve şarapta sülfıt ajanlarının kullanılması tamamen yasal olmasına rağmen bazı Avrupa ülkelerinde kullanılması kısıtlanmıştır. Gıdaların yanısıra göz damlaları, topikal ilaçlar, adrenalin, kortikosteroidler, lokal anestezikler gibi ilaçlara, saç kremi, parfümler, yüz temizleyicileri ve saç spreyleri gibi kozmetik ürünlerine de koruyucu, kıvam arttırıcı ve suda çözünebilirlik özelliği kazandırmak amacıyla eklenmektedir (Vally ve Misso, 2012). Bu ürünlerin kişisel kullanımı veya sülfıt içeren gıdaların tüketimi sülfıt maruziyetine sebep olmaktadır. Bunlara ek olarak sülfıtın birçok meslek grubunda yaygın olarak kullanılması mesleki maruziyeti de doğurmaktadır. Her ne kadar gıdalar, kozmetik ürünler ve ilaçlarla alınan sülfıt maruziyetinden az olsa da hava kirliliği sonucu ortaya çıkan sülfür dioksit (SO₂) gazının inhalasyonu da ekzojen sülfıt kaynaklarındanır (Vally ve Misso, 2012).

Sülfıt dışarıdan alınmasının yanı sıra vücutta fizyolojik olarak sülfür içeren aminoasitlerin (sistein, metiyonin) katabolizması ile de üretilmektedir (Şekil 2.1) (Schwarz, 2016).



Şekil 2.1. Endojen Sülfite Sentezi

Metiyonin-sistein metabolizması sonucu açığa çıkan SO_2 dokuda hidrolize olarak suda çözünebilen bisülfiti (HSO_3^-) oluşturmaktadır (Reaksiyon 1). Fizyolojik pH'da daha dominant olmasına rağmen zayıf bir asit olan HSO_3^- reaksiyon 2'de görüldüğü gibi 1 H^+ kaybederek kolayca sülfite (SO_3^{2-}) indirgenmektedir (Mottley ve ark., 1982).

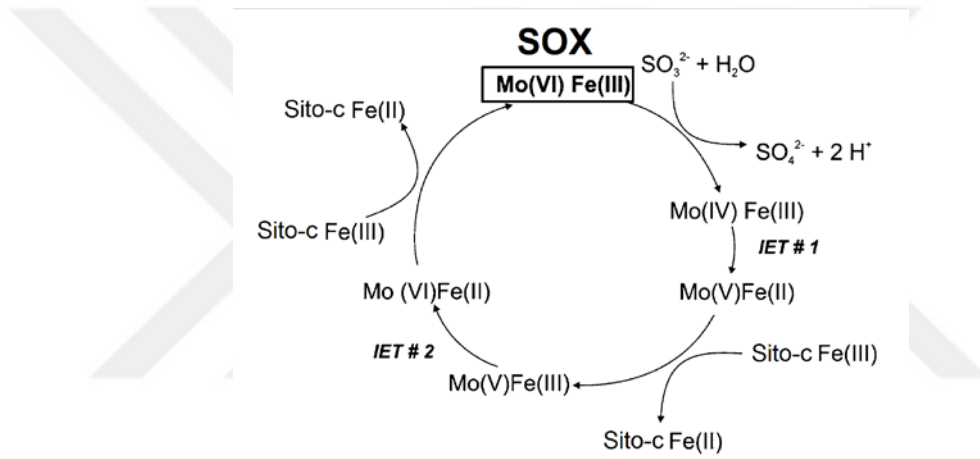


Vücutta birçok formda bulunan ve birbirlerine kolayca dönüşebildiği (Reaksiyon 1 ve Reaksiyon 2) bilinen SO_2 , HSO_3^- ve SO_3^{2-} gibi bileşiklerin tümü sülfite

ajanları olarak isimlendirilmektedir. Bu sülfid ajanlarının biyomoleküller için temel sülfür kaynağı olduğu bilinmektedir (Neta ve Huie, 1985).

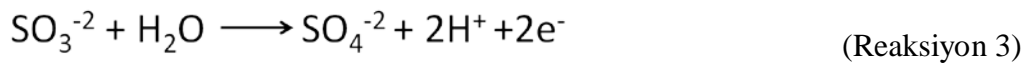
2.1.2. Sülfid Metabolizması

Ekzojen olarak alınan ya da endojen olarak üretilen sülfid, mitokondrinin membranlar arası boşluğunda bulunan SOX enzimi aracılığıyla zararsız bir bileşik olan sülfata (SO_4^{-2}) oksitlenerek metabolize edilmektedir. Sülfid oksidaz karaciğer, kalp, böbrek, dalak, beyin, iskelet kası ve kanda bulunmaktadır (Woo ve ark., 2003). Homodimer yapıda bulunan SOX, hem grubu içeren bir N-terminali ve Molibdenyum (Mo) kofaktörü içeren bir C-terminalinden oluşmaktadır (Moriwaki ve ark., 1997).



Şekil 2.2. SOX'un Reaksiyon Mekanizması

Molibdenyum ve hem grubu iki ayrı redoks merkezi olarak enzim fonksiyonu açısından önemli role sahiptir. Oksidasyon sırasında SOX enziminin Mo merkezine bağlanan SO_3^{-2} , 2 elektron (e^-) ile indirgenmektedir. Bu indirgenme reaksiyonu sonucunda Mo(VI)/Fe(III), Mo(IV)/Fe(III)'e dönüşmektedir. Böylece reaksiyon 3'te de gösterildiği gibi sülfid, idrarla atılan ve toksik olmayan SO_4^{-2} 'ye okside olmaktadır (Bailey ve ark., 2009).



İki e^- ile indirgenen Mo(IV)'deki elektronlardan biri intramoleküler elektron transferi (IET) ile hem redoks merkezine aktarılmakta ve Mo(V)/Fe(II) kompleksi açığa çıkmaktadır. Bu bileşikteki kararlı olmayan e^- 'nin solunum zincirinde rol

alan sitokrom c (sito-c)'yi indirgemesiyle Mo(V)/Fe(III), devamında ikinci IET reaksiyonu ile Mo(VI)/Fe(II) kompleksi oluşmaktadır. Kararlı olmayan Mo(VI)/Fe(II) sito-c tarafından indirgenerek Mo(VI)/Fe(III)'e dönüşmektedir. Böylece SOX enziminin yapısında bulunan redoks merkezlerinin katalitik aktifliği yeniden kazanılmış olmaktadır (Şekil 2.2) (Bailey ve ark., 2009).

Bu döngüde bir mol sülfitin oksidasyonu sırasında indirgenen her sito-c, elektronlarını elektron taşıma zincirine aktararak, oksidatif fosforilasyonda 1 mol adozin trifosfat (ATP) üretilmesini sağlamaktadır.

Fizyolojik olarak sülfitin, SOX ile metabolizmasının hızlı olduğu bilinmektedir. Bu nedenle, kronik maruziyetlerde serumda 15 µM konsantrasyona kadar sülfid gözlenebilirken (Kencebay ve ark., 2013), tamamen metabolize edildiği için dokularda birikmediği rapor edilmiştir (Kencebay ve ark., 2013; Pundir ve Rawal, 2013).

2.1.3. Sülfitin Yan Etkileri

Sülfid kullanımı genelde kısıtlanmış olsa da, bu kısıtlama ülkeler arasında farklılık gösterebilmektedir. Amerika'da çiğ sebze ve meyveler dahil birçok gıda da kullanılması güvenli kabul edilmiş fakat Avrupa ülkelerinde kullanılması kontrol altında tutularak her gıda için farklı doz belirlenmiştir (EFSA, 2013).

Til ve arkadaşları %0 ila %6 arası sülfid içeren diyetle besledikleri sıçanlarda çarpıcı sonuçlar elde etmişlerdir. %6 sülfid içeren diyetle beslenen grupta, belirgin büyüme geriliği ve azalmış gıda alımı, %4 ve üzeri seviyelerde dalak ağırlığında artış, %2 ve üzeri dozda anemi geliştiği gözlenmiştir. Bununla birlikte vücut ağırlığının 72 mg/kg'sine denk gelen %0.25 dozda sülfitle beslenen grupta herhangi bir olumsuz etki gözlenmemiştir. Bu veriler, SOX enziminin fizyolojik koşullar da %0.25 dozda alınan sülfidi okside edebildiği şeklinde yorumlanmıştır (Til ve ark., 1972). Bu bilgiler ışığında Gıda Katkı Maddeleri birliği FAO/WHO (Food and Agriculture Organization of the United Nations= Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü=FAO) / (World Health Organization = Dünya sağlık örgütü=WHO) Uzman Komitesi (The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives=JECFA), 1974 yılında ADI sülfid dozunu 100 katlık güvenlik faktörü de ekleyerek 0.7 mg/kg/gün olarak belirlemiştir. JECFA'nın gıda katkı

maddelerinin değerlendirilmesiyle ilgili 51. raporunda bu doz tekrar teyit edilmiştir (JECFA, 2000).

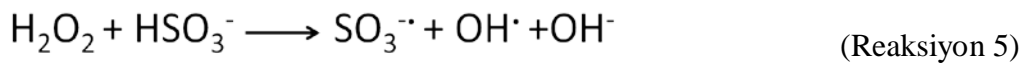
Normal koşullarda günlük üretilen endojen sülfite miktarının, ekzojen olarak alınan sülfite miktardan daha fazla olduğu bilinmektedir (Taylor ve ark., 1986). Sülfite metabolizması sonucu oluşan ve idrarla atılan sülfate miktarı 2400 mg düzeyindedir. Bu miktarın 2300 mg'ı endojen sülfitten kaynaklanmaktadır (Taylor ve ark., 1986). Fakat gıdalardaki sülfite içeriği üzerine yapılan araştırmalar, beslenme alışkanlığına bağlı olarak ADI değerinin aşılabileceğini göstermektedir (Simon, 1986; Lester, 1995). Bunun sonucu olarak özellikle hassas bireylerde anaflaktik reaksiyonlar, dermatit, ürtiker, hipotansiyon, karın ağrısı ve diyare gibi istenmeyen reaksiyonlar görülmektedir (Tutuncu ve ark., 2012). Sülfite bu etkisiyle ilişkili birçok çalışma, farklı olası mekanizmaları önermesine rağmen etki mekanizması hala tam olarak bilinmemektedir.

2.1.4. Sülfite Radikallerinin Oluşumu

Sülfite oksidaz enzimi, endojen sülfite okside edebilecek kapasitede ve aktivitede çalışmaktadır. Fakat alınan sülfite metabolize edilemeyecek miktarda olması veya SOX aktivitesinin düşük olması sülfite farklı yollarla metabolize edilmesini gerektirmektedir. Fridovich ve Handler, horseradish peroksidaz (HRP) gibi bazı peroksidazların, sülfite oksidasyonunu başlattığını göstermişlerdir (Fridovich ve Handler, 1961). Başlayan sülfite oksidasyonu ve sonraki zincir reaksiyonların da, biyolojik moleküller ile reaksiyona girebilen reaktif ara ürünler oluştuğu bilinmektedir (Fridovich ve Handler, 1961).



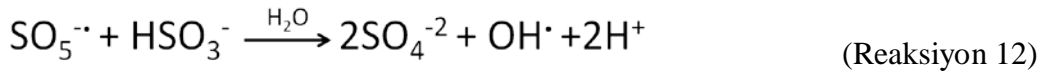
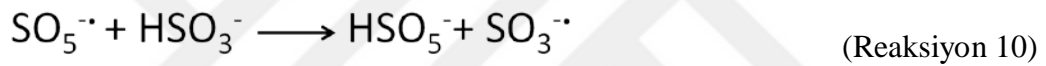
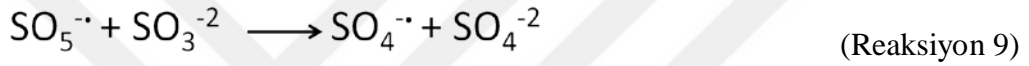
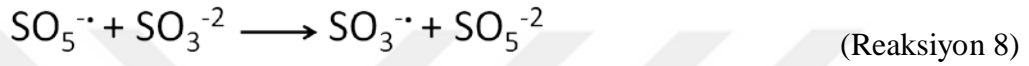
Fizyolojik koşullarda SO_3^{-2} ve hidrojen peroksit (H_2O_2), HRP kataliziyle sülfite trioksit radikaline ($\text{SO}_3^{\cdot-}$) dönüşmektedir (Reaksiyon 4) (Mottley ve Mason, 1988).



Fakat H_2O_2 konsantrasyonunun ortamda artması, bisülfite H_2O_2 ile non-enzimatik reaksiyonu ile sonuçlanmaktadır (Reaksiyon 5) (Mottley ve ark., 1982).



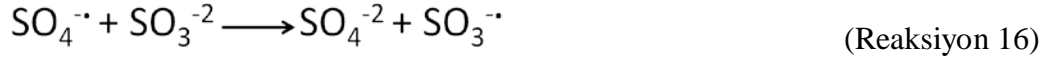
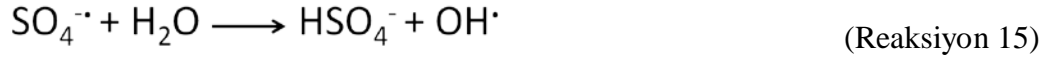
Sülfür trioksit radikali, oksijen (O₂) varlığında iki reaksiyon ile metabolize edilerek süperoksit radikali (O₂^{·-}) ve peroksisülfat (SO₅^{·-}) radikallerinin açığa çıkmasına neden olmaktadır (Reaksiyon 6-7). Bu reaksiyonlar reaktif SO₃^{·-} 'den daha reaktif ürünler meydana getirdiği için sülfid radikalleri oluşumunda kritik bir basamaktır (Mottley ve Mason, 1988).



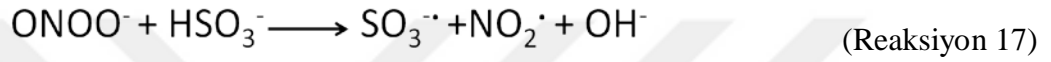
Oluşan SO₅^{·-}, sülfid (Reaksiyon 8-9) ve bisülfiti (Reaksiyon 10-11) okside ederek SO₃^{·-} ve sülfat radikal (SO₄^{·-})'lerine dönüşmektedir. Sulu ortamlarda ise bisülfid ile birleşerek hidroksil radikali (OH[·]) oluşmaktadır.



SO₅^{·-}, SO₃⁻²'yi direkt okside edebilmesinin yanı sıra alanin, tirozin, glisin ve askorbik asit gibi biyomolekülleri de substrat olarak kullanıp sülfid oksidasyonuna neden olabilmektedir. Substrat olarak kullanılan biyomoleküller kararsız bir radikale (X^{·+}) dönüştürülerek (Reaksiyon 13) SO₃⁻²'yi okside etmekte ve SO₃^{·-} açığa çıkmasına sebep olmaktadır (Steele ve Appelman, 1982).



Reaksiyon 9 ve 11 'de sentezlenen $\text{SO}_4^{\cdot-}$ 'nin diğer radikaller gibi hidrojen ayrışması ya da çift bağ oluşmasına neden olarak bazı aminoasitleri okside edebildiği bilinmektedir. Bu özelliklerinden dolayı lipid peroksidasyonda ve membran hasarında rol aldığı düşünülmektedir. Özellikle sulu ortamlarda OH^\cdot oluşumuna katkı sağladığı fakat kinetikleri incelendiğinde $\text{SO}_3^{\cdot-}$ oluşturmayı tercih ettiği görülmektedir (Reaksiyon 15-16)(Mottley ve Mason, 1988).



Reaktif ürünlerin oluşumuyla hücre hasara aracılık eden SO_3^{-2} 'nin peroksinitrit (ONOO^-) ile reaksiyonu, nitrooksidatif strese de önemli rolü olduğunu göstermektedir (Reaksiyon 17) (Karoui ve ark., 1996).

Bu reaksiyon yolları fizyolojik ortam pH'sı, reaksiyona giren molekül konsantrasyonları, reaksiyon hızları ve kinetikleri ile ilişkili olarak değişmektedir. Fakat görüldüğü üzere aşırı sülfid maruziyetinde radikal oluşumu ve hücre hasarı kaçınılmazdır.

2.1.5. Sülfid Aracılığıyla Oluşan Radikallerin Biyomoleküllere Etkisi

Sülfid mekanizması ve reaksiyonları, açığa çıkan ürünler göz önüne alındığında etkin çalışılması gereken son derece önemli bir konudur. Nitekim yapılan çalışmalarda, sülfid reaksiyonları sonucu ortaya çıkan reaktif ürünlerin lipid, protein ve deoksiribonükleik asit (DNA) gibi biyomoleküllere olumsuz etkileri gösterilmiştir (Harman, 1956).

Sülfid radikaller, DNA'da 2'-deoksiriboz ile reaksiyona girerek ya da çift bağları kırarak disfonksiyonel DNA fraksiyonlarına neden olmaktadır. DNA radikalleri de denilen bu fraksiyonların DNA delesyonlarına ve mutasyona bağlı olarak kanserojenik etkileri olabileceği düşünülmektedir (Hayatsu ve Miller, 1972; Dizdaroglu ve Jaruga, 2012).



Sülfitin proteinlerdeki disülfit bağlarıyla (RS-SH) da reaksiyona girdiği gösterilmiştir. Sülfitoliziz adı verilen bu reaksiyonda sülfit, proteinlerin yapısında bulunan disülfit bağlarını (RS-SR) kırarak S-sülfonat (RSSO₃⁻) ve tiyollerin (RSH) açığa çıkmasına neden olmaktadır (Reaksiyon 18) (Neta ve Huie, 1985). Proteinlerin yapısında çok sayıda disülfit bağı olduğu ve bu bağların proteinin üçüncül yapısının oluşumunda rol aldığı bilinmektedir. Aşırı sülfit maruziyeti sonucu bu bağların tümünün kırılması, protein disfonksiyonu ve hücresel hasarı beraberinde getirmektedir (Menzel ve ark., 1986).



Aynı zamanda reaksiyonda meydana gelen RSSO₃⁻'nin indirgenmesiyle SO₃⁻ radikali oluşmaktadır. Oldukça reaktif olan SO₃⁻, sülfit aracılı oluşan zincir reaksiyonlarına neden olarak hücresel hasarı arttırmaktadır (Neta ve Huie, 1985). Lipidler organizmada radikallerden en çok etkilenen biyomoleküllerdir. Doymamış yağ asitlerinin (LH) yapısındaki metilen grupları arasında birçok çift bağ bulunmaktadır. Zayıf çift bağlar, sülfit radikalleri tarafından kolayca kırılarak 1 H⁺ koparılmaktadır. Bu reaksiyon ile oluşan kararsız lipid serbest radikali (L[•]), O₂ ile birleşerek lipid peroksit radikaline (LOO[•]) dönüşmektedir. Peroksit radikali, diğer membran lipidlerini (LH) etkileyerek lipid hidroperoksit (LOOH) ve (L[•])'yi oluşturmaktadır. Bu basamak yeni lipid radikallerinin oluşmasına aracılık ettiği için lipid peroksidasyon yayılmasında oldukça önemli bir role sahiptir. Lipid hidroperoksitler yıkılarak oksil radikali (LO[•]) ve peroksil radikalleri (LOO[•]) açığa çıkarmaktadır. Oluşan radikallerin lipidlerle etkileşimi sonucu malondialdehid (MDA) ve 4-hidroksi-2-nonenal (4-HNE) gibi ikincil ürünler oluştuğu gözlenmektedir (Gutteridge ve Halliwell, 1990). Aşırı maruziyet sonucu oluşan sülfit radikallerinin lipidlerle etkileşimi, geri dönüşümsüz olarak lipid peroksidasyon zincir reaksiyonlarını başlatmakta ve membran bütünlüğünün bozulmasına neden olmaktadır (Gutteridge ve Halliwell, 1990)

2.1.6. Sülfıt Toksısıtesı

Sülfıt bıleşıklerı, gıda katkı maddelerı içerisinde çok yönlü ve sık kullanılan bır kategorıyı oluşturmaktadır. Literatürde yayımlanan vakalarda yüksek doz sülfıt maruzıyetının alerjik reaksiyonlar, bronkokonstrüksıyon, bradıkardı ve hipertansıyon gibi etkılerı gözlenmektedir. Aynı zamanda akciğer, dalak, böbrek, kalp ve beyın gibi birçok organa hasar verdığı bilinmektedir (Cohen ve ark., 1973). Buradan yola çıkarak sülfıt ile ilgili hayvan çalışmaları oldukça büyük önem teşkil etmektedir. Sülfıt radikallerının sitozin ve urasil gibi nükleik asıtlere zarar verdığı; beyın, akciğer, kalp, dalak, böbrek, kemik iliği gibi birçok organda DNA hasarına ve mutasyona sebep olduğu rapor edilmiştir (Gunnison ve ark., 1981; Meng ve ark., 2003). Bununla birlikte sülfıtın vitaminler ve amino asıtlere reaksiyona girerek toksik etkilere sebep olduğu gösterilmiştir (Huie ve Neta, 1985). Ekibimiz tarafından yapılan çalışmada sülfıtın beyın dokusunda lipid peroksidasyon ve apoptotik nörodejenerasyona bağlı somatosensöriyel uyarılma potansiyelleri latenslerini olumsuz etkilediği tespit edilmiştir (Kencebay ve ark., 2013). Ayrıca yapılan bır çalışmada sülfıtın hipokampus piramidal nöronlarında hasara neden olduğu gösterilmektedir (Akdogan ve ark., 2011). Sülfıtın öğrenme üzerine bu etkilerinin nörodejenerasyona bağlı hipokampus akımlarının değişmesi ile ilişkili olabileceği savunulmaktadır (Meng ve ark., 2002; Ozsoy ve ark., 2012).

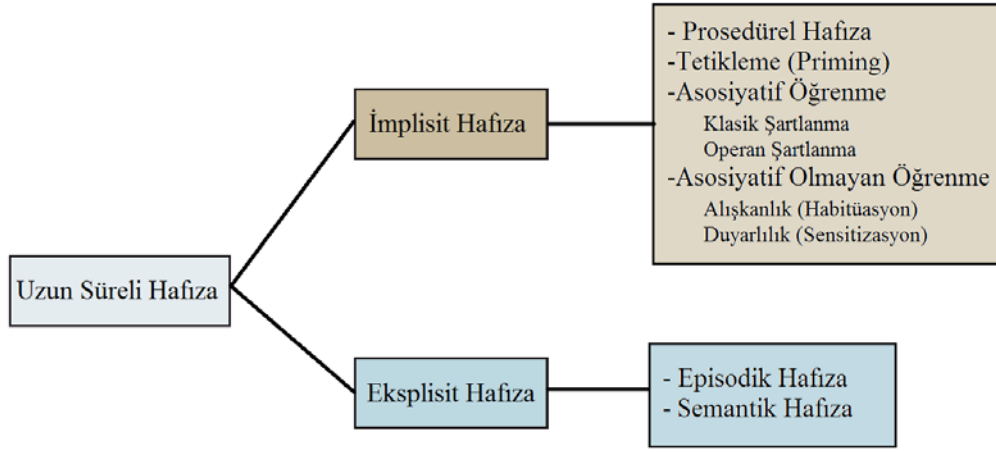
2. 2. Öğrenme ve Hafıza

Öğrenme çevre ile ilgili bilgi edinilmesi ve bu bilgilerin davranışlar üzerine gösterdiği değişiklikleri kapsayan bır süreçtir. Hafıza ise yaşananları, öğrenilen konuları, bunların geçmişle ilişkisini bilinçli olarak zihinde saklama yeteneği olarak tanımlanmakta ve öğrenmenin nöral ağlarda kalan bır izi olarak gösterilmektedir (Kandel, 2013).

2.2.1. Hafızanın Sınıflandırılması

Hafıza kalıcılık süresine göre duyuşal, kısa süreli ve uzun süreli hafıza olmak üzere üçe ayrılmaktadır. Duyuşal hafıza, ışık ve ses gibi duyuşal uyarıların bilgisini 200-500 ms arası depolayabilen hafıza türüdür. Bilinçli ve dikkat gerektirmeyen duyuşal hafıza da bilgi yorum katılmadan algılandığı gibi saklanmaktadır. Kısa süreli hafıza, bilginin birkaç saniye veya birkaç dakika süre arasında tutulabildiği ve limitli kapasiteye sahip olan hafıza türüdür. Bilgi bu

hafızada tutulduğu süre içinde geri çağırılabilir. Bu nedenle çalışan hafıza (=working memory) olarak da adlandırılmaktadır. Kısa süreli hafızada nöron grupları arasında oluşan uyarı trafiğinde kimyasal değişiklikler rol oynamaktadır. (Hall, 2016). Uzun süreli hafıza ise, limitsiz kapasiteye sahiptir ve bilgiyi aylar hatta yıllar boyunca saklayabilmektedir. Bu hafızada, kısa süreli hafızada görülen, sinapslardaki kimyasal değişikliklerin yanı sıra kalıcı, yapısal ve fonksiyonel değişikliklerde gözlenmektedir. Bilginin nöral ağlara işlenmesinde ve ömür boyu saklanmasında bu değişikliklerin rol aldığı bilinmektedir. Uzun süreli hafıza, implisit (deklaratif olmayan) ve eksplisit (deklaratif) olmak üzere ikiye ayrılmaktadır (Şekil 2.3) (Kandel, 2013).



Şekil 2.3. Uzun Süreli Hafıza Türleri (Kandel, 2013)

İmplit (Deklaratif Olmayan) Hafıza:

Motor beceri ve alışkanlıkların edinilmesinde rol alan hafıza türüdür. İmplit hafızada bisiklete binmek ya da araba kullanmak gibi daha önce edinilen bilgiler düşünmeden (bilinçli yorum katılmadan) otomatik olarak çağırılmaktadır. Bu hafıza türü literatürde bilinçsiz ya da otomatik hafıza olarak da adlandırılmaktadır. Prosedürel, tetikleme, asosiyatif ve asosiyatif olmayan olmak üzere dört alt tipi bulunmaktadır.

Prosedürel hafıza, düşünmek zorunda olmadan yapılan günlük aktiviteleri gerçekleştirmeye olanak sağlamaktadır. İmplit hafızada depolanan hatıraların büyük çoğunluğunu prosedürel hafıza hatıraları oluşturmaktadır. İmplit hafızanın en iyi bilinen alttipi olan prosedürel hafıza yeni motor becerilerin

öğrenilmesinde ve sonra yavaş yavaş geliştirilmesinde rol almaktadır (Kandel, 2013). Ayakkabı bağlamak prosedürel hafızaya iyi bir örnektir. Karşılaşılan bir uyarının geçmişteki deneyimlere dayanarak bir cevabın ortaya çıkışına etki etmesine ise tetikleme (priming) denilmektedir. Beyinde sık kullanılan deneyimlerin oluşturduğu nöral yollar daha ön planda bulunmaktadır. Tetikleme bu temele dayanmakta ve hatırlama sırasında belirli kavramları bilinçsiz olarak harekete geçirerek cevap oluşturmaktadır. Bu nedenle uyarana karşı verilen yanıt en sık karşılaştığımız uyarın cevabı olmaktadır. Örneğin, ilk harfleri ipucu olarak söylenen bir kelimenin cevabı için ilk akla gelen en sık duyduğumuz kelimedir (Bartsch ve Butler, 2013). Assosiyatif öğrenme; uyarının diğer bir uyarın ile olan ilişkisinin öğrenildiği hafıza türüdür. Hayvan iki uyarın arasındaki ya da uyarın ve davranış arasındaki ilişkiyi öğrenir. Klasik şartlanma ve operan (edimsel) şartlanma olarak iki grupta incelenmektedir. Klasik şartlanma, başlangıçta herhangi bir uyarı oluşturmeyen veya çok hafif bir uyarı oluşturan koşullu uyarın ile tek başına uygulandığında her seferinde aynı yanıtı oluşturan koşulsuz uyarının eşleştirilmesiyle ortaya çıkan refleks yanıtıdır. Koşullu ve koşulsuz uyarın art arda yeterli sayıda uygulandıktan sonra koşulsuz uyarına verilen yanıt, koşullu uyarın için ortaya çıkmaktadır. Örneğin, köpek için herhangi bir uyarı oluşturmeyen zil sesi (koşullu uyarın) ile, köpekte salya salgılanmasına neden olan etin (koşulsuz uyarın) birlikte art arda verilmesi, köpeğin ete karşı göstermiş olduğu salya salgılanması tepkisinin zil sesine vermesini sağlamaktadır. Operant şartlanma ise, bir uyarı ve davranış arasındaki öngörülü ilişkisinin öğrenilmesidir. Bu ilişki davranışın sonunda ortaya çıkan sonuçlar tarafından kontrol edilmektedir. Eğer davranışın sonucu olumlu ise davranış devam ettirilir, olumsuz ise davranış ortadan kalkar. Hayvanın kafesinde bulunan pedala basmasıyla yem kapağının açılması, sonucu olumlu bir davranış olarak operant şartlanmaya iyi bir örnektir. Aynı uyarıya verilen tepkinin zamanla değişiminin öğrenilmesi asosiyatif olmayan öğrenmedir. Alışkanlık (habitüasyon) ve duyarlılık (sensitizasyon) olarak ikiye ayrılmaktadır. Alışkanlık, zararsız bir uyarına verilen tepkinin, uyarınla her karşılaştığında azalması ve bir süre sonra ortadan kalkmasıdır. Duyarlılık, zararlı ve şiddetli bir uyarına karşı giderek daha duyarlı hale gelip, gösterilen tepkinin şiddetlenmesidir. Sıçanın canını acıtacak bir uygulamadan sonra

(çimdikten) gelen hafif bir dokunmanın aşırı tepkiye neden olması sensitizasyona iyi bir örnektir (Kandel, 2013).

Özet olarak bilinçli farkındalığımızın dışında depolanan ve kullanılan her bilgi implisit hafıza türünün bir alt tipi kapsamında depolanmaktadır (Bartsch ve Butler, 2013).

Eksplisit (Dekleratif) Hafıza:

Yaşanılan olayları ve gerçekleri bilinçli olarak hatırlamayı sağlayan eksplisit hafıza olaylarla ilişkili yer, zaman ve duyguların bilgisini içermektedir. Hatıraları birbirine bağlayan, ilişkisel bir bellek olan eksplisit hafızaya bilinçli hatırlama ve düşünce gerektirdiği için deklaratif hafıza da denilmektedir. Episodik ve semantik olmak üzere iki alttipi bulunmaktadır. Episodik hafıza, kişisel deneyimlerimizin kaydedildiği hafıza türüdür. Neyi, nerede, kiminle yaptığımızla ilgili anılarımızı depolayarak hayatımızın veya olayların belli bölümlerini (episode) kaydetmektedir (Kandel, 2013). Bir diğer eksplisit hafıza türü de semantik hafızadır. Ne zaman ve nerede öğrendiğimizi bilmediğimiz “İstanbul, Türkiye’de bir şehirdir.” gibi genel bilgilerin kaydedildiği hafıza türüdür. Semantik hafıza, kazanıldığı mekan ve zaman bağlamından bağımsız olarak depolanmaktadır (Kandel, 2013).

Uzaysal Hafıza

Yer ve zaman çerçevesinde bilgi depoladığı için episodik hafızanın alt tipi olarak sınıflandırılmasına rağmen kısa süreli ve uzun süreli hafıza özelliklerini göstermektedir Uzaysal hafızanın bu özelliklerini değerlendiren paradigmalarda uzaysal çalışan ve referans hafıza birer parametre olarak incelenmektedir (Bannerman, 2014).

Uzaysal çalışan hafıza, kısa süre için (tur-spesifik) uzaysal bilgileri akılda tutma yeteneğidir. Bu hafıza türünde depolanan bilgiler her bir tur (=trial) için geçici olarak akılda tutulmakta ve böylece kısa süreli hafıza hakkında bilgi edinilmesi sağlanmaktadır. Örneğin, hayvanın etkin bir yem arama stratejisi benimsemesi için uzaysal ipuçlarından yararlanarak kendinin nerede olduğunu hatırlaması gerekmektedir. Bu yem arama ve araştırma davranışının temelini oluşturmaktadır (Squire ve ark., 2015).

Uzaysal referans hafıza, uzaysal konum bilgisinin uzun süreli olarak akılda tutulabilme yeteneğidir. Hayvanın kendi yuvasının yerini uzaysal ipuçları kullanarak öğrenmesi bir uzaysal hafıza örneğidir. Hayvanlar üzerinde yapılan deneylerde her turda ödülün yerinin akılda tutulması deney sonunda uzun süreli hafızayı gösteren bir parametre olarak değerlendirilmektedir (Bannerman ve ark., 2014).

Hafıza oluşumu kodlama (yeni bilgilerin edinilmesi), pekiştirme (konsolidasyon), depolama (bilginin korunması) ve geri çağırma (bilginin hatırlanması) olarak ardışık dört süreci kapsamaktadır. Yeni hatıraların oluşumunda önemli adımlardan biri olan kodlama bilgilerin hafızaya kaydedilerek işleme sürecidir. Pekiştirme, kodlanan ve anlamsallaştırılan bilginin sağlamlaştırılması aşamasıdır. Kodlama ve pekiştirme sürecinden sonra yeni edinilen bilgilerin hafızaya yerleştirme süreci depolama olarak tanımlanmaktadır. Hafıza oluşumunun son aşaması olan geri çağırma ise edinilen bilginin kullanılmak üzere hatırlanmasıdır. Uzaysal hafızanın oluşması da bu ardışık süreçleri gerektirmektedir (Takehara-Nishiuchi, 2014).

O'Keefe ve Nadel'in bilişsel harita teorisinde (O'Keefe's and Nadel cognitive map theory) uzaysal hafızanın hipokampus ile ilişkili olduğu vurgulanmaktadır (O'Keefe ve Nadel, 1978). Nitekim hipokampal lezyon oluşturulan sıçanlarda uzaysal referans ve çalışan hafızanın her ikisinin de bozulduğu gösterilmiştir (Ward ve ark., 1999). Yapılan bir nörotöksite çalışmasında hipokampal nörodejenerasyon nedeniyle uzaysal hafızayı değerlendiren parametrelerin olumsuz etkilendiği rapor edilmiştir (Noorafshan ve ark., 2013).

2.2.2. Hipokampus

Limbik sistemin bir parçası olan hipokampusun hafıza ve uzaysal navigasyon ile ilişkili beyin bölgesi olduğu bilinmektedir. Yapısı itibariyle denizatına benzediği için “hipokampus” (Latince: ἵππος , hippos = at, κᾶμπος , kampos = deniz) adı verilmiştir. Hipokampus kortikal yüzeyin altında medial temporal lobda yer almaktadır. CA1, CA2 ve CA3 olmak üzere üç temel bölümden oluşmaktadır. Hipokampusun histolojik yapısına bakıldığında bu bölümlerin farklı nöronal hücre tiplerinin tabakalaşması sonucu olduğu görülmektedir. Birbirleriyle bağlantılı olmasına rağmen bu yapılara gelen uyarılar farklı afferent yollar ile taşınmaktadır (Amaral D, 2006).

Hipokampusun Uzaysal Hafıza ve Yön Bulmadaki Rolü

1970'lerde, O'Keefe ve arkadaşları tarafından hayvanlar üzerinde yapılan çalışmada uzaysal hafıza bilgilerinin kullanılması sırasında bazı hipokampal piramidal nöronlarda senkronize bir aktive olduğu keşfedilmiş ve bu hücrelere "yer hücreleri" adı verilmiştir (O'Keefe ve Dostrovsky, 1971). Hipokampusta entorinal korteks, CA3 ve CA1 bölgelerinde bulunan glutamaterjik yer hücrelerinin keşfi, hipokampal devrenin uzaysal hafıza oluşumu sürecinde önemli role sahip olduğu teorisinin temelini oluşturmaktadır (O'Keefe and Nadal 1978). Bununla birlikte uzaysal öğrenmede, farklı beyin bölgelerinin hipokampus ile koordineli çalıştığı gösterilmiştir (Moser ve Moser, 2014). Görsel, koku ve somato-duyusal kortekse gelen bilgiler temporal lob içinde, hipokampusa bitişik bulunan ve hipokampal formasyonu çevreleyen perirhinal kortekse, oradan da entorhinal kortekse iletilmektedir. Buradan çıkan aksonlar perforant yolak aracılığıyla dentat gyrusun granül hücrelerine ve CA3 piramidal hücrelerine projekte olmaktadır (Amaral D, 2006). Öğrenmenin temeli olarak düşünülen uzun süreli güçlenme (Long term potentiation=LTP) ilk olarak bu yolakta gösterilmiştir. Dentat gyrusdan çıkarak CA3 piramidal nöronlarına giden mossy fiberleri iletimi sağlayan birçok transmitter salınım bölgesine sahiptir. CA3'den kalkan schaffer kolleteralleri CA1 piramidal hücrelerine projekte olurken, yine bu bölgeden çıkan asosiyasyonel komissural yolak kontralateral hipokampusun CA1 nöronlarına girdi yapmaktadır. Aynı zamanda CA1 nöronları perforant yolaktan da direk girdi olarak uyarıyı subikuluma taşımaktadırlar. Subikulumdan çıkan nöronlar tekrar entorhinal kortekse uzanmakta ve hipokampal devre tamamlanmaktadır (Amaral D, 2006).

2.2.3. Hafızanın Nörokimyasal Mekanizması

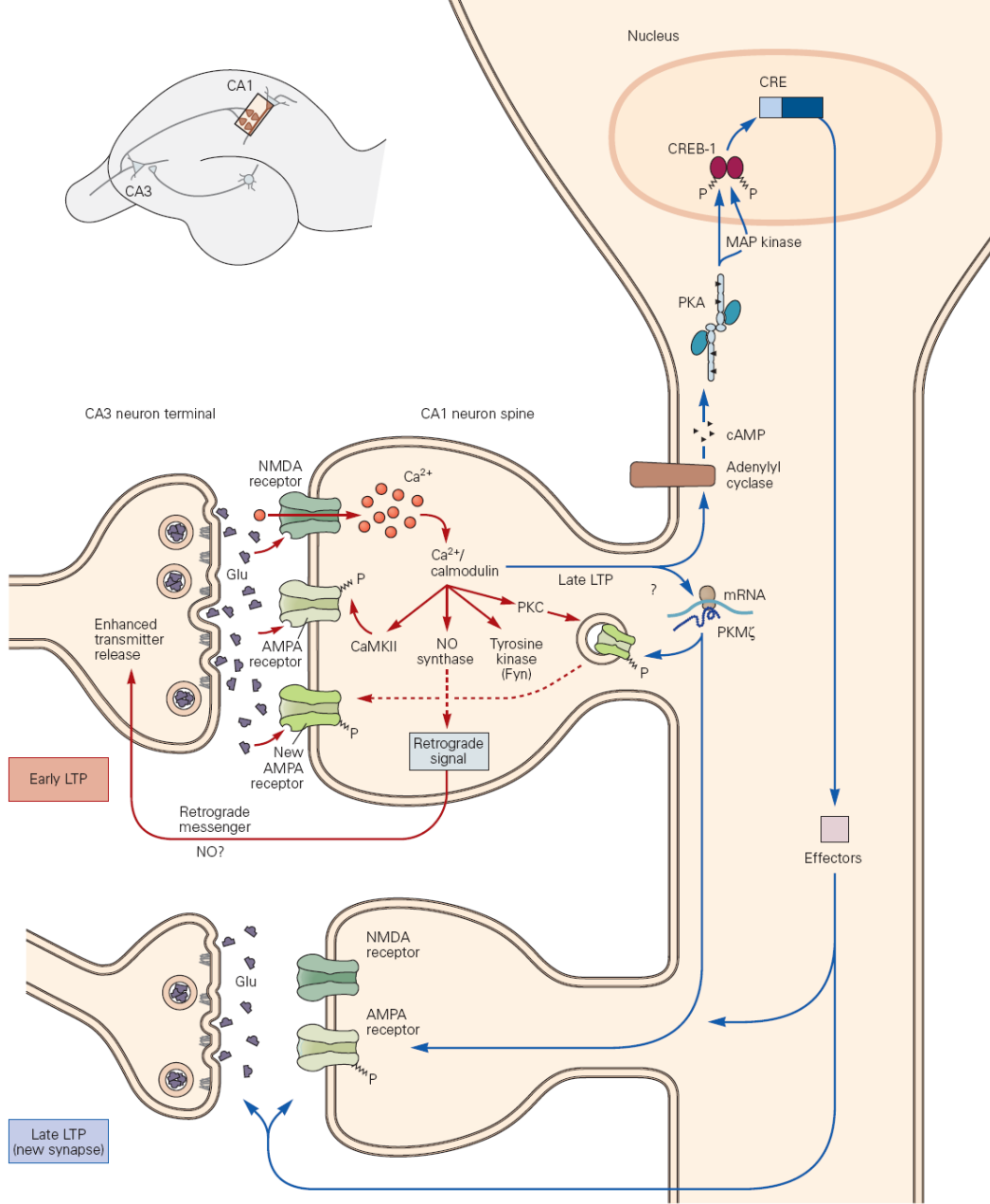
Sinaptik plastisite, öğrenme ve hafızanın altında yatan hücresel mekanizmadır ve postsinaptik alanda meydana gelen biyokimyasal ve yapısal değişiklikleri kapsamaktadır (Sharma ve ark., 2010). 1940'lı yıllarda Donald Hebb tarafından nöronal ağın sürekli aktivitesi sonucu kalıcı hafızanın oluştuğu fikri ortaya atılmıştır (Hebb, 1949). Daha sonra Bliss ve arkadaşları, yüksek frekanslı uyarana cevap olarak dentat gyrusda sinaptik gücün uzun süreli bir artış gösterdiğini gözlemlemişlerdir. Bu hipokampal aktivitenin (sinaptik gelişme) LTP adı verilen mekanizmanın temeli olduğu savunulmuştur (Bliss ve Lomo, 1973).

Uzun süreli güçlenme, hipokampal yollarda (perforant yolak, mossy fiber yolağı ve Schaffer kollateral yolağı) meydana gelen yüksek frekanslı uyarılar sonucu oluşan aktivite bağımlı sinaptik plastisitenin bir türüdür ve iki fazdan oluşmaktadır. Bunlardan ilki LTP oluşumunu tetikleyen gen transkripsiyonu ve protein sentezi gerektirmeyen erken faz (uyarıdan sonra <1 saat), diğeri ise indüklenmiş LTP'nin devamlılığını sağlayan transkripsiyon ve protein sentezinin gerçekleştiği (uyarıdan sonra >3 saat) LTP'nin geç fazıdır (Bliss ve Collingridge, 1993).

Presinaptik nörona gelen uyarıyla salınan glutamat, postsinaptik terminallerde bulunan α -amino-3-hidroksi-5-metil-isoksazol-4-propionik asit (AMPA) ve kainik asit (KA) reseptörlerine bağlanmaktadır. Glutamatın bağlanması sodyum (Na^+) iyonlarına geçirgen olan bu reseptörlerin iletkenliğinin artmasına neden olarak postsinaptik nöronda depolarizasyon meydana getirmektedir (Headley ve Grillner, 1990). Postsinaptik nöronda potansiyelin artması N-metil D-aspartat (NMDA) reseptöründeki magnezyum (Mg^{+2}) blokajını kaldırmakta ve NMDA reseptörlerinin aktivasyonu ile hücre içine Na^+ ve kalsiyum (Ca^{+2}) girişi gerçekleşmektedir (Nguyen ve Woo, 2003). Kalsiyum girişiyle aktive olan kalsiyum/kalmodulin kinaz II (Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase=CaMKII) enzimi AMPA reseptörlerini aktive ederek postsinaptik hücrenin Na^+ ve K^+ iletkenliğinin artmasına neden olmaktadır. Aynı zamanda aktive olan CaMKII, nitrik oksit sentaz (NOS) enzimlerini de aktive ederek önemli bir retrograd haberci olan nitrik oksit sentezini indüklemektedir. Bu aşamaya kadar meydana gelen değişiklikler biyokimyasal değişiklikler olup LTP'nin erken fazını oluşturmaktadır (Nguyen ve Woo, 2003).

Postsinaptik nöronda artan Ca^{+2} konsantrasyonu aracılığıyla aktive olan adenilat siklaz (adenylate cyclase=AC) enzimi hücre içi ATP'yi siklik adenosin monofosfata (Cyclic adenosine monophosphate =cAMP) dönüştürmektedir. Artan hücre içi cAMP, protein kinaz C (PKC) aracılı olarak cAMP-duyarlı eleman bağlama proteini (cAMP-responsive element binding protein=CREB) fosforilasyonuna neden olmaktadır. Güçlü bir transkripsiyonel koaktivatör olan CREB hücre çekirdeğinde protein sentezini başlatmaktadır. Böylece yeni reseptörlerin ve sinapsların oluşmasına bağlı artan sinaptik güç, hatıraların uzun

sürekli hafızaya depolanmasına aracılık etmektedir (Eichenbaum, 2001.) Meydana gelen bu yapısal ve fonksiyonel değişiklikler LTP'nin geç fazında gözlenmektedir (Şekil 2.4)



Şekil 2.4. LTP'nin moleküler mekanizması (Kandel, 2013).

Nakazawa ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada NMDA reseptörü delesyonunun uzaysal hafıza bozulmalarına neden olduğu rapor edilmiştir (Nakazawa ve ark., 2003). Aynı zamanda yapılan nörotoksisite çalışmasında

hipokampal dejenerasyona bağlı LTP'nin bozulduğu gösterilmiş olup bu bozulma uzaysal hafıza ile ilişkilendirilmiştir (Amos-Kroohs ve ark., 2017).

Literatürde uzaysal hafıza hakkında bazı bilgiler elde edilmesine rağmen hala cevaplanamamış birçok soru bulunmaktadır. Bu nedenle hipokampal tabanlı uzaysal hafıza bozukluklarını daha iyi anlamak ve mekanizmayı ozmek için uygun deneysel davranış paradigmaları seçmek büyük önem teşkil etmektedir.

2.2.4. ğrenme ve Davranış Paradigmaları

Radyal Kollu Labirent

Olton ve Samuelson tarafından 1976 yılında geliştirilen radyal kollu labirent 8 ya da 12 kollu olup kollar merkez platform etrafına eşit aırlarla dizilmiştir (Olton ve Samuelson, 1976). Bu kolların sonunda kap içinde ödül (yem) bulunmaktadır. Yem kısıtlaması yapılmış hayvanlar merkez platforma bırakılmakta ve labirenti keşfetmelerine izin verilmektedir. Sıçanların her kolu ziyaret etmeyi ve yemleri yemeyi öğrenmesi için günde en az 1 tur uygulanmaktadır. Uzaysal kısa süreli ve uzun süreli hafızanın değerlendirilmesinde kullanılan bu labirentte sadece 3 ya da 4 yemli kol bulunmaktadır. Hayvanların daha önce ziyaret ettikleri kolları tanıyabilmeleri için labirentin çevresine uzaysal ipuçları yerleştirilmektedir (Olton ve Samuelson, 1976). Uygulanan eğitim protokolü ve veri değerlendirilmesinin yoruma açık olmaması bu testin avantajlarındanıdır. Aynı zamanda bu test diğer testlere oranla stresi daha az indüklediği için uzaysal hafıza ile ilişkili çalışmalarda sıkça tercih edilmektedir (Noorafshan ve ark., 2013). Fakat hayvanlar çevresel ipuçlarını kullanmak yerine bir koldan diğer kola sırayla geçerek farklı stratejiler geliştirebilmektedirler. Bu durumda kollara konulan kapılar ile bu davranış engellenerek sıçanlar uzaysal ipuçlarını kullanmaya yönlendirilmektedirler (Dubreuil ve ark., 2003).

T ve Y Labirent

Bu labirentler uzaysal hafızayı değerlendirmek için kullanılan basit bir davranış paradigmasına sahiptirler. T veya Y şekilli olan düzenek yerden yüksek konumlandırılmaktadır. Bu testlerde, bir kol kapatılmakta ve hayvanların labirent kollarında serbestçe gezmelerine izin verilmektedir. Bu şekilde labirente aliştirilan hayvanlar deney protokolünde hep aynı koldan labirente

bırakılmaktadır. Yakın zamanda ziyaret ettiği kolu hatırlamaları beklenen hayvanların uzaysal çalışan hafıza ölçümleri kollara giriş sayısı ve giriş sırası parametreleri ile değerlendirilmektedir. Bu paradigmada uzaysal referans hafızayı değerlendirmek pek mümkün olmamaktadır. Ayrıca iki koldan sadece birinin seçilebilmesi (doğru kolu seçme olasılığını % 50 olması) hayvanın labirentteki görevini yapmasında başka stratejiler geliştirme olasılığını da arttırmaktadır (Gerlai, 1998)

Morris Su Tankı Testi

Morris su tankı testi 1981 yılında radyal kollu labirente alternatif olarak keşfedilmiştir. İçinde opak su bulunan yuvarlak bir su tankından oluşmaktadır (Morris, 1981). Su tankı 4 eşit kadrana ayrılmakta ve bir kadrana platform yerleştirilmektedir. Hayvana uygulanan ilk turlarda gözle görülen platform daha sonra suyun altına gizlenmekte ve çevresel ipuçlarından yararlanılarak platformun bulunması hedeflenmektedir. Belirli sayıda yapılan turlardan sonra hayvanın bu platformu bulma süresi, yüzerken katteği mesafe, yüzme hızı, her kadranda geçirdiği süre ve platformlar arası geçiş sayısı parametre olarak değerlendirilmektedir. Deneyden önce yem ya da su kısıtlaması gerekmemektedir. Aynı zamanda testin su içinde gerçekleşmesi hayvanın çevresel ipuçları yerine aromatik ipuçları kullanma olasılığını ortadan kaldırmaktadır. Fakat doğal yüzme yeteneği olan hayvanlarda bile suda kaçış yönelmesi stres seviyesini arttırmaktadır. Bu stres, parametreleri olumsuz yönde etkileyerek deneysel paradigmayı zorlaştırmaktadır (Holscher, 1999).

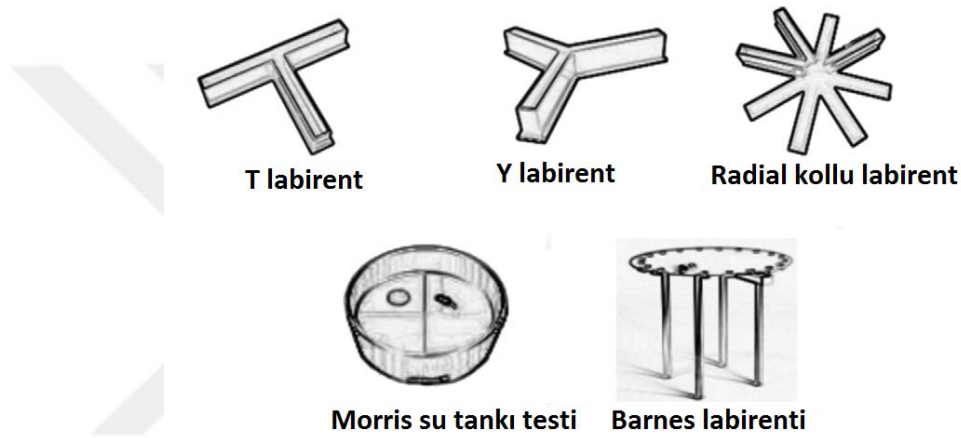
Barnes Labirenti

Yüzme ile indüklenen stresten kaçınmak için, Carol Barnes tarafından geliştirilmiştir (Barnes, 1979). Bu paradigma dairesel beyaz platform etrafına açılan deliklerden oluşmaktadır ve etrafına çevresel ipuçları konulmaktadır. Test sırasında labirentin ortasına bırakılan hayvanın yüzeyden kaçmak için deliklerden birinin altına yerleştirilen kutuya girmesi beklenmektedir. Stres seviyesinin daha az indüklendiği bu paradigma da kemirgenlerin karanlık ve küçük alanlara kaçış içgüdüsünden yararlanılmaktadır. Fakat Barnes labirentte stresin daha az indüklenmesi öğrenmede zorluklar çıkarabilmektedir. Böyle durumlarda itici uyarı olarak hayvanlara şiddetli ses veya ışık uyarısı uygulanmaktadır. Test

sırasında doğru deliği bulma süresi, alınan yol ve girdiği yanlış delik sayısı gibi parametreler değerlendirilmektedir (Ingram ve ark., 1994).

Açık Alan Testi

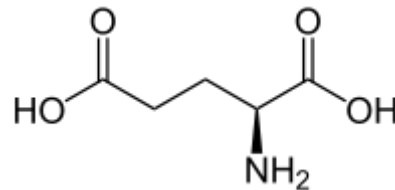
Lokomotor aktivite düzeyi ve anksiyete değerlendirilmesinde kullanılan açık alan testi kemirgenlerde keşfetme ve araştırma içgüdüğü temeline dayanmaktadır. Testte taban alanı birbirine eşit 16 küçük kareye bölünmüş yüksek duvarlı bir düzenek kullanılmaktadır. Hayvan tam ortaya konulmakta ve serbestçe gezmesine izin verilmektedir. Yapılan tur sonunda hayvanın girdiği kare sayısı, katettiği toplam mesafe ve ortalama hız değerlendirilmektedir (Denenberg, 1969).



Şekil 2.5. Öğrenme ve davranış paradigmaları (Sharma, 2010)

2.3. Glutamat

Glutamat, merkezi sinir sisteminde (MSS) en bol bulunan temel uyarıcı (eksitatör) nörotransmitterdir. Eksitatör sinapsların %90'ında bulunmaktadır (Daikhin ve Yudkoff, 2000). Moleküler ağırlığı $147,13 \text{ g.mol}^{-1}$ olan glutamat yapısında bir α -amino ($-\text{NH}_2$), bir α -karboksilik asit ($-\text{COOH}$) ve aminoasite negatiflik veren iki adet karboksilik asit yan zincir gruplarını içermektedir (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. Glutamatın kimyasal yapısı

2.3.1. Glutamat Sentezi

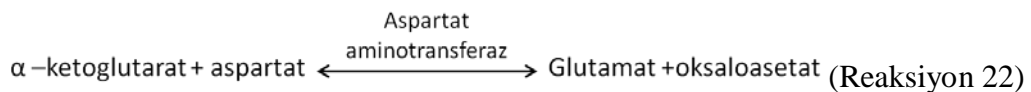
Esansiyel olmayan amino asitlerden biri olan glutamat kan beyin bariyerini geçemediğinden tüm sentezi MSS içerisinde glutamin ve α -ketoglutarat biyomoleküllerinden gerçekleşmektedir.



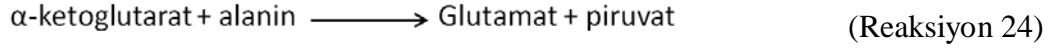
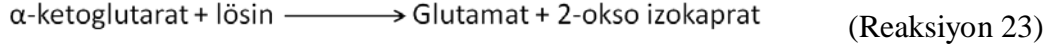
Glutamat, glutamin amino asitinden glutaminaz enzimi aracılığıyla sentezlenmektedir (Hogstad ve ark., 1988) (Reaksiyon 21). Bu reaksiyonun gerçekleşebilmesi için inorganik fosfata ihtiyaç duyulmaktadır. Hem nöronlarda hemde astrositlerde bulunan glutaminaz enziminin nöronal mitokondrilerde daha dominant olması glutamat sentezinin büyük çoğunluğunun nöronlarda olduğunu göstermektedir (Ward ve Bradford, 1979; Kaneko ve ark., 1987). Bununla birlikte nöronal nükleusta da sentezlenen Glutaminaz enziminin transkripsiyonel düzenlenme de rolü olabileceği savunulmaktadır (Olalla ve ark., 2002; Marquez ve ark., 2006; Szeliga ve ark., 2008). Glutaminaz enzimini kodlayan gls1 ve gls2 olmak üzere 2 farklı gen bulunmaktadır. Gls1 geni böbrek-tipi (KGA) , gls2 geni ise karaciğer-tipi (LGA) glutaminaz enzimlerini kodlamaktadır (Aledo ve ark., 2000). Bu enzimlerin dokulardaki ekspresyonları ve kinetik özellikleri farklıdır. Karaciğer-tipi glutaminaz, sıçan ve fare karaciğerinde bol bulunurken, KGA'nın beyin dokusunda bol miktarda eksprese edildiği gösterilmiştir (Marquez ve ark., 2013).

Glutamatın α -ketoglutarattan biyosentezi ise 2 farklı yoldan gerçekleşmektedir. Bunlar;

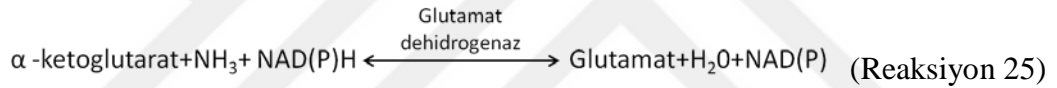
a) Krebs döngüsünde α -ketoglutarattan aspartat-aminotransferaz enzimi aracılığıyla sentezlenmektedir (Reaksiyon 22). Aspartat-aminotransferaz enzimi aspartatın amino grubunu α -ketoglutarata transfer ederek oksaloasetat ve glutamat oluşturmaktadır. Sıçan beyin dokusunda mitokondrial ve sitozolik olmak üzere iki alt tipi bulunan bu enzimin aktivitesinin glutamat dehidrogenaz (GDH) enziminden 10 ila 20 kat daha fazla olduğu rapor edilmiştir (Obaru ve ark., 1988; Erecinska ve Silver, 1990).



b) Aynı zamanda lösin ve alanin gibi dallanmış aminoasitlerin transaminasyonu sonucu 2-okso izokaprat, piruvat ve glutamat sentezlenmektedir (Reaksiyon 23 ve 24). Kan beyin bariyerini hızla geçebilen bu aminoasitler beyinde glutamat yapısında bulunan amin (NH₂) donörü olarak görev yapmaktadır (Daikhin ve Yudkoff, 2000).



Amonyak ve α -ketoglutarat GDH enzimi aracılığıyla birleşerek glutamat oluşturmaktadır. Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADP) veya NADPH'ın kofaktör olarak kullanıldığı bu reaksiyon çift yönlüdür ve glutamat bu reaksiyonla amonyak döngüsünde önemli role sahiptir. Tersinir reaksiyonda ise oksidatif deaminasyon tepkimesiyle glutamat, α -ketoglutarat ve amonyağa dönüştürülmektedir (Zaganas ve Plaitakis, 2002) (Reaksiyon 25).



Glutamat dehidrogenaz karaciğer, böbrek, kalp ve beyin de yüksek oranda bulunmaktadır. Özellikle glutamaterjik nöron terminallerinin mitokondrial matriksinde yoğun şekilde bulunması, glutamat döngüsünde (üretilmesi-bozulmasında) önemli role sahip olduğunu göstermektedir (Anderson ve Swanson, 2000; Spanaki ve Plaitakis, 2012). Beyin dokusunda glutamat dehidrogenaz geni-1 (GLUD1) ile kodlanan GDH1 ve GLUD2 geni ile kodlanan GDH2 enzimi olmak üzere iki üyesi bulunmaktadır (Mavrothalassitis ve ark., 1988; Michaelidis ve ark., 1993; Shashidharan ve ark., 1994; Shashidharan ve ark., 1997). Bu iki enzim yüksek oranda homolog olmasına rağmen (%97 aminoasit benzerliği), düzenleyici özellikleri nedeniyle birbirlerinden ayrılmaktadırlar (Shashidharan ve ark., 1997). Hücrede enerji düzeyleri düşük olduğunda glutamat dehidrogenaz enzimi ile amino asit yıkımı katalizlenmektedir. Bu reaksiyonda amino asitlerden elde edilen karbon iskeletleri enerji elde edilmesinde kullanılmaktadır. Glutamat dehidrogenazın aracılık ettiği reaksiyonun çift yönlü gerçekleşmesi, GDH'nin nöral iletim, hücresel metabolizma ve enerji

homostasizinde önemli rolü olduğunu göstermektedir (Zaganas ve Plaitakis, 2002).

Nöron terminallerinde sentezlenen glutamat presinaptik hücreye gelen bir uyarıya hücre sel cevap oluşturmak üzere VGLUT aracılığıyla veziküllerde depolanmaktadır. Nöronlara spesifik olan bu taşıyıcılar, glutamaterjik sistem homeostazisinin regülasyonunda rol almaktadır. Veziküler glutamat taşıyıcılar, 3 farklı homolog proteinden oluşur ve VGLUT1, VGLUT2, VGLUT3 olarak adlandırılırlar. VGLUT1, neokorteks, enthorinal korteks ve hipokampusta bol miktarda sentezlenmektedir (Fremeau ve ark., 2004). VGLUT1'in sinaptik aralıktaki glutamat konsantrasyonunu etkileyerek öğrenme ve hafızada rol aldığı bilinmektedir. Cheng ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada hipokampal dokuda bilişsel (öğrenme ve hafıza) yetenek ile VGLUT1 protein ekspresyonunun pozitif korelasyona sahip olduğu gösterilmiştir (Cheng ve ark., 2011). Bir başka çalışmada AH olan farelerde hipokampus VGLUT1 düzeyinin azaldığı, bu azalmanın öğrenme ve hafıza bozukluğu ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Liraz ve ark., 2013). Bu taşıyıcının diğer alt tiplerinden VGLUT2 olfaktor bulb, serebral korteks, talamus, hipotalamus ve serebellum da bulunmaktadır (Hisano ve ark., 2002). VGLUT3'ün ise neokorteks, olfaktor bulb, hipotalamus ve substantia nigra da eksprese edildiği gösterilmiştir. VGLUT1 ve VGLUT2 sadece glutamaterjik nöronların presinaptik bölgelerinde bulunurken, VGLUT3'ün non-glutamaterjik nöronlar olarak da bilinen GABAerjik, kolinerjik ve serotonerjik nöronların hem presinaptik hemde postsinaptik bölgelerinde bulunduğu rapor edilmiştir (Fremeau ve ark., 2002; Schafer ve ark., 2002; Fremeau ve ark., 2004; Herzog ve ark., 2004).

2.3.2. Glutamat Salınması

Presinaptik membrana gelen bir uyarı membran potansiyelinde değişime neden olarak voltaj bağımlı Ca^{+2} kanallarının açılmasını tetiklemektedir. Presinaptik nöronda artan hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonu, glutamat depolanmış veziküllerin ekzositozisi ile sinaptik aralığa dökülmesine neden olmaktadır. Glutamat salınımının, veziküler salınımın dışında non-ekzositotik olarak da gerçekleşebildiği bilinmektedir. Jabaudon ve arkadaşları ekzositozisin inhibe edilmesine rağmen, glutamat salınımının non-veziküler olarak gerçekleşebildiğini

göstermiştir (Jabaudon ve ark., 1999). Bu salınımında birçok farklı dokuda da bulunan sistin-glutamat değiş-tokuşcu proteinlerinin (X_c^-) rol aldığı düşünölmektedir. Sistin-glutamat değiş-tokuşcusu bir sistini hücre içine, bir glutamata hücre dışına taşımaktadır (Bannai, 1986; Ohtsuka ve ark., 1988; Miura ve ark., 1992). Nitekim sıçanlar üzerinde yapılan bir çalışmada X_c^- 'nin inhibisyonunun ekstraselöler glutamat düzeyini azalttığı rapor edilmiştir (Lutgen ve ark., 2014).

2.3.3. Glutamatın Geri Alımı

Uyarıcı bir nörotransmitter olan glutamatın beyinde birçok süreçte rol alması ve yaygın bulunması hızlı döngüsünü gerektirmektedir. Bu nedenle glutamatın sürekli salınması kadar geri alınması da bir o kadar önem taşımaktadır. Glutamat sinyal iletimindeki etkisini hücrelerin yüzeyinde bulunan glutamat reseptörleri üzerinden göstermektedir. Ekstraselöler glutamat konsantrasyonunun fazla miktarda bulunması reseptörlerin aşırı aktivasyonu ile nöronların fazla uyarılmasına, hücre içi Ca^{+2} 'nin artmasına ve nörotoksisiteye neden olmaktadır (Danbolt, 2001). Ekstraselöler glutamata metabolize edecek herhangi bir enzim bulunmamaktadır. Bu nedenle glutamatın ekstraselöler alanda düşük konsantrasyonda tutulabilmesinin tek yolu, çevredeki reseptörleriyle etkileşime girip aşırı aktivasyona neden olmadan önce, nöron ve astrositlerce geri alınmasıdır. Glutamatın geri alımı glutamat taşıyıcı proteinler yoluyla gerçekleşmektedir (Balcar ve Johnston, 1972; Logan ve Snyder, 1972; Danbolt, 2001).

Eksitatör Amino Asit Taşıyıcı (EAAT)

Eksitatör amino asit taşıyıcılar sinaptik aralıktaki glutamatın uyarıcı etkisini sonlandırarak glutamat konsantrasyonunu düzenlemek amacıyla geri alıma aracılık etmektedirler. EAAT'ların ekspresyonunda ya da aktivitesinde meydana gelen bir azalma sinaptik aralıkta glutamat birikmesine neden olmaktadır. Ekstraselöler alanda artan glutamat konsantrasyonu, glutamat reseptörlerinin aşırı aktivitesi sonucu hücreyi ölüme götürmektedir (Palmada ve Centelles, 1998). Aşırı glutamat birikimi birçok santral sinir sistemi hastalıkları, nöronal ölüm ve kognitif disfonksiyon ile sonuçlanmaktadır (Danbolt, 2001).

Geri alınımında görev alan glutamat taşıyıcıları yapıları, dağılımları ve farmakolojik özellikleri bakımından EAAT1 (Tanaka, 1993), EAAT2 (Pines ve ark., 1992), EAAT3 (Kanai ve Hediger, 1992), EAAT4 (Fairman ve ark., 1995) ve EAAT5 (Arriza ve ark., 1997) olmak üzere beş farklı gruba ayrılmaktadırlar.

EAAT1

60 kDa moleküler ağırlığa sahip olan EAAT1 glutamat spesifik bir taşıyıcıdır. Periferal dokularda da bulunan EAAT1'in MSS'de özellikle serebellum, korteks ve hipokampus bölgelerinde astroglial hücrelerde bulunduğu gösterilmiştir (Sidhu ve ark., 2016; Lehre ve Danbolt, 1998). Yapılan çalışmada AH hastalarında EAAT1 ile gerçekleşen Na⁺-bağımlı glutamat transportunda azalma olduğu gözlenmiştir (Palmer ve ark., 1986).

EAAT2

Hipokampusta yüksek ekspresyona sahip olan EAAT2 62,1 kDa ağırlığındadır. Plazma membranında bulunduğu bilinen EAAT2'nin mitokondri, endoplazmik retikulum ve nükleus membranında bulunduğu gösterilmiştir (Chaudhry ve ark., 1995). EAAT2 ekspresyonundaki azalmaya bağlı aşırı glutamat aktivitesi demiyelinizasyona, aksonal hasara, hücre ölümüne neden olarak amyotrofik lateral skleroz (ALS) (Rothstein ve ark., 1992; Rothstein, 1995), AH (Li ve ark., 1997), epilepsi (Tanaka ve ark., 1997) ve iskemi (Martin ve ark., 1997) gibi birçok nörodejeneratif hastalığa yol açtığı rapor edilmiştir. Bununla birlikte EAAT2'nin hipokampal formasyonda az eksprese edilmesi kognitif performansın ve öğrenmenin bozulmasına yol açmaktadır (Spangaro ve ark., 2012). Heo ve arkadaşları tarafından T-labirent ile uzaysal hafıza eğitimi verilmiş ve verilmemiş fareler üzerinde yapılan deneyde, uzaysal hafıza eğitimi verilmiş farelerin EAAT2 düzeylerinde artış olduğu bildirilmiştir (Heo ve ark., 2012). Bir başka çalışmada ise EAAT2 knockout farelerde hipokampal nöron kaybı olduğu gösterilmiş olup, bu kaybın glutamat eksitotoksitesisi ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Tanaka ve ark., 1997).

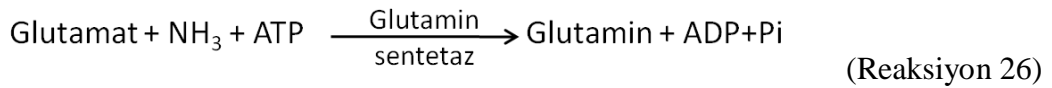
Normal koşullar altında astrositlerde sentezlenen EAAT2'nin özellikle astrositler ile yakından ilişkili olan nöronlarda da bulunduğu gösterilmiştir (Sheldon ve Robinson, 2007). Fakat nöronlardaki görevi henüz tam olarak bilinmemektedir.

EAAT3

57,2 kDa moleküler ağırlığa sahip olan nöronal spesifik EAAT3 korteks, hipokampus ve kaudat-putamende eksprese edilmektedir (Haugeto ve ark., 1996). Glutamaterjik nöronların presinaptik alanlarında özellikle soma ve dendritlerde bulunduğu gösterilmiştir (Holmseth ve ark., 2012). Böylece sistin-glutamat değiş-tokuşuna aracılık ettiği ve non-veziküler glutamat salınımında rol oynadığı düşünülmektedir (Himi ve ark., 2003; Watts ve ark., 2014). Aynı zamanda GABAerjik nöronların presinaptik alanlarında eksprese edilebilmesi gamma-aminobütirik asit (GABA) sentezinde prekürsor olarak rol aldığını göstermektedir (Sepkuty ve ark., 2002). Glutamat-indüklü nörotoksisite ile ilgili yapılan çalışmalarda EAAT3 disfonksiyonunun gerçekleştiği rapor edilmesine rağmen bu mekanizmadaki rolü hala tam olarak bilinmemektedir (Robert ve ark., 2014). Alzheimer hastalığı olan fareler üzerinde yapılan çalışmalarda hipokampusta EAAT3 miktarında azalma olduğu, bu azalmanın nörodejenerasyon ile ilişkili olabileceği savunulmuştur (Duerson ve ark., 2009; Cassano ve ark., 2012).

2.3.4. Glutamat Yıkımı

Eksitator amino asit taşıyıcılar tarafından ekstraselüler sıvıdan alınan glutamat, astrositlerde glial spesifik enzim olan ve ATP bağımlı glutamin sentetaz (GS) aracılığıyla glutamine dönüştürülmektedir. Moleküler ağırlığı 400 kDa olan GS tetramer yapıda ve aminoasit dizilimleri birbirlerine özdeş sekiz altbirimden oluşmaktadır. Birçok beyin bölgesinde bulunmakla birlikte hipokampal formasyonda glutamaterjik sinir terminalleri etrafındaki astrositik hücrelerde oldukça fazla eksprese edilmektedir (Derouiche ve Frotscher, 1991).



Ze ve arkadaşları tarafından yapılan nörotoksisite çalışmasında hipokampal alanda toksik ajan aracılı meydana gelen dejenerasyonda GS aktivitesinde azalma olduğu gösterilmiştir (Ze ve ark., 2016).

Suda çözünebilir, hidrofilik bir aminoasit olan glutamin plazma zarından difüze olamamaktadır. Bu nedenle hücreler arası transferi taşıyıcı proteinler yardımıyla gerçekleşmektedir. Astrositlerde sentezlenen glutamin Na^+ bağımlı ASC

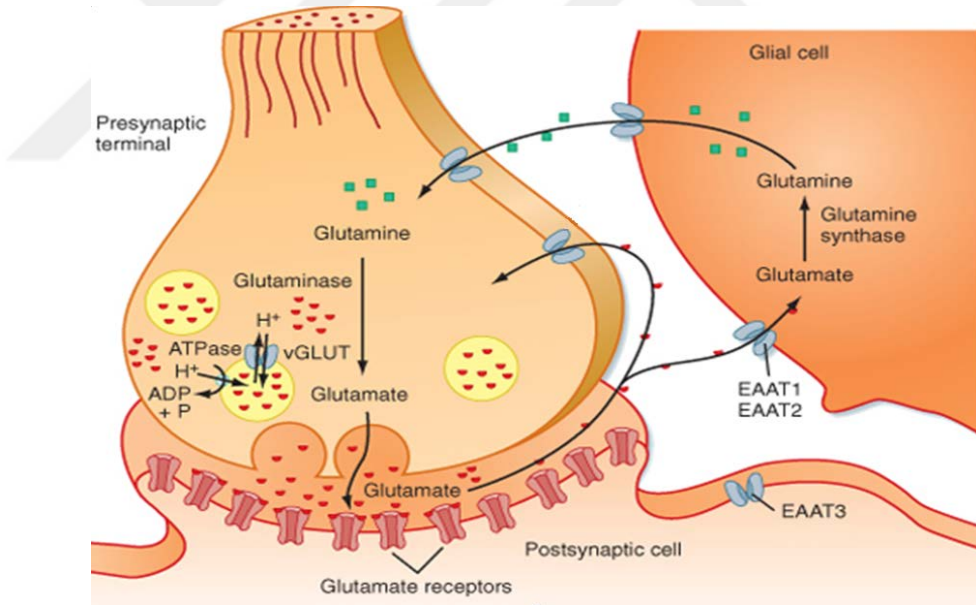
(alanin=A, serin=S ve sistein=C) ve N sistem taşıyıcılar aracılığıyla ekstraselüler sıvıya taşınmaktadır. ASC sisteme ait taşıyıcılar alanin, serin ve sistein gibi küçük nötral aminoasitleri taşıdıklarından dolayı bu ismi almaktadırlar. Yine nötral bir aminoasit olan glutaminin taşınımı, glutamin selektivitesine sahip ve beyin dokusunda yaygın olarak bulunan ASCT2 (ASC taşıyıcı) tarafından yapılmaktadır (Deitmer ve ark., 2003). Yapılan çalışmalarda bu taşıyıcının çift yönlü çalışabildiği gösterilmiştir. ASCT2'nin hem glutaminin inflaksı hemde eflaksında rol alması fizyolojik rolünün hücre içi ve dışı dengeyi düzenlemek olduğunu göstermektedir (Oppedisano ve ark., 2007; Sidoryk-Wegrzynowicz, 2014). Yan zincirlerinde nitrojen (N) bulunduran glutamin, histidin gibi aminoasitleri taşıyan ve bu nedenle "N sistem" olarak sınıflandırılan taşıyıcılar, glutaminin astrositlerden ekstraselüler alana taşınmasından sorumludurlar. N sistemin glutamin taşıyan Na⁺-bağlı nötral amino asit taşıyıcı-3 (sodium-coupled neutral amino acid transporter=SNAT) ve SNAT5 olmak üzere 2 üyesi bulunmaktadır. Bu taşıyıcılar glutamin ve Na⁺ya karşılık, 1 H⁺ taşıyarak elektronötral taşınımına aracılık etmektedir (Broer, 2014). SNAT3 neokorteks, serebellum, olfaktör bulbus ve beyin sapında, SNAT5 ise hipokampus, striatum, spinal kord ve neokortekste eksprese edilmektedir (Boulland ve ark., 2002; Cubelos ve ark., 2005). SNAT5'in glutamine karşı yüksek affiniteye sahip olmakla birlikte glisin, serin, alanin ve sistein gibi birçok aminoasite de affinitesi bulunmaktadır. Özellikle NMDA reseptörlerinde koagonist olarak görev yapan glisinin, glial hücrelerden glutamin salınmasına aracılık ettiği öne sürülmektedir. Dolayısıyla hipokampusta SNAT5'in glutamat-glutamin döngüsü modülasyonunda rol aldığı savunulmaktadır (Hamdani el ve ark., 2012).

Fizyolojik şartlarda glutaminin hipokampusta ekstraselüler ortamdaki konsantrasyonu 200 ile 500 µM'dır. Fakat glutaminin MSS'de iletme aracılık edecek herhangi bir reseptörü bulunmamaktadır. Bu nedenle sinaptik iletme sadece sekonder olarak katkı sağladığı düşünülmektedir (Danbolt, 2001).

Ekstraselüler glutaminin nöron membranında bulunan SNAT1, 2 ve 7 tarafından alınarak glutamat döngüsüne katıldığı bilinmektedir. Bu taşıyıcılar, alanin gibi nötral aminoasit tercihleri nedeniyle "A sistem taşıyıcılar" olarak anılmaktadırlar (Broer ve Brookes, 2001). Bu taşıyıcılar beyin dokusunda özellikle hipokampal

glutamaterjik nöronlarda bol miktarda eksprese edilmektedir. Her biri yaklaşık 50 kDa ağırlığında olan taşıyıcılardan SNAT1'in glutamin affinitesinin, SNAT2'ye göre daha yüksek olduğu rapor edilmiştir. Bu nedenden dolayı glutaminin nöronlara tekrar alınmasında (re-uptake) SNAT1'in daha baskın olduğu düşünülmektedir (Danbolt, 2001). SNAT7'nin glutaminin astrositlerden alınması ve nöronlara alınmasıyla ilişkili fonksiyonel işlevi hala tam olarak bilinmemektedir (Armano ve ark., 2002; Hagglund ve ark., 2011).

Nöronlara tekrar alınan glutamin, glutaminaz enzimi aracılığıyla glutamata dönüştürülerek veziküllerde depolanmaktadır. Sinaptik iletimde önemli role sahip olan, nöronlar ve astrositler arasında görülen bu mekanizmaya glutamat-glutamin döngüsü adı verilmektedir (Şekil 2.7) (Westergaard ve ark., 1995). Glutamat-glutamin döngüsünde nöronlarda sentezlenen glutamat presinaptik hücreye gelen bir uyarıyla veziküllerden salınmakta ve postsinaptik alanda bulunan reseptörlerine bağlanarak hücresel cevaba neden olmaktadır (Danbolt, 2001).



Şekil 2.7. Glutamat-glutamin döngüsü (Koeppen ve Stanton, 2008)

2.3.5. Glutamat Reseptörleri

Glutamatın hem nöron hemde astrosit membranında bulunan iki tip reseptörü bulunmaktadır. Bunlar doğrudan iyon kanallarını kontrol eden iyonotropik glutamat reseptörleri (iGluR) ve G-proteinleri üzerinden dolaylı olarak iyon

kanallarına etki eden metabotropik glutamat reseptörleri (mGluR)'dir (Tanabe ve ark., 1992; Ozawa ve ark., 1998).

İyonotropik Glutamat Reseptörleri

İyonotropik glutamat reseptörleri ligand tercihlerine göre, NMDA, AMPA ve KA reseptörü olmak üzere üç tanedir (Boulter ve ark., 1990; Martin ve ark., 1993). Presinaptik nörona gelen uyarıyla salınan glutamat, AMPA ve KA reseptörlerine bağlanarak bu kanallarda konformasyonel değişikliğe neden olmaktadır. Meydana gelen konformasyonel değişiklik sonucu oluşan pordan postsinaptik nörona Na⁺ girişi gerçekleşmekte ve postsinaptik nöronda depolarizasyon gözlenmektedir (Headley ve Grillner, 1990). Bu değişimle NMDA reseptöründeki Mg⁺² blokajı ortadan kalkmakta ve glutamatın NMDA reseptörüne bağlanmasıyla hücre içine Na⁺ ve Ca⁺² girişi gerçekleşmektedir (Nguyen ve Woo, 2003). Meydana gelen bu uyarıcı etki öğrenme ve hafıza gibi birçok fizyolojik süreçte gözlenmektedir (Platenik ve ark., 2000).

AMPA Reseptörleri

AMPA reseptörleri, GluR1-4 alt ünitelerinden oluşan heterotetramer yapıdadır. GluR1 serebral korteks, hipokampus, amigdala ve serebellar gliyalarda, GluR2 serebellum, neokorteks ve hipokampusta eksprese edilmektedir. GluR3 en çok neokorteks ve hipokampusta bulunurken, GluR4 serebellum ve önbeyinde gözlenmektedir (Tanabe ve ark., 1992). Merkezi sinir sisteminde hızlı eksitator sinaptik iletimden sorumlu AMPA kanallarının kinetikleri, kanalı oluşturan alt ünitelerin kombinasyonları ile değişebilmektedir (Platt, 2007).

Kainik Asit Reseptörleri

Kainik asit reseptörlerinin GluK1-5 olmak üzere beş alt ünitesi bulunmaktadır. Homomerik veya heteromerik tetramer yapıda olabilen KA reseptörlerinin GluK1, GluK2, GluK3 alt üniteleri homomerik olarak fonksiyonel glutamat-bağımlı kanalı oluşturabilmektedir. Fakat GluK4 ve GluK5 alt ünitelerinin glutamat affinitelerinin düşük olması, bu alt tiplere sahip reseptörlerin kinetiklerini değiştirmektedir (Christensen ve ark., 2004). Sıçan beyin dokusunda GluK1, GluK2, GluK3'ün hipokampus, striatum ve kortekste, GluK4, GluK5'ün ise striatum ve kortekste yüksek ekspresyona sahip oldukları bilinmektedir. Kainik asit reseptörleri AMPA reseptörlerine yapısal ve fonksiyonel olarak benzerlik

göstermektedir. Fakat yapılan çalışmalarda KA reseptörleri kinetiklerinin AMPA reseptörlerine göre daha yavaş olduğu, bunun da postsinaptik nöronda AMPA reseptörlerinin gösterdiği depolarize edici etkinin daha uzun sürmesini sağlayarak iletimde rol oynadığı rapor edilmiştir (Copits ve ark., 2011; Lerma, 2011). Ayrıca postsinaptik alanda eksitator etkisini bildiğimiz KA reseptörlerinin presinaptik alanda ise inhibitör etki gösterdiği rapor edilmiştir. Bu bilgiler KA reseptörlerinin nöral iletimin regülasyonunda rol aldığını destekler niteliktedir (Darstein ve ark., 2003).

NMDA Reseptörleri

Nöronlar üzerinde bulunan NMDA reseptörlerinin NR1, NR2 (NR2 A-D) ve NR3 (NR3A-B) alt üniteleri bulunmaktadır. Reseptör üzerinde modülasyon etkisi bulunan glisin biyomolekülünün bağlandığı NR1 temel alt ünite ve tüm NMDA reseptörlerinde bulunmaktadır. Glutamatın bağlandığı NR2, kanalın açık kalma süresi ve kanal geçirgenliği gibi fonksiyonel özelliklerini modüle ederek kanal aktivitesini güçlendirmektedir (Palmada ve Centelles, 1998). NR3 alt birimi reseptör aktivitesi üzerinde inhibe edici bir etkiye sahiptir. NR3 içeren reseptörün Ca^{+2} permeabilitesinin azaldığı buna bağlı olarak diğer NMDA reseptörlerinin aktivitesi üzerinde inhibe edici etki gösterdiği rapor edilmiştir (Matsuda ve ark., 2003). Nöron dinlenme durumundayken Mg^{+2} blokajı NMDA reseptörünü inaktif halde tutmaktadır. AMPA ve KA reseptörlerinin aktivasyonu sonucu postsinaptik alanda meydana gelen orta dereceli depolarizasyon (-30, -20 mV arası) ile Mg^{+2} blokajı kalkmaktadır. Blokajın kalkmasıyla oluşan kanal yapısından hücre içine iyon geçişi gerçekleşmektedir. Yapılan çalışmalarda oluşan NMDA reseptörlerinin meydana getirdiği cevapların voltaj bağımlı olduğu ve ligandın bağlanmasıyla oluşan akımların orta dereceli depolarizasyon potansiyelinde (-30, -20 mV) gözlemlendiği gösterilmiştir (Flatman ve ark., 1986; McDonald ve Johnston, 1990).

Metabotropik Glutamat Reseptörleri

Fonksiyonel ve farmakolojik açıdan iyonotropik reseptörlerden farklı olan mGluR, G proteini bağımlı etki göstererek çeşitli intraselüler mekanizmaları aktive etmekte ve bu şekilde iletimde rol almaktadırlar (Schoepp ve ark., 1990). Aminoasit dizilişleri, etkileri ve farmakolojik özelliklerine göre grup I (mGluR1,

5), grup II (mGluR2, 3) ve grup III (mGluR4, 6, 8) olmak üzere üç grupta incelenmektedir (Tanabe ve ark., 1992). Postsinaptik alanda bulunan grup I reseptörlerinin aktivasyonu fosfolipaz C (PLC) enzimi aracılı olarak membran fosfolipidlerinden inositol-3-fosfat (IP3) oluşumuna neden olmaktadır. Hücre içi Ca^{+2} kanallarının açılmasında rol alan IP3, sitozolik Ca^{+2} konsantrasyonunu arttırmaktadır. Metabotropik grup I reseptörlerinin bu mekanizmayla çeşitli hücresel süreçlerde rol aldığı gösterilmiştir. Aynı zamanda grup I reseptörleri, AMPA ve NMDA kanallarının fosforile edilmesinde rol alarak bu reseptörlerin aktivitelerini regüle etmektedir (Batchelor ve ark., 1994; Benquet ve ark., 2002). Çoğunlukla presinaptik alanda bulunan grup II ve III reseptörleri ise Gi proteini aracılı olarak AC enziminin inhibisyonuyla cAMP oluşumunu azaltmakta ve nöroprotektif etki göstermektedir (Klar ve ark., 2015).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik, Tıbbi Biyokimya, Fizyoloji, Tıbbi Patoloji Anabilim Dalları ve Deneysel Hayvanlar Ünitesinde gerçekleştirilen çalışmamızda ortalama 250-300 gr ağırlığında, 90 adet, 3 aylık erkek Wistar sıçan kullanılmıştır.

3.1. Gruplandırma ve Deneysel Protokolü

Deneysel Hayvanlar Ünitesinden temin edilen sıçanlar her grupta 30 hayvan olacak şekilde üç gruba ayrılmıştır.

1. Kontrol grubu (K)
2. 100 mg/kg dozunda sülfid uygulanan grup S(100)
3. 260 mg/kg dozunda sülfid uygulanan grup S(260)

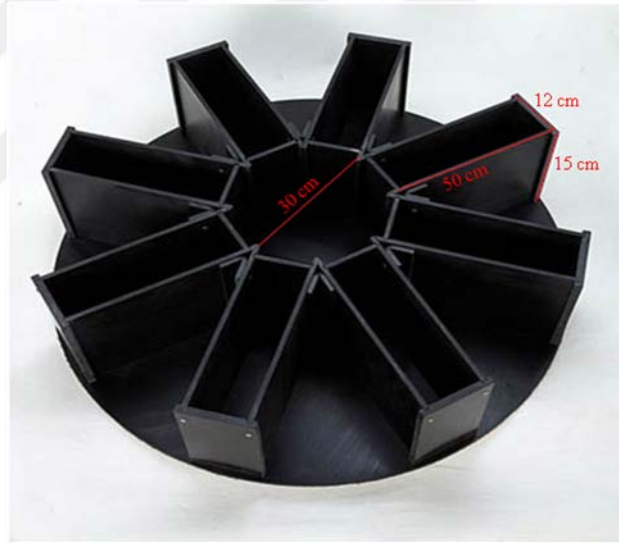
35 gün süreyle kontrol grubuna musluk suyu, S(100) grubuna 100 mg/kg/gün, S(260) grubuna ise 260 mg/kg/gün dozunda musluk suyunda çözünmüş sodyummetabisülfid ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) gavaj yoluyla verilmiştir (Hui ve ark., 1989; Ozturk ve ark., 2011). Bu süreçte her kafeste 5 hayvan olacak şekilde 12 saatlik karanlık/aydınlık siklusunda tutulan hayvanlar deney süresince ticari sıçan yemi ve musluk suyuyla beslenmiştir. Her grupta bulunan 30 hayvan, mikrodializ için yerleştirilen kanülün hipokampusta lezyona neden olabileceği ve öğrenme parametrelerini olumsuz yönde etkileyebileceği bilindiğinden iki alt gruba ayrılarak deneye alınmıştır. Bir grupta mikrodializ yöntemi uygulanmış, diğer grupta ise öğrenme deneyleri yapılmıştır. 35 günlük deney süresinin bitiminden bir gün sonra, öğrenme deneyleri tamamlanan sıçanların anestezisi altında transkardiyak perfüzyonla verilen serum fizyolojik ile kandan arındırılan beyin dokuları çıkarılmış ve hipokampusları ayrılarak VGLUT1, EAAT1, EAAT2 ve EAAT3 analizlerinde kullanılmak üzere sıvı nitrojende dondurulmuştur. Mikrodializ uygulanan gruptaki sıçanların beyin dokuları ise %4 paraformaldehit içeren NaCl solüsyonu ile perfüze edildikten sonra çıkarılmış ve kanül yerinin saptanması için patolojik inceleme yapılmıştır.

3.2. Öğrenme Deneyleri

Her gruptan 16 hayvanda 35 günlük $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ uygulamasının 20. günü öğrenme deneylerine başlanmıştır. Sekiz Kollu Radyal Labirent testi manuel olarak, açık alan testi ise Noldus EthovisionXT system kullanılarak değerlendirilmiştir.

3.2.1. Sekiz Kollu Radyal Labirent Testi

Sekiz Kollu Radyal Labirent testi 30 cm'lik dairesel platform alanını çevreleyen 50x12x15 cm boyutlarında sekiz eş koldan oluşan siyah mat tabanlı düzende yapılmıştır (Şekil 3.1). Her kolun girişinde aynı anda hareket edebilen şeffaf pleksiglas giyotin kapı, kolların ucunda ise ödülün konulabileceği 3 cm çapında ve 1 cm derinliğinde yem kapları bulunmaktadır. Sekiz Kollu Radyal Labirent testi ile uzaysal hafıza ölçüldüğünden labirentin bulunduğu odanın duvarlarına, labirent içinden görülebilecek şekilde birbirinden farklı ipuçları asılmıştır.



Şekil 3.1. Sekiz kollu radyal labirent

Öğrenme deneylerine başlamadan önce hayvanlara 6 gün boyunca 5'er dakika ele alıştırmaya (handling) uygulanmıştır. Daha sonra sıçanlar giyotin kapılara alışmaları ve labirenti keşfetmeleri için 5 gün boyunca günde 10'ar dakika labirentte serbest bırakılmıştır. Bu süre boyunca her kolda yem bulunmasına dikkat edilmiş, aynı zamanda sıçanların koku duyusuna göre hareketlerini engellemek için her turdan (trial) sonra labirent düzeneği %70'lik etanol ile temizlenmiştir. Deneyin öğrenme aşamasında sıçanlar 2, 3, 5 ve 7. kollarında yem bulunan labirentin merkezine

konulmuştur. 5 saniye giyotin kapıları kapalı halde merkezde tutulan sıçanların ilk seçimlerini yapmaları için kapılar aynı anda açılmıştır. İlk seçimlerini yapan sıçanlar tekrar merkeze döndüklerinde kapılar tekrar kapatılarak 5 sn beklenmiş ve bu süreç her seçim arasında tekrarlanmıştır (Dubreuil ve ark., 2003). Yapılan tur süresi, sıçanlar yem olan kollardaki tüm yemleri yiyene kadar veya 7'şer dakika olarak belirlenmiştir. Sıçanların yemli kollara bir kez girerek kolun orta noktasını geçmeleri veya kola girip yemi yemeleri doğru seçim olarak kabul edilmiştir. Bu sırada turlarda hayvanın toplam kollara giriş sayısının %80'inin doğru seçim olması öğrenme kriteri olarak belirlenmiştir. Öğrenme aşaması %80 doğruluk kriteri elde edilene kadar tekrar edilerek geçen gün sayısı öğrenme parametresi olarak verilmiştir. Hayvanların doğruluk kriterini sağlamalarının tahmini süresi öğrenme deneylerinin başlangıcından itibaren 8 ile 15 gün arasında değişmektedir. Bu süreyi aşan hayvanların öğrenmeleri bozulmuş olarak kabul edilmiştir (Noorafshan ve ark., 2013). Yemli kollara bir kez girmesi beklenen hayvanın, girdiği herhangi bir kola tekrar girmesi çalışan hafıza hatası (Working memory errors= WME), yemsiz kolu araştırmak için girmesi ise referans hafıza hatası (Referance memory errors= RME) olarak kaydedilmiştir (Gokcek-Sarac ve ark., 2013; Noorafshan ve ark., 2013).

3.2.2. Açık Alan Testi

Açık alan testi deneyleri duvar yüksekliği 40 cm olan, tabanı 80x80 cm ebatlarında kare şeklinde siyah mat tabanlı düzenekte yapılmıştır. Alan, 400 cm² büyüklüğünde birbirine eşit 16 küçük kareye bölünmüştür. Deneyin başlangıcında sıçanlar tek tek bu alanın merkezine bırakılmış ve 3 dakika boyunca hareketleri dijital olarak kaydedilmiştir. Her sıçan için girdiği kare sayısı, kat ettiği toplam mesafe ve ortalama hız ölçülmüştür (Denenberg, 1969; Berry ve ark., 2008).

3.3. Mikrodiyaliz Yöntemi

Her gruptan 14 hayvana sülfite verilmesinin 32. günü mikrodiyaliz yöntemi için cerrahi işlem uygulanmıştır. Rehber kanül ve mikrodiyaliz probunun yerleştirilmesi izofloran anestezisi altında stereotaksik çerçeve üzerinde gerçekleştirilmiştir. Orta hat insizyonunu takiben bağ doku ve kas tabakası ekarte edilip kafatasına ulaşılmıştır. Rehber kanül bregma referans alınarak 3.6 mm kaudal, 2.0 mm lateral, 4.0 mm ventral koordinatlarda kafatasına yerleştirilmiş ve

mikro-vida ile dental sement kullanılarak sabitlenip insizyon 3.0 ipek ile kapatılmıştır. Rehber kanül içerisine yerleştirilen dummy (tıkaç) yardımıyla kanülün dış ortam ile ilişkisi önlenmiştir. Hayvanlar cerrahi işlemin ardından 48 saat süreyle, her kafeste bir hayvan olacak şekilde yem ve su kısıtlaması olmadan tutulmuştur (Pu ve ark., 2004; Anneken ve ark., 2013). 34. deney günü dummy çıkartılarak mikrodializ probu rehber kanüle yerleştirilmiştir. Ertesi gün mikrodializ probu, polietilen tüp kullanılarak infüzyon pompasına bağlanmış ve dorsal hipokampusu yerleştirilen prob, ticari yapay serebrospinal sıvı (aCSF) ile 2 µl/dk hızda perfüze edilmiştir. 120 dakikalık stabilizasyon periyodunun ardından perfüzyon hızı 1 µl/dk'ya düşürülerek örnekler buz üzerinde muhafaza edilen ependorf tüplerinde toplanmış ve -80° C'de saklanmıştır.

3.4. Hematoksilen Eozin Boyaması ile Kanülasyonunun Doğrulaması

Örneklerin toplanmasının ardından hayvanlar eter anestezisi ile feda edilerek %10 paraformalin solüsyonu ile transkardiyak perfüzyon işlemi yapılmış ve beyin dokuları çıkarılmıştır. Çıkarılan beyinler aynı solüsyon içerisinde 10 gün sabitlendikten sonra takibe alınmıştır. Parafine gömülen dokular frontalden kaudale doğru 5 µm kalınlığında seri kesitler alınarak Hematoksilen eozin (HE) ile boyanmış ve ışık mikroskobu ile değerlendirmeye alınmıştır. Kanül girişi tespit edilen kesitlerde giriş hattı boyunca lenfositler ve yabancı cisim tipi dev hücrelerinden oluşan reaksiyon izlenmiştir. Hipokampusun merkezine kadar devam eden reaksiyonun izlendiği vakalarda kanülün hedef bölgeye ulaştığı kabul edilmiştir. Dorsal hipokampus CA1 bölgesine 0,5 mm ve daha az mesafedeki alanın dışında kalan alanlardan elde edilen veriler değerlendirmeye alınmamıştır (Zhou ve ark., 2001). Kanülasyon doğrulaması Patoloji Anabilim Dalından bir öğretim üyesi tarafından yapılmıştır.

3.5. Kütle Spektrometresi (Mass Spectrometry) ile Glutamat ve Glutamin Tayini

Mikrodializ yöntemiyle toplanan diyalizatta glutamat ve glutamin amino asitlerinin düzeyi ultra-hızlı sıvı kromatografi (LC-20 AD UFLC XR, Shimadzu Corporation, Japonya) sistemine bağımlı LC/MSMS (LCMS-8040 Shimadzu Corporation, Japonya) cihazı kullanılarak yapılmıştır. Glutamin ve glutamat standartları 1:10 formik asit/distile su solüsyonunda hazırlanmıştır. Ölçülecek

glutamin ve glutamat için optimize multiple reaction monitoring (MRM) metodu geliştirilmiştir. MRM geçişleri her amino asit için otomatik olarak pozitif elektrosprey iyonizasyon (ESI) modunda optimize edilmiştir. Pozitif ESI-MS modundan elde edilen MRM m/z değerleri glutamin için 146.9→84.1 glutamik asit için 147.9→84.1 olarak belirlenmiştir. Kromatografik ayrımlar 25°C'de Inertsil HPLC kolonunda (ODS-4, 3 x100 mm, 2µm; GL Sciences Inc. Tokyo, Japan) gerçekleştirilmiştir. Glutamin ve glutamat gradient elüsyonu (akış hızı 0,4 ml/dk) ile ayrılmıştır. Mobil faz A, 900 ml su: 100 ml asetonitril: 1 ml formik asit; Mobil faz B, 999 asetonitril: 1 ml formik asit olacak şekilde hazırlanmıştır. Gradient programı mobil faz B; 0-1 dk %5-%50; 1-2 dk %50-%95; 2-3dk %95 ve 3-4 dk, %5 şeklinde gerçekleştirilmiştir. İnjektion volümü 5 µl olarak kullanılmıştır. Glutamat ve glutamin standartlarının linear kalibrasyon aralığı 50-1000 ng/ml olarak seçilmiştir. Her iki aminoasit için analiz süresi 4 dakika sürmüştür (Santos-Fandila ve ark., 2013).

3.6. Reverse Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) Analizi ile VGLUT1, EAAT1, EAAT2 ve EAAT3 Düzeylerinin Tayini

Total RNA izolasyonu: Kontrol ve deney gruplarına ait doku örneklerinden total RNA izolasyonu, trizol reaktifi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. MagNa Lyser Gren Beads tüplerine alınan dokuların üzerine 1 ml trizol reaktifi eklenmiş ve homojenizasyon işlemi MagNa Lyser cihazında 30 saniye boyunca 3000 rpm'de gerçekleştirilmiştir. Homojenizasyon işleminden sonra RNA izolasyonu tamamlanmıştır. Protokol sonunda elde edilen RNA pelletleri üzerine RNaz-ıçermeyen su eklenmiştir. Toplanan RNA'nın konsantrasyonu spektrofotometrik olarak 260 nm ve 280 nm dalga boyunda ölçülmüştür. RNA konsantrasyonları belirlenen dokular -80°C'de muhafaza edilmiştir.

DNaz-muamelesi: RNA (3 µg) 1U DNaz I ile muamele edilmiş ve komplementer DNA (cDNA) sentezi için kullanılmıştır.

cDNA sentezi: cDNA sentezi, Invitrogen'in Superscript III First Strand Synthesis System kiti kullanılarak gerçekleştirilmiştir. DNaz ile muamele edilmiş olan 3 µg RNA örneği, 1 µl 50 ng/µl random heksamer primerleri ve 1 µl 10 mM dNTP karışımı ile karıştırılmıştır. Toplam hacim DEPC-ile muamele edilmiş su ile 10 µL'ye tamamlanmıştır. Bu karışım 65°C' de 5 dakika inkübe edilmiştir. Süre

sonunda RNA/primer karışımına, 10xRT tamponu, 25 mM MgCl₂, 0,1 M DTT, RNaseOUT (40 U/μl) ve Superscript III RT (200 U/μl)'den oluşan toplam 10 μl'lik cDNA sentez karışımı ilave edilip yavaşça karıştırılmıştır. Bu karışım, önce 25°C'de 10 dakika, daha sonra 50°C'de 50 dakika inkübe edilmiştir. Reaksiyon 85°C'de 5 dakika inkübe edilerek sonlandırılmıştır. Son olarak da bu karışımın üzerine 1 μl RNase H ilave edilmiş ve 37°C'de 20 dakika daha inkübasyona bırakılmıştır. Elde edilen cDNA'lar PCR için kullanılmaya kadar -20°C'de saklanmıştır.

Tablo 3.1. Real-time PCR için kullanılan primerlerin sekansları

Hedef gen	Sekans	Fragment büyüklüğü (bp)
VGLUT1	forward 5'-AGACTGTCTGGCCTCATAACAT-3' reverse 5'-CGAAGATGACACAGCCATAG-3'	183
EAAT1	forward 5'-CCAATCTGGTAGAAGCCTGC-3' reverse 5'-AGTCTCCATGGCCTCTGACA-3'	131
EAAT2	forward 5'-CTGTACCTTCCGTTGCTTG-3' reverse 5'-CTATGAAGATGGCTGCCACG-3'	132
EAAT3	forward 5'-ATCACAGGTGTCGCTGCACT-3' reverse 5'-GTGACACCAGGCTTGATGCT-3'	137
Beta aktin	forward 5'-TATGCCAACACAGTGCTGTC-3' reverse 5'-GATAGAGCCACCAATCCACA-3'	156

Real-time PCR reaksiyonu: Sıçan EAAT1, EAAT2, EAAT3 ve VGLUT1 için spesifik primerler (Tablo 3.1) kullanılarak StepOnePlus™ Real-Time PCR (Applied Biosystems) cihazında, Power SYBR® Green Master Mix protokolüne göre Real-time PCR çalışılmıştır. Reaksiyon karışımı; 10 μl Power SYBR® Green PCR Master Mix (2X), 10 μM forward ve 10 μM reverse primer, 2 μl cDNA ve toplam hacim 20 μl olacak şekilde nükleaz-içermeyen su'dan oluşacak şekilde hazırlanmıştır. Amplifikasyon koşulları; 95°C'de 10 dakika, 95°C'de 15 saniye, 60°C'de 30 saniye ve 72°C'de 30 saniye olacak şekilde oluşturulmuştur. StepOnePlus™ Real-Time PCR (Applied Biosystems) cihazına ait software programı yardımıyla CT (siklus eşik değerleri) değerleri

belirlenmiştir. Elde edilen CT değerleri $2^{-\Delta\Delta CT}$ formülünde kullanılarak her genin kontrol grubuna kıyasla göreceli değişim düzeyleri hesaplanmıştır. Amplifikasyon, 35 siklusa gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, Melting Curve analizi ile ürünlerin beklenen ve gözlenen Tm değerleri karşılaştırılarak PCR ürünlerinin doğruluğu değerlendirilmiştir.

3.7. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel değerlendirme SPSS.20 paket programı kullanılarak yapılmış ve sonuçlar ortalama \pm standart hata olarak verilmiştir. Her değişken için normallik testi uygulanmıştır. Normal dağılıma uymayan veriler Kruskal Wallis Varyans Analizi ve onu takiben Mann-Whitney U Testi ile, normal dağılıma uyan veriler one-way varyans analizi (ANOVA), çoklu karşılaştırma ise Post-hoc Tukey Testi kullanılarak değerlendirilmiştir. $P < 0.05$ 'i sağlayan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

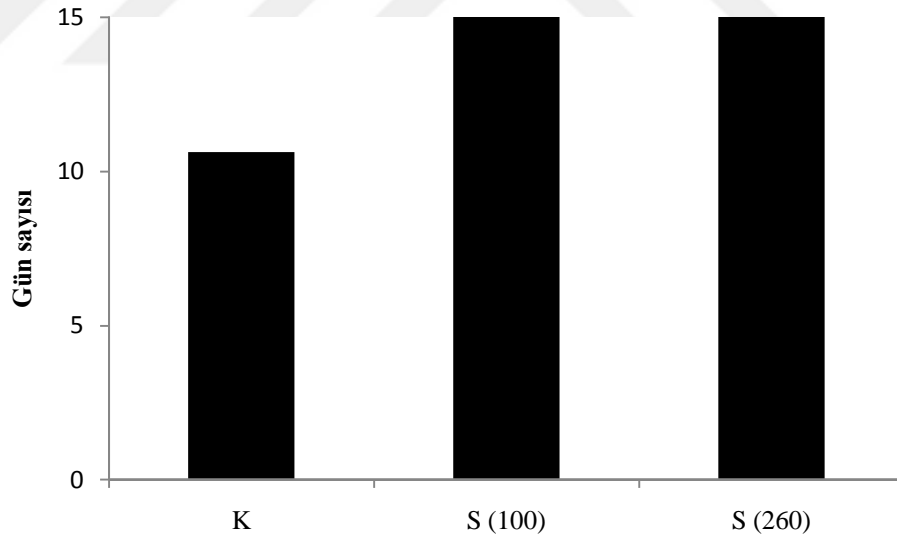
4.1. Genel Görünüm

Deney süresince hayvanların genel görünüm ve davranışlarında herhangi bir değişiklik saptanmamıştır.

4.2. Sekiz Kollu Radyal Labirent Sonuçları

Deney gruplarının sekiz kollu radyal labirent performansları, %80 doğruluk kriteri elde edilene kadar geçen gün sayısı (öğrenilen gün sayısı), WME ve RME olmak üzere üç parametre ile değerlendirilmiştir.

Öğrenme gün sayısı incelendiğinde K grubu hayvanlarının 10. günde %80 doğruluk kriterini sağladığı tespit edilmiştir. Sülfite uygulanan gruplara bakıldığında ise öğrenme kriteri olarak belirlenen maksimum 15 gün limitinin aşıldığı görülmüştür (Şekil 4.1). Bu da sülfitin uygulanan dozlarda öğrenme performansını bozduğunu göstermektedir.

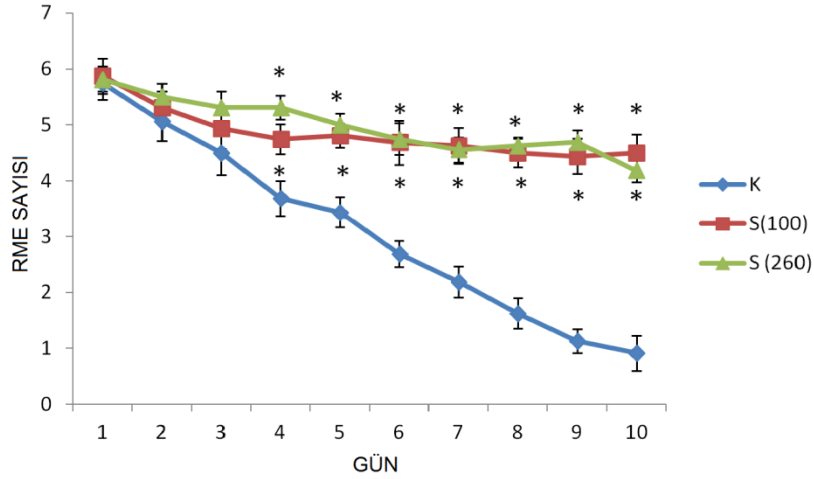


Şekil 4.1. Tüm gruplara ait % 80 doğruluk kriterine ulaşılan gün sayısı (n=16)

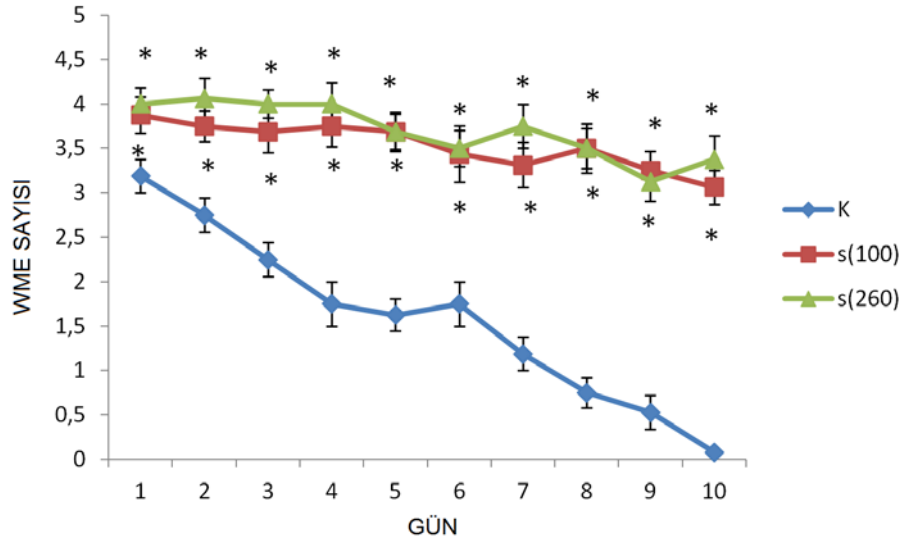
10. gün sonunda %80 doğruluk kriterini sağlayan kontrol grubu hayvanları dokuları alınmak üzere feda edilmiştir. Bu nedenle öğrenme parametreleri için 10 günlük veriler karşılaştırılmıştır.

Kısa süreli hafızanın değerlendirildiği RME sayıları Şekil 4.2’de sunulmuştur. Değerler karşılaştırıldığında sülfite gruplarına ait hayvanların K grubu hayvanlarına göre daha çok hata yaptıkları tespit edilmiştir.

Radyal kollu labirent testinde değerlendirilen WME sonuçları incelendiğinde sülfite uygulanan hayvanların K grubu hayvanlarına göre 1-10. gün arasında yaptıkları hata sayılarının fazla olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.2. 1. ve 10. günler arasında referans hafıza hatası sayıları (n=16, *p<0.05 kontrol grubundan fark)



Şekil 4.3. 1. ve 10. günler arasında çalışan hafıza hatası sayıları (n=16, *p<0.05 kontrol grubundan fark)

4.3. Açık Alan Testi Sonuçları

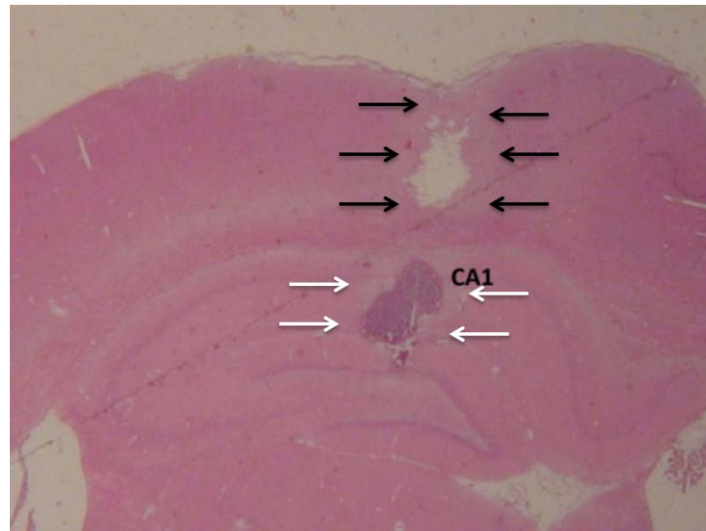
Lokomotor aktivite düzeyi ve anksiyete değerlendirmesinde kullanılan açık alan testinde girilen kare sayısı, kat edilen toplam mesafe ve ortalama hız parametreleri Tablo 4.1’de verilmiştir. Bu parametrelere bakıldığında gruplar arasında fark olmadığı saptanmıştır.

Tablo 4.1. Açık alan testinde girilen kare sayısı, kat edilen toplam mesafe ve ortalama hız sonuçları (n=16)

	MESAFE (cm)	HIZ (cm/dak)	FREKANS
K	1557,91±74,907	189,525±16,985	66,4375±4,282
S(100)	1223,15±161,332	202,628±17,676	55,375±6,758
S(260)	1268,28±143,790	191,666±20,942	43,8125±3,501

4.4. Hematoksilen Eozin Boyaması ile Kanülasyonunun Doğrulanması

Beyin dokusunda belirlenen koordinatların 1 cm frontal ve distali trimlenmiştir. Dorsal hipokampus CA1 bölgesinden alınan 5µm kalınlığındaki seri koronal kesitlerde HE boyama ile kanül hattı belirlenmiştir (Şekil 4.4). Kanül ile doğru yere girildiği tespit edilen K grubuna ait 8, S(100) grubuna ait 14, S(260) grubuna ait 13 hayvanın verileri değerlendirmeye alınmıştır.

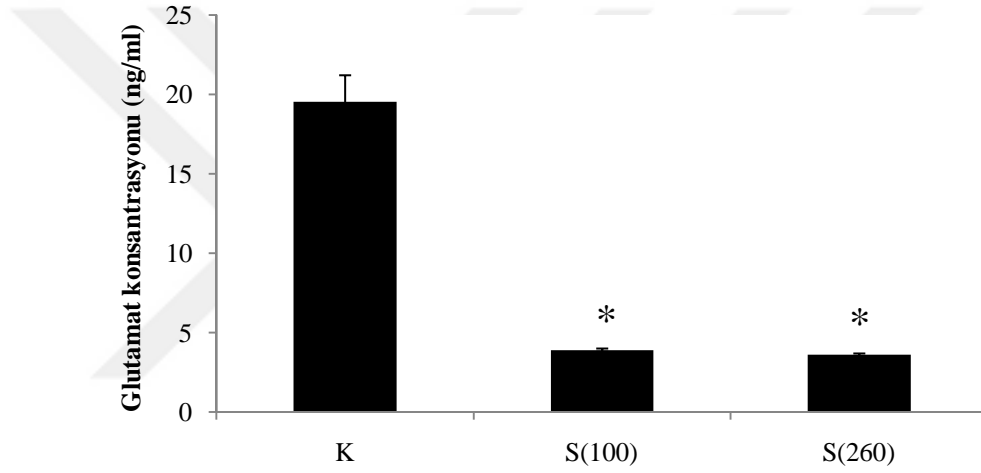


Şekil 4.4. Kanül hattı bölgesi. Rehber kanül hattı siyah oklarla, mikrodiyaliz hattı beyaz oklarla gösterilmiştir.

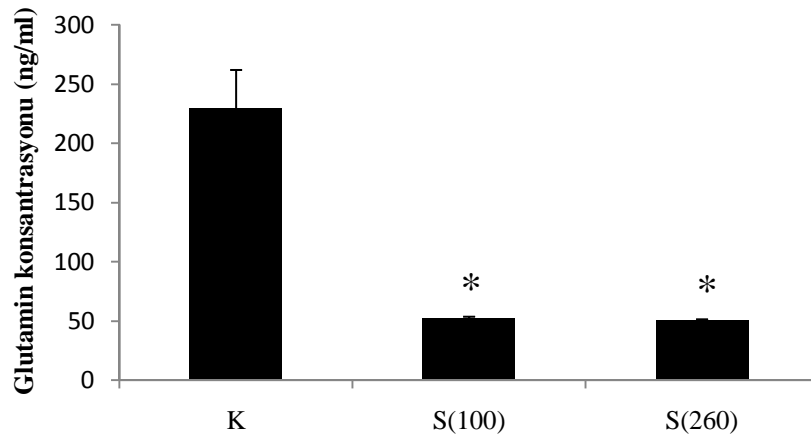
4.5. Kütle Spektrometresi (Mass Spectrometry) ile Glutamat ve Glutamin Tayini Sonuçları

Hipokampus CA1 bölgesinden mikrodializ yöntemiyle toplanan diyalizatta ölçülen glutamat ve glutamin düzeyleri Şekil 4.5, Şekil 4.6 ve Tablo 4.2’de verilmiştir.

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında sülfite uygulanan grupların hem glutamat hemde glutamin konsantrasyonlarında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu saptanmıştır.



Şekil 4.5. Hipokampusta ölçülen glutamat konsantrasyonu (*p<0.05 kontrol grubundan fark)



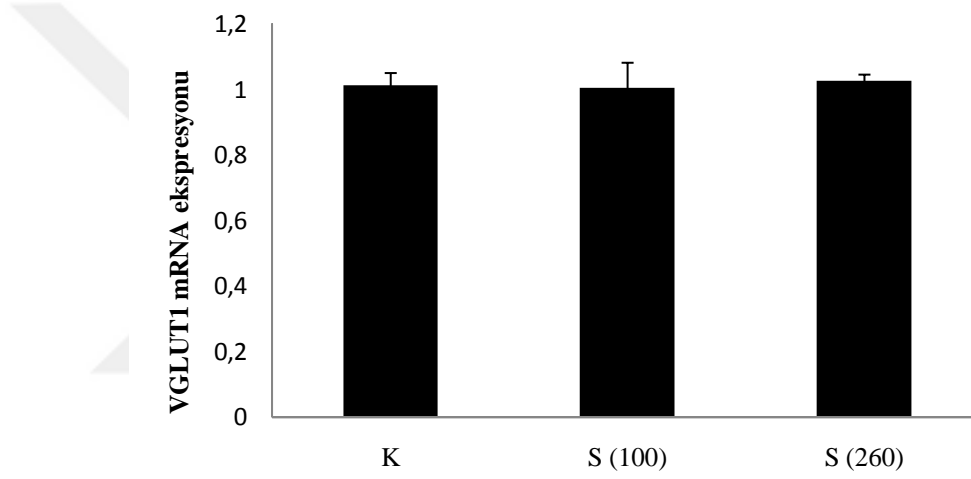
Şekil 4.6. Hipokampusta ölçülen glutamin konsantrasyonu (*p<0.05 kontrol grubundan fark)

Tablo 4.2. Hipokampusta ölçülen glutamat-glutamin konsantrasyonları (*p<0.05 kontrol grubundan fark)

	Glutamin (ng/ml)	Glutamat (ng/ml)
K (n=8)	205,41±23,87	19,51±1,69
S(100) (n=14)	52,70±0,98*	3,90±0,10*
S(260) (n=13)	50,48±3,63*	3,60±0,09*

4.6. VGLUT1 Düzeyinin RT-PCR Analizi Sonuçları

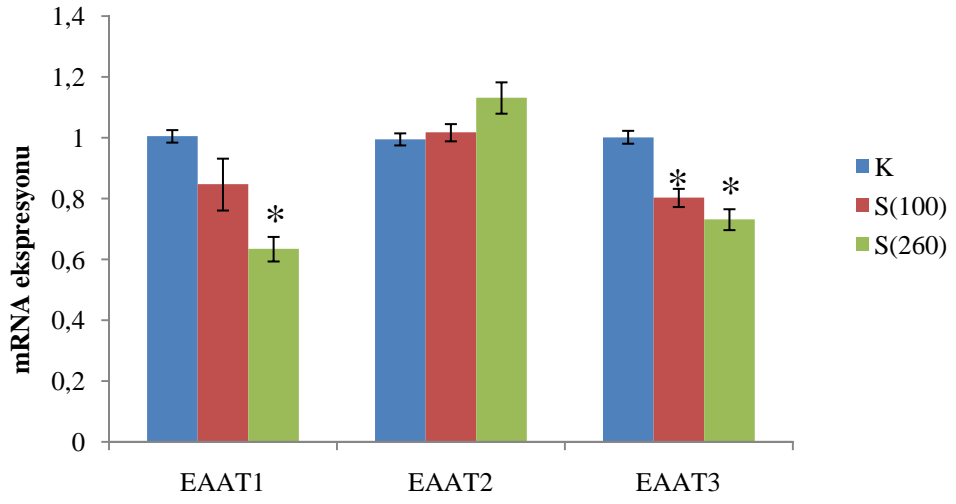
Hipokampus dokularında gerçekleştirilen VGLUT1 RT-PCR analizleri Şekil 4.7’de gösterilmiştir. VGLUT1 mRNA düzeyleri incelendiğinde gruplar arasında anlamlı bir fark olmadığı tespit edilmiştir.



Şekil 4.7. VGLUT1 düzeyinin RT-PCR analizi sonuçları (n=3, *p<0.05 kontrol grubundan fark)

4.7. EAAT1, EAAT2 ve EAAT3 Düzeylerinin RT-PCR Analizi Sonuçları

K grubu ile karşılaştırıldığında sülfitin doza bağlı olarak EAAT1 ve EAAT3 mRNA ekspresyonlarını azalttığı görülmüştür. Bununla birlikte uygulanan dozların EAAT2 gen ekspresyonlarını değiştirmediği gözlenmiştir (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. EAAT1, EAAT2 ve EAAT3 düzeylerinin RT-PCR analizi sonuçları (n=3, *p<0.05 kontrol grubundan fark)

5.TARTIŞMA

İnsanlar, metionin ve sistein gibi sülfür içeren aminoasitlerin metabolizması sırasında endojen sülfite, katkı maddesi olarak eklendiği ürünlerin tüketilmesi sonucu ise ekzojen sülfite maruz kalmaktadırlar (Woo ve ark., 2003). Katkı maddesi olarak kullanılan sülfitin yaygın tüketimini takiben ortaya çıkan yan etkilerin fark edilmesi üzerine, sülfitin dozuyla ilgili araştırmalar literatürde rapor edilmeye başlamıştır (Simon, 1986; Atkinson ve ark., 1993). Bu çalışmalardan birinde, Til ve arkadaşları 72 mg/kg/gün dozunda alınan sülfitin zararlı bir etkisinin bulunmadığını bildirmişlerdir (Til ve ark., 1972). Bu çalışmaya dayanarak WHO, 100 katlık güvenlik faktörünü de ekleyerek günlük 0,7 mg/kg sülfid dozunun zararlı etkisinin olmayacağını açıklamıştır (The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives,1974). Sülfid içeren ürünlerin tüketilme oranları ve sıklığına bağlı olarak bu dozun üzerine çıkılabileceği pek çok araştırma ile ortaya konmuş, hatta toksik etkilerinin olduğu vurgulanmıştır (Gunnison ve Jacobsen, 1987; Lester, 1995). Bu literatür bilgilerinin üzerine sülfitin doz bağımlı etkilerini araştırdığımız bir çalışmada 100 ve 260 mg/kg/gün dozlarında uygulanan sülfitin lipid peroksidasyonun bir göstergesi olan tiyobarbitirik asit ürünleri ve 4-hidroksinonenal seviyelerini arttırdığı tespit edilmiştir (Ozturk ve ark., 2011). Diğer bir çalışmamızda ise sülfitin beyin dokusunda apoptozis sürecinde rol alan kaspaz-3 enzim düzeyini ve DNA fragmentasyonunu gösteren TUNEL pozitif hücre sayısını artırarak nörodejenerasyona neden olduğu gösterilmiştir (Kencebay ve ark., 2013). Bu nedenle araştırmamızda daha önceki çalışmalarımızda kullanılan ve nörotoksik etkileri saptanan 100 ve 260 mg/kg/gün sülfid dozları sıçanlara uygulanmıştır.

Sülfitin öğrenme üzerindeki etkilerini değerlendirmek için sıçanlara radyal kollu labirent testi uygulanmış ve bu testte %80 doğruluk kriterine ulaşılan gün sayısı, WME ve RME değerleri incelenmiştir. Radyal kollu labirent testinde %80 doğruluk kriterine ulaşılan gün sayısının her iki sülfid grubunda da arttığı gösterilmiştir. Aynı zamanda kısa süreli ve uzun süreli hafızanın değerlendirildiği WME ve RME sayılarının da benzer şekilde sülfid uygulanan sıçanlarda arttığı saptanmıştır. Sülfitin öğrenme üzerine etkilerinin araştırıldığı başka bir çalışmada ise 25 mg/kg/gün dozunda 8 hafta uygulanan sülfitin %80 doğruluk kriterine

ulaşılan gün sayısını, WME, RME sayılarını arttırdığı rapor edilmiş ve bu etki sülfite bağlı kognitif fonksiyon bozukluğu olarak değerlendirilmiştir (Noorafshan ve ark., 2013). Bu bilgiler ışığında uygulanan dozlarda sülfitin öğrenme ve hafıza üzerinde olumsuz etkilerinin olduğu kanıtlanmıştır.

Açık alan testi sıçanlarda lokomotor aktiviteyi, merak ve araştırmacı davranışı analiz etmek amacıyla kullanılmaktadır. Açık alan davranışında amigdala, medial prefrontal korteks ve hipokampusun rol aldığı bilinmektedir (Olsen ve ark., 2013, Inaba ve ark., 2016). Çalışmamızda nörotoksik etkileri bilinen sülfitin, açık alan testi parametreleri olan girilen kare sayısı, ortalama hız ve kat edilen mesafeye etkisi değerlendirilmiş olup, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı gözlenmiştir. Yapılan bir çalışmada B1 vitamini eksikliğine bağlı olarak uzaysal hafızanın bozulduğu gösterilmiş ve bu bozulma hücre ölümüne daha yatkın olan hipokampusun disfonksiyonu ile ilişkilendirilmiştir. Ancak aynı çalışmada B1 vitamini eksikliğinin amigdala ve prefrontal kortekste hücre ölümüne neden olmadığı ve bu nedenle araştırmacı davranışın değerlendirildiği açık alan testi parametrelerinde herhangi bir değişiklik yaratmadığı rapor edilmiştir (Inaba ve ark., 2016). Enerji metabolizması, antioksidan savunma sistemi, hücre içi kalsiyum ve nörotransmitter regülasyonları incelendiğinde farklı beyin bölgelerinin nörodejenerasyona karşı gösterdikleri hassasiyet değişmektedir (Candelario-Jalil ve ark., 2001, Michaelis ve Bartsch, 2012). Nitekim Zhu ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada iskemiye bağlı meydana gelen dejeneratif hücre sayılarının hipokampal alanda motor kortekse oranla daha fazla olduğu gösterilmiştir. Bu sonuç hipokampusun yapısal ve biyokimyasal farklılıklardan dolayı diğer beyin bölgelerine göre nörodejenerasyona karşı daha savunmasız olduğu şeklinde değerlendirilmiştir (Zhu ve ark., 2012). Bu bilgiler doğrultusunda çalışmamızda açık alan testi parametrelerinde gruplar arasında fark olmaması sülfite bağlı gerçekleşen hipokampal disfonksiyonun, amigdala ve prefrontal kortekste gözlenmemiş olabileceği fikrini akla getirmektedir.

Öğrenme ve hafıza bozuklukları ile ilgili çalışmalarda hipokampustaki moleküler mekanizmalar ayrıntılı olarak incelenmiştir (Nakazawa ve ark., 2003; Sharma ve ark., 2010; Amos-Kroohs ve ark., 2017). Yapılan literatür taramasında, Akdoğan ve arkadaşlarının 25 mg/kg/gün dozunda sülfitin hipokampal piramidal nöron

sayılarında azalma meydana getirdiğini rapor ettikleri görülmüştür (Akdogan ve ark., 2011). Bu nedenle çalışmamızda sülfite toksisitesine bağlı meydana gelen öğrenme ve hafıza bozukluklarının mekanizmasını aydınlatılmak için öğrenme sürecinde önemli rol oynayan hipokampal glutamat ve glutamin düzeyleri mikrodiyaliz yöntemiyle değerlendirilmiştir. Mikrodiyaliz yöntemiyle diyalizat toplanması için kanül dorsal hipokampusa yerleştirilmiştir. Yapılan çalışmalarda dorsal hipokampusta oluşturulan lezyonların radyal kollu labirent ve Morris su tankı test gibi uzaysal hafızayı ölçmeye yarayan testlerin sonuçlarını olumsuz etkilediği gösterilmiştir (Bannerman ve ark., 1999; Pothuizen ve ark., 2004). Çalışmamızda kanülün dorsal hipokampusta olduğunu değerlendirmek için HE boyama yapılmış ve koordinatların dışında bulunan kanülden alınan veriler kullanılmamıştır. Toplanan diyalizatlarda ölçülen glutamat ve glutamin konsantrasyonlarının sülfite verilen gruplarda 4,5-5 kat gibi çarpıcı oranlarda azaldığı saptanmıştır. Ekstraselüler sıvıda glutamat konsantrasyonunun azalması veziküler salınımın bozulmasından veya glutamat üretiminin azalmasından kaynaklanıyor olabilir. Glutamat, glutaminaz enzimi aracılığıyla glutaminden ve GDH enzimi aracılığıyla α -ketoglutarattan sentezlenmektedir (Hogstad ve ark., 1988; Zaganas ve Plaitakis, 2002). Glutamat dehidrogenazın katalizlediği reaksiyonun çift yönlü olduğu ve hücrede enerji düzeyinin düşmesiyle glutamatın yıkılarak α -ketoglutarat sentezlendiği bilinmektedir (Zaganas ve Plaitakis, 2002). Salman ve arkadaşları sülfite mitokondrial hasara bağlı ATP deplesyonuna aracılık ettiğini rapor etmişlerdir (Salman ve ark., 2002). Yapılan bir çalışmada hipokampal lezyon oluşturulan sıçanlarda glutaminaz aktivitesinin azaldığı gösterilmiş olup, bu azalma, oluşturulan lezyona bağlı bozulan enerji metabolizması ve nöronal ölüm ile ilişkilendirilmiştir (Ramonet ve ark., 2004). Ekibimiz tarafından yapılan bir çalışmada da sülfite glutaminaz düzeyinde azalmaya sebep olduğu gösterilmiştir (Yayın aşamasında). Dolayısıyla ekstraselüler glutamat konsantrasyonundaki azalma sülfite neden olduğu ATP deplesyonuyla ve/veya glutaminaz enzim düzeyindeki azalmayla ilişkili olabilir.

Hücre dışı glutamat, glialar tarafından geri alınarak GS aracılığıyla glutamine dönüştürülmektedir (Derouiche ve Frotscher, 1991). Yapılan bir nörotoksite çalışmasında hipokampal alanda toksik ajan aracılı meydana gelen dejenerasyonda GS aktivitesinde azalma olduğu gösterilmiştir (Ze ve ark., 2016).

Parmeggiani ve arkadaşları tarafından serebral korteks üzerinde yapılan in vitro bir çalışmada sülfitin GS aktivitesini inhibe ettiği rapor edilmiştir (Parmeggiani ve ark., 2015). Ekibimiz, 25 mg/kg/gün dozundaki kronik sülfid maruziyetinin hipokampal dokudaki GS protein düzeyini azalttığını saptamıştır (Yayın aşamasında). Bu bilgiler ışığında çalışmamızda azalan ekstraselüler glutamin konsantrasyonunun GS enzim aktivitesinde ve/veya düzeyindeki azalma nedeniyle ortaya çıktığı düşünülmüştür.

Presinaptik sinir terminallerinde sentezlenen glutamat, VGLUT aracılığıyla veziküllere alınmakta ve depolanmaktadır (Fremeau ve ark., 2004). Hipokampus dokusunda yüksek oranda eksprese edilen VGLUT1 proteininin öğrenme ve hafıza sürecinde önemli rolü olduğu yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır (Cheng ve ark., 2011; Liraz ve ark., 2013). Nitekim Liraz ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada AH'ye bağlı oluşan öğrenme ve hafıza bozukluğunda VGLUT1 protein ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir (Liraz ve ark., 2013). Çalışmamızda sülfitin hipokampal hücrelerde bulunan VGLUT1 mRNA düzeyine olan etkisi incelenmiş ve gruplar arasında bir fark olmadığı tespit edilmiştir. Bu durum, sülfitin mRNA-protein ekspresyonu arasındaki mekanizmayı etkilemiş olabileceği fikrini akla getirmektedir. Veziküler glutamat taşıyıcı-1 mRNA düzeyinin değişmemesine rağmen sinaptik aralıktaki glutamat konsantrasyonunun azalması, vezikül salınımının bozulduğu fikrini güçlendirmektedir. Aynı zamanda hücre içi Ca^{+2} düzeyi ve vezikülün membrana bağlanması aşamasında rol alan proteinlerin bu mekanizmada etkili olabileceği düşünülmektedir. İleriki çalışmalarımızda da hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonunun ve vezikül ekzositozisinde rol alan (t-SNARE ve v-SNARE) proteinlerin düzeylerinin ölçülmesi hedeflenmektedir.

Sinaptik alandaki yüksek glutamat konsantrasyonu, postsinaptik glutamat reseptörlerinin aşırı uyarılmasıyla nöronal hücre ölümüne neden olmaktadır. Eksitator amino asit taşıyıcılar fazla glutamayı geri alarak sinaptik aralıktaki glutamat konsantrasyonunu regüle etmektedirler (Danbolt, 2001; Maragakis ve Rothstein, 2004). Glutamaterjik sinapslardaki glutamat taşıyıcılarının gen ekspresyonu bu proteinlerin yoğunluğunu belirlemekte ve sinaptik iletimi kontrol etmektedir (Danbolt, 2001). Bu nedenle çalışmamızda sülfite bağlı öğrenme ve hafıza bozukluklarının hipokampusta bulunduğu bilinen EAAT1, EAAT2 ve

EAAT3 mRNA ekspresyonlarıyla ilişkisi değerlendirilmiştir. Çalışmamızda toksik dozda uygulanan sülfidin EAAT2 mRNA düzeyini değiştirmediği fakat EAAT1 ve EAAT3 mRNA seviyesini azalttığı gösterilmiştir. Yapılan bir çalışmada hipokampal lezyon oluşturulan sıçanlarda EAAT2 seviyesinin değişmediği, fakat EAAT3 mRNA düzeyinde azalma olduğu rapor edilmiştir (Simantov ve ark., 1999). Diğer bir nörotoksisite çalışmasında ise 4 µM/kg metilmerkur (MeHg)'nin EAAT1 mRNA düzeyini azalttığı fakat aynı dozda EAAT2 mRNA düzeyini değiştirmediği gösterilmiş olup, bu azalma toksik ajanın meydana getirdiği reaktif ürünler ile ilişkilendirilmiştir (Yang ve ark., 2015). Bizim sonuçlarımızda bu verilerle paralellik göstermektedir. Hala nedeni bilinmemesine rağmen, fizyolojik koşullarda glialarda gözlenen EAAT2 mRNA ekspresyonunun patolojik durumlarda gliaların yanı sıra nöronlarda da gerçekteiği gösterilmiştir (Danbolt, 2001). Bu tez çalışmasında da EAAT2 mRNA düzeyinin değişmemesinin sebebi, nöronların sülfid toksisitesine bağlı oluşan nörodejenerasyona cevaben EAAT2 gen ekspresyonuna katkı sağlaması olabilir. mRNA ekspresyonundaki değişiklikler daima protein ekspresyonundaki değişiklikler ile örtüşmemektedir. Dolayısıyla mRNA'ları incelenen taşıyıcıların protein ekspresyonlarının da araştırılması gerektiği düşünölmektedir.

Sonuç olarak çalışmamızda gıdalar yoluyla günlük alınabilecek değişik dozlardaki sülfidin öğrenme ve hafızayı bozduğu, bu bozulmanın önemli bir nörotransmitter olan glutamatın geri alınımı ve salınımı ile ilişkili olabileceği gösterilmiştir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

1) Diyetle alınan farklı dozlardaki sülfidin öğrenme ve hafıza üzerinde olumsuz etkilerinin olduğu gösterilmiştir.

2) Sülfid verilen gruplarda saptanan öğrenme ve hafıza bozukluğunun ekstraselüler glutamat ve glutamin düzeylerindeki azalma ile ilişkili olduğu tespit edilmiş olup, bu azalmanın glutamat sentezlenmesiyle ilişkili olabileceği düşünülmektedir.

3) Glutamat taşıyıcıları mRNA düzeylerindeki azalma, sülfid toksisitesinin gen ekspresyon mekanizması üzerine göstermiş olduğu olumsuz etkiden kaynaklanıyor olabilir.

KAYNAKLAR

Akdogan I, Kocamaz E, Kucukatay V, Yonguc NG, Ozdemir MB, Murk W. "Hippocampal Neuron Number Loss in Rats Exposed to Ingested Sulfite" *Toxicol Ind Health*, 2011; 27: 771-778.

Aledo JC, Gomez-Fabre PM, Olalla L, Marquez J. "Identification of Two Human Glutaminase Loci and Tissue-Specific Expression of the Two Related Genes" *Mamm Genome*, 2000; 11: 1107-1110.

Amaral D, Lavenex P: "Chapter 3. Hippocampal Neuroanatomy". In: The Hippocampus Book. Eds. Andersen P, Morris R, Amaral D, Bliss T, O'Keefe J, Oxford University Press, New York, 2006.

Amos-Kroohs RM, Davenport LL, Atanasova N, Abdulla ZI, Skelton MR, Vorhees CV, Williams MT. "Developmental Manganese Neurotoxicity in Rats: Cognitive Deficits in Allocentric and Egocentric Learning and Memory" *Neurotoxicol Teratol*, 2017; 59: 16-26.

Anderson CM, Swanson RA. "Astrocyte Glutamate Transport: Review of Properties, Regulation, and Physiological Functions" *Glia*, 2000; 32: 1-14.

Anneken JH, Cunningham JI, Collins SA, Yamamoto BK, Gudelsky GA. "Mdma Increases Glutamate Release and Reduces Parvalbumin-Positive Gabaergic Cells in the Dorsal Hippocampus of the Rat: Role of Cyclooxygenase" *J Neuroimmune Pharmacol*, 2013; 8: 58-65.

Armano S, Coco S, Bacci A, Pravettoni E, Schenk U, Verderio C, Varoqui H, Erickson JD, Matteoli M. "Localization and Functional Relevance of System a Neutral Amino Acid Transporters in Cultured Hippocampal Neurons" *J Biol Chem*, 2002; 277: 10467-10473.

Arriza JL, Eliasof S, Kavanaugh MP, Amara SG. "Excitatory Amino Acid Transporter 5, a Retinal Glutamate Transporter Coupled to a Chloride Conductance" *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997; 94: 4155-4160.

Atkinson DA, Sim TC, Grant JA. "Sodium Metabisulfite and So₂ Release - an under-Recognized Hazard among Shrimp Fishermen" *Ann Allergy*, 1993; 71: 563-566.

Bailey S, Rapson T, Johnson-Winters K, Astashkin AV, Enemark JH, Kappler U. "Molecular Basis for Enzymatic Sulfite Oxidation How Three Conserved Active Site Residues Shape Enzyme Activity" *Journal of Biological Chemistry*, 2009; 284: 2053-2063.

Balcar VJ, Johnston GA. "The Structural Specificity of the High Affinity Uptake of L-Glutamate and L-Aspartate by Rat Brain Slices" *J Neurochem*, 1972; 19: 2657-2666.

Bannai S. "Exchange of Cystine and Glutamate across Plasma Membrane of Human Fibroblasts" *J Biol Chem*, 1986; 261: 2256-2263.

Bannerman DM, Sprengel R, Sanderson DJ, Mchugh SB, Rawlins JN, Monyer H, Seeburg PH. "Hippocampal Synaptic Plasticity, Spatial Memory and Anxiety" *Nat Rev Neurosci*, 2014; 15: 181-192.

Bannerman DM, Yee BK, Good MA, Heupel MJ, Iversen SD, Rawlins JN. "Double Dissociation of Function within the Hippocampus: A Comparison of Dorsal, Ventral, and Complete Hippocampal Cytotoxic Lesions" *Behav Neurosci*, 1999; 113: 1170-1188.

Barnes CA. "Memory Deficits Associated with Senescence: A Neurophysiological and Behavioral Study in the Rat" *J Comp Physiol Psychol*, 1979; 93: 74-104.

Bartsch T, Butler C. "Transient Amnesic Syndromes" *Nat Rev Neurol*, 2013; 9: 86-97.

Batchelor AM, Madge DJ, Garthwaite J. "Synaptic Activation of Metabotropic Glutamate Receptors in the Parallel Fibre-Purkinje Cell Pathway in Rat Cerebellar Slices" *Neuroscience*, 1994; 63: 911-915.

Benquet P, Gee CE, Gerber U. "Two Distinct Signaling Pathways Upregulate Nmda Receptor Responses Via Two Distinct Metabotropic Glutamate Receptor Subtypes" *J Neurosci*, 2002; 22: 9679-9686.

Bergles DE, Diamond JS, Jahr CE. "Clearance of Glutamate inside the Synapse and Beyond" *Curr Opin Neurobiol*, 1999; 9: 293-298.

Berry A, Tomidokoro Y, Ghiso J, Thornton J. "Human Chorionic Gonadotropin (a Luteinizing Hormone Homologue) Decreases Spatial Memory and Increases Brain Amyloid-Beta Levels in Female Rats" *Horm Behav*, 2008; 54: 143-152.

Bliss TV, Collingridge GL. "A Synaptic Model of Memory: Long-Term Potentiation in the Hippocampus" *Nature*, 1993; 361: 31-39.

Bliss TV, Lomo T. "Long-Lasting Potentiation of Synaptic Transmission in the Dentate Area of the Anaesthetized Rabbit Following Stimulation of the Perforant Path" *J Physiol*, 1973; 232: 331-356.

Boulland JL, Osen KK, Levy LM, Danbolt NC, Edwards RH, Storm-Mathisen J, Chaudhry FA. "Cell-Specific Expression of the Glutamine Transporter Sn1 Suggests Differences in Dependence on the Glutamine Cycle" *Eur J Neurosci*, 2002; 15: 1615-1631.

Boulter J, Hollmann M, O'shea-Greenfield A, Hartley M, Deneris E, Maron C, Heinemann S. "Molecular Cloning and Functional Expression of Glutamate Receptor Subunit Genes" *Science*, 1990; 249: 1033-1037.

Broer S. "The Slc38 Family of Sodium-Amino Acid Co-Transporters" *Pflugers Arch*, 2014; 466: 155-172.

Broer S, Brookes N. "Transfer of Glutamine between Astrocytes and Neurons" *J Neurochem*, 2001; 77: 705-719.

Cabre F, Marin C, Cascante M, Canela EI. "Occurrence and Comparison of Sulfite Oxidase Activity in Mammalian Tissues" *Biochem Med Metab Biol*, 1990; 43: 159-162.

Candelario-Jalil E, Al-Dalain SM, Castillo R, Martínez G, Fernández OS. "Selective vulnerability to kainate-induced oxidative damage in different rat brain regions. " *J Appl Toxicol*. 2001; 5: 403-7.

Cassano T, Serviddio G, Gaetani S, Romano A, Dipasquale P, Cianci S, Bellanti F, Laconca L, Romano AD, Padalino I, Laferla FM, Nicoletti F, Cuomo V, Vendemiale G. "Glutamatergic Alterations and Mitochondrial Impairment in a Murine Model of Alzheimer Disease" *Neurobiol Aging*, 2012; 33: 1121 e1121-1112.

Chaudhry FA, Lehre KP, Van Lookeren Campagne M, Ottersen OP, Danbolt NC, Storm-Mathisen J. "Glutamate Transporters in Glial Plasma Membranes: Highly Differentiated Localizations Revealed by Quantitative Ultrastructural Immunocytochemistry" *Neuron*, 1995; 15: 711-720.

Cheng XR, Yang Y, Zhou WX, Zhang YX. "Expression of Vgluts Contributes to Degeneration and Acquisition of Learning and Memory" *Neurobiol Learn Mem*, 2011; 95: 361-375.

Christensen JK, Paternain AV, Selak S, Ahring PK, Lerma J. "A Mosaic of Functional Kainate Receptors in Hippocampal Interneurons" *J Neurosci*, 2004; 24: 8986-8993.

Cohen HJ, Drew RT, Johnson JL, Rajagopalan KV. "Molecular basis of the biological function of molybdenum: the relationship between sulfite oxidase and the acute toxicity of bisulfite and SO₂. " *Proc. Natl. Acad. Sci*. 1973; 70(12): 3655-3659.

Copits BA, Robbins JS, Frausto S, Swanson GT. "Synaptic Targeting and Functional Modulation of Gluk1 Kainate Receptors by the Auxiliary Neuropilin and Tolloid-Like (Neto) Proteins" *J Neurosci*, 2011; 31: 7334-7340.

Cubelos B, Gonzalez-Gonzalez IM, Gimenez C, Zafra F. "Amino Acid Transporter Snat5 Localizes to Glial Cells in the Rat Brain" *Glia*, 2005; 49: 230-244.

Daikhin Y, Yudkoff M. "Compartmentation of Brain Glutamate Metabolism in Neurons and Glia" *J Nutr*, 2000; 130: 1026S-1031S.

Danbolt NC. "Glutamate Uptake" *Prog Neurobiol*, 2001; 65: 1-105.

Darstein M, Petralia RS, Swanson GT, Wenthold RJ, Heinemann SF. "Distribution of Kainate Receptor Subunits at Hippocampal Mossy Fiber Synapses" *J Neurosci*, 2003; 23: 8013-8019.

Deitmer JW, Broer A, Broer S. "Glutamine Efflux from Astrocytes Is Mediated by Multiple Pathways" *J Neurochem*, 2003; 87: 127-135.

Denenberg VH. "Open-Field Behavior in the Rat: What Does It Mean?" *Ann N Y Acad Sci*, 1969; 159: 852-859.

Derouiche A, Frotscher M. "Astroglial Processes around Identified Glutamatergic Synapses Contain Glutamine Synthetase: Evidence for Transmitter Degradation" *Brain Res*, 1991; 552: 346-350.

Dizdaroglu M, Jaruga P. "Mechanisms of Free Radical-Induced Damage to DNA" *Free Radic Res*, 2012; 46: 382-419.

Dubreuil D, Tixier C, Dutrieux G, Edeline JM. "Does the Radial Arm Maze Necessarily Test Spatial Memory?" *Neurobiol Learn Mem*, 2003; 79: 109-117.

Duerson K, Woltjer RL, Mookherjee P, Leverenz JB, Montine TJ, Bird TD, Pow DV, Rauen T, Cook DG. "Detergent-Insoluble Eaac1/Eaat3 Aberrantly Accumulates in Hippocampal Neurons of Alzheimer's Disease Patients" *Brain Pathol*, 2009; 19: 267-278.

Eichenbaum H, Cohen NJ. *From Conditioning to Conscious Recollection: Memory Systems of the Brain*. Oxford University Press, New York, 2001.

European Food Safety Authority (EFSA). Call for food additives usage level and/or concentration data in food and beverages intended for human consumption. 2013. <http://www.efsa.europa.eu/en/data/call/130327.htm>

Erecinska M, Silver IA. "Metabolism and Role of Glutamate in Mammalian Brain" *Prog Neurobiol*, 1990; 35: 245-296.

Fairman WA, Vandenberg RJ, Arriza JL, Kavanaugh MP, Amara SG. "An Excitatory Amino-Acid Transporter with Properties of a Ligand-Gated Chloride Channel" *Nature*, 1995; 375: 599-603.

Flatman JA, Schwindt PC, Crill WE. "The Induction and Modification of Voltage-Sensitive Responses in Cat Neocortical Neurons by N-Methyl-D-Aspartate" *Brain Res*, 1986; 363: 62-77.

Freneau RT, Jr., Burman J, Qureshi T, Tran CH, Proctor J, Johnson J, Zhang H, Sulzer D, Copenhagen DR, Storm-Mathisen J, Reimer RJ, Chaudhry FA, Edwards RH. "The Identification of Vesicular Glutamate Transporter 3 Suggests Novel Modes of Signaling by Glutamate" *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002; 99: 14488-14493.

Freneau RT, Jr., Kam K, Qureshi T, Johnson J, Copenhagen DR, Storm-Mathisen J, Chaudhry FA, Nicoll RA, Edwards RH. "Vesicular Glutamate Transporters 1

and 2 Target to Functionally Distinct Synaptic Release Sites" *Science*, 2004; 304: 1815-1819.

Fridovich I, Handler P. "Detection of Free Radicals Generated During Enzymic Oxidations by the Initiation of Sulfite Oxidation" *J Biol Chem*, 1961; 236: 1836-1840.

Gerlai R. "A New Continuous Alternation Task in T-Maze Detects Hippocampal Dysfunction in Mice. A Strain Comparison and Lesion Study" *Behav Brain Res*, 1998; 95: 91-101.

Gokcek-Sarac C, Adali O, Jakubowska-Dogru E. "Hippocampal Levels of Chat, Pka, Phospho-Pka and Phospho-Camkiialpha but Not Camkiialpha Positively Correlate with Spatial Learning Skills in Rats" *Neurosci Lett*, 2013; 545: 112-116.

Gunnison AF, Dulak L, Chiang G, Zaccardi J, Farruggella TJ. "A Sulfite-Oxidase-Deficient Rat Model - Sub-Chronic Toxicology" *Food Cosmet Toxicol*, 1981; 19: 221-232.

Gunnison AF, Jacobsen DW. "Sulfite Hypersensitivity - a Critical-Review" *Crc Critical Reviews in Toxicology*, 1987; 17: 185-214.

Gutteridge JMC, Halliwell B. "The Measurement and Mechanism of Lipid-Peroxidation in Biological-Systems" *Trends in Biochemical Sciences*, 1990; 15: 129-135.

Hall JE. "Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology". 13th ed. Elsevier, Philadelphia, 2016.

Hagglund MG, Sreedharan S, Nilsson VC, Shaik JH, Almkvist IM, Backlin S, Wrangé O, Fredriksson R. "Identification of Slc38a7 (Snat7) Protein as a Glutamine Transporter Expressed in Neurons" *J Biol Chem*, 2011; 286: 20500-20511.

Hamdani El H, Gudbrandsen M, Bjorkmo M, Chaudhry FA. "The System N Transporter Sn2 Doubles as a Transmitter Precursor Furnisher and a Potential Regulator of Nmda Receptors" *Glia*, 2012; 60: 1671-1683.

Harman D. "Aging: A Theory Based on Free Radical and Radiation Chemistry" *J Gerontol*, 1956; 11: 298-300.

Haugeto O, Ullensvang K, Levy LM, Chaudhry FA, Honore T, Nielsen M, Lehre KP, Danbolt NC. "Brain Glutamate Transporter Proteins Form Homomultimers" *J Biol Chem*, 1996; 271: 27715-27722.

Hayatsu H, Miller RC, Jr., "The Cleavage of DNA by the Oxygen-Dependent Reaction of Bisulfite" *Biochem Biophys Res Commun*, 1972; 46: 120-124.

Headley PM, Grillner S. "Excitatory Amino Acids and Synaptic Transmission: The Evidence for a Physiological Function" *Trends Pharmacol Sci*, 1990; 11: 205-211.

Hebb DO. *The Organization of Behavior*. Wiley, New York, 1949.

Heo S, Jung G, Beuk T, Hoyer H, Lubec G. "Hippocampal Glutamate Transporter 1 (Glt-1) Complex Levels Are Paralleling Memory Training in the Multiple T-Maze in C57bl/6j Mice" *Brain Struct Funct*, 2012; 217: 363-378.

Herzog E, Gilchrist J, Gras C, Muzerelle A, Ravassard P, Giros B, Gaspar P, El Mestikawy S. "Localization of Vglut3, the Vesicular Glutamate Transporter Type 3, in the Rat Brain" *Neuroscience*, 2004; 123: 983-1002.

Himi T, Ikeda M, Yasuhara T, Nishida M, Morita I. "Role of Neuronal Glutamate Transporter in the Cysteine Uptake and Intracellular Glutathione Levels in Cultured Cortical Neurons" *J Neural Transm (Vienna)*, 2003; 110: 1337-1348.

Hisano S, Sawada K, Kawano M, Kanemoto M, Xiong G, Mogi K, Sakata-Haga H, Takeda J, Fukui Y, Nogami H. "Expression of Inorganic Phosphate/Vesicular Glutamate Transporters (Bnpi/Vglut1 and Dnpi/Vglut2) in the Cerebellum and Precerebellar Nuclei of the Rat" *Brain Res Mol Brain Res*, 2002; 107: 23-31.

Hogstad S, Svenneby G, Torgner IA, Kvamme E, Hertz L, Schousboe A. "Glutaminase in Neurons and Astrocytes Cultured from Mouse Brain: Kinetic Properties and Effects of Phosphate, Glutamate, and Ammonia" *Neurochem Res*, 1988; 13: 383-388.

Holmseth S, Dehnes Y, Huang YH, Follin-Arbelet VV, Grutle NJ, Mylonakou MN, Plachez C, Zhou Y, Furness DN, Bergles DE, Lehre KP, Danbolt NC. "The Density of Eaac1 (Eaat3) Glutamate Transporters Expressed by Neurons in the Mammalian Cns" *J Neurosci*, 2012; 32: 6000-6013.

Holscher C. "Stress Impairs Performance in Spatial Water Maze Learning Tasks" *Behav Brain Res*, 1999; 100: 225-235.

Hui JY, Beery JT, Higley NA, Taylor SL. "Comparative Subchronic Oral Toxicity of Sulphite and Acetaldehyde Hydroxysulphonate in Rats" *Food and Chemical Toxicology*, 1989; 27: 349-359.

Huie RE, Neta P. "Oxidation of Ascorbate and a Tocopherol Analogue by the Sulfite-Derived Radicals SO_3^- and SO_5^- " *Chem Biol Interact*, 1985; 53: 233-238.

Inaba H, Kishimoto T, Oishi S, Nagata K, Hasegawa S, Watanabe T and Kida S "Vitamin B1-deficient mice show impairment of hippocampus-dependent memory formation and loss of hippocampal neurons and dendritic spines: potential microendophenotypes of Wernicke-Korsakoff syndrome" *Biosci Biotechnol Biochem*, 2016; 80: 2425-2436.

Ingram DK, Spangler EL, Iijima S, Ikari H, Kuo H, Greig NH, London ED. "Rodent Models of Memory Dysfunction in Alzheimer's Disease and Normal

Aging: Moving Beyond the Cholinergic Hypothesis" *Life Sci*, 1994; 55: 2037-2049.

Jabaudon D, Shimamoto K, Yasuda-Kamatani Y, Scanziani M, Gahwiler BH, Gerber U. "Inhibition of Uptake Unmasks Rapid Extracellular Turnover of Glutamate of Nonvesicular Origin" *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999; 96: 8733-8738.

Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Evaluation of certain food additives: fifty-first report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. World Health Organization; 2000

Kanai Y, Hediger MA. "Primary Structure and Functional Characterization of a High-Affinity Glutamate Transporter" *Nature*, 1992; 360: 467-471.

Kandel E, Schwartz J, Jessell TM, Siegelbaum SA, Hudspeth AJ. Principles of Neural Science, 5th ed. McGraw-Hill Companies, New York, 2013.

Kaneko T, Urade Y, Watanabe Y, Mizuno N. "Production, Characterization, and Immunohistochemical Application of Monoclonal Antibodies to Glutaminase Purified from Rat Brain" *J Neurosci*, 1987; 7: 302-309.

Karoui H, Hogg N, Frejaville C, Tordo P, Kalyanaraman B. "Characterization of Sulfur-Centered Radical Intermediates Formed During the Oxidation of Thiols and Sulfite by Peroxynitrite. ESR-Spin Trapping and Oxygen Uptake Studies" *J Biol Chem*, 1996; 271: 6000-6009.

Kencebay C, Derin N, Ozsoy O, Kipmen-Korgun D, Tanriover G, Ozturk N, Basaranlar G, Yargicoglu-Akkiraz P, Sozen B, Agar A. "Merit of Quinacrine in the Decrease of Ingested Sulfite-Induced Toxic Action in Rat Brain" *Food and Chemical Toxicology*, 2013; 52: 129-136.

Klar R, Walker AG, Ghose D, Grueter BA, Engers DW, Hopkins CR, Lindsley CW, Xiang Z, Conn PJ, Niswender CM. "Activation of Metabotropic Glutamate Receptor 7 Is Required for Induction of Long-Term Potentiation at Sc-Ca1 Synapses in the Hippocampus" *J Neurosci*, 2015; 35: 7600-7615.

Koeppen B. and Stanton B. "Berne & Levy Physiology. 6 th. Edition, 2008.

Lehre KP, Danbolt NC. "The Number of Glutamate Transporter Subtype Molecules at Glutamatergic Synapses: Chemical and Stereological Quantification in Young Adult Rat Brain" *J Neurosci*, 1998; 18: 8751-8757.

Lerma J. "Net(O) Excitement for Kainate Receptors" *Nat Neurosci*, 2011; 14: 808-810.

Lester MR. "Sulfite Sensitivity: Significance in Human Health" *J Am Coll Nutr*, 1995; 14: 229-232.

Li S, Mallory M, Alford M, Tanaka S, Masliah E. "Glutamate Transporter Alterations in Alzheimer Disease Are Possibly Associated with Abnormal App Expression" *J Neuropathol Exp Neurol*, 1997; 56: 901-911.

Liraz O, Boehm-Cagan A, Michaelson DM. "ApoE4 Induces Abeta42, Tau, and Neuronal Pathology in the Hippocampus of Young Targeted Replacement ApoE4 Mice" *Mol Neurodegener*, 2013; 8: 16.

Logan WJ, Snyder SH. "High Affinity Uptake Systems for Glycine, Glutamic and Aspartic Acids in Synaptosomes of Rat Central Nervous Tissues" *Brain Res*, 1972; 42: 413-431.

Lutgen V, Resch J, Qualmann K, Raddatz NJ, Panhans C, Olander EM, Kong L, Choi S, Mantsch JR, Baker DA. "Behavioral Assessment of Acute Inhibition of System Xc (-) in Rats" *Psychopharmacology (Berl)*, 2014; 231: 4637-4647.

Maragakis NJ, Rothstein JD. "Glutamate Transporters: Animal Models to Neurologic Disease" *Neurobiol Dis*, 2004; 15: 461-473.

Marquez J, Cardona C, Campos-Sandoval JA, Penalver A, Tosina M, Mates JM, Martin-Rufian M. "Mammalian Glutaminase Isozymes in Brain" *Metab Brain Dis*, 2013; 28: 133-137.

Marquez J, De La Oliva AR, Mates JM, Segura JA, Alonso FJ. "Glutaminase: A Multifaceted Protein Not Only Involved in Generating Glutamate" *Neurochem Int*, 2006; 48: 465-471.

Martin LJ, Blackstone CD, Levey AI, Huganir RL, Price DL. "Ampa Glutamate Receptor Subunits Are Differentially Distributed in Rat Brain" *Neuroscience*, 1993; 53: 327-358.

Martin LJ, Brambrink AM, Lehmann C, Portera-Cailliau C, Koehler R, Rothstein J, Traystman RJ. "Hypoxia-Ischemia Causes Abnormalities in Glutamate Transporters and Death of Astroglia and Neurons in Newborn Striatum" *Ann Neurol*, 1997; 42: 335-348.

Matsuda K, Fletcher M, Kamiya Y, Yuzaki M. "Specific Assembly with the Nmda Receptor 3b Subunit Controls Surface Expression and Calcium Permeability of Nmda Receptors" *J Neurosci*, 2003; 23: 10064-10073.

Mavrothalassitis G, Tzimagiorgis G, Mitsialis A, Zannis V, Plaitakis A, Papamatheakis J, Moschonas N. "Isolation and Characterization of Cdna Clones Encoding Human Liver Glutamate Dehydrogenase: Evidence for a Small Gene Family" *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1988; 85: 3494-3498.

Mcdonald JW, Johnston MV. "Pharmacology of N-Methyl-D-Aspartate-Induced Brain Injury in an in Vivo Perinatal Rat Model" *Synapse*, 1990; 6: 179-188.

Meng Z, Qin G, Zhang B. "DNA Damage in Mice Treated with Sulfur Dioxide by Inhalation" *Environ Mol Mutagen*, 2005; 46: 150-155.

Meng Z, Qin G, Zhang B, Geng H, Bai Q, Bai W, Liu C. "Oxidative Damage of Sulfur Dioxide Inhalation on Lungs and Hearts of Mice" *Environmental Research*, 2003; 93: 285-292.

Meng Z, Qin G, Zhang B, Zhang J. "Inhalation of Sulfur Dioxide on the DNA Damage of Brain Cells in Mice" *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi*, 2002; 36: 370-373.

Menzel DB, Keller DA, Leung KH. "Covalent Reactions in the Toxicity of SO₂ and Sulfite" *Adv Exp Med Biol*, 1986; 197: 477-492.

Michaelidis TM, Tzimagiorgis G, Moschonas NK, Papamatheakis J. "The Human Glutamate Dehydrogenase Gene Family: Gene Organization and Structural Characterization" *Genomics*, 1993; 16: 150-160.

Michaelis EK, Bartsch T. *The Clinical Neurobiology of the Hippocampus*, 1st ed. Oxford University Press, Oxford, 2012.

Miura K, Ishii T, Sugita Y, Bannai S. "Cystine Uptake and Glutathione Level in Endothelial Cells Exposed to Oxidative Stress" *Am J Physiol*, 1992; 262: C50-58.

Moriwaki Y, Yamamoto T, Higashino K. "Distribution and Pathophysiologic Role of Molybdenum-Containing Enzymes" *Histol Histopathol*, 1997; 12: 513-524.

Morris RGM. "Spatial Localization Does Not Require the Presence of Local Cues" *Learning and Motivation*, 1981; 12: 239-260.

Moser E, Moser MB. "Mapping Your Every Move" *Cerebrum*, 2014; 2014: 4.

Mottley C, Mason RP. "Sulfate Anion Free Radical Formation by the Peroxidation of (Bi)Sulfite and Its Reaction with Hydroxyl Radical Scavengers" *Arch Biochem Biophys*, 1988; 267: 681-689.

Mottley C, Mason RP, Chignell CF, Sivarajah K, Eling TE. "The Formation of Sulfur Trioxide Radical Anion During the Prostaglandin Hydroperoxidase-Catalyzed Oxidation of Bisulfite (Hydrated Sulfur Dioxide)" *J Biol Chem*, 1982; 257: 5050-5055.

Nakazawa K, Sun LD, Quirk MC, Rondi-Reig L, Wilson MA, Tonegawa S. "Hippocampal Ca_v3 NMDA Receptors Are Crucial for Memory Acquisition of One-Time Experience" *Neuron*, 2003; 38: 305-315.

Neta P, Huie RE. "Free-Radical Chemistry of Sulfite" *Environ Health Perspect*, 1985; 64: 209-217.

Nguyen PV, Woo NH. "Regulation of Hippocampal Synaptic Plasticity by Cyclic Amp-Dependent Protein Kinases" *Prog Neurobiol*, 2003; 71: 401-437.

Noorafshan A, Asadi-Golshan R, Karbalay-Doust S, Abdollahifar MA, Rashidiani-Rashidabadi A. "Curcumin, the Main Part of Turmeric, Prevents

Learning and Memory Changes Induced by Sodium Metabisulfite, a Preservative Agent, in Rats" *Exp Neurobiol*, 2013; 22: 23-30.

Obaru K, Tsuzuki T, Setoyama C, Shimada K. "Structural Organization of the Mouse Aspartate Aminotransferase Isoenzyme Genes. Introns Antedate the Divergence of Cytosolic and Mitochondrial Isoenzyme Genes" *J Mol Biol*, 1988; 200: 13-22.

Ohtsuka Y, Kondo T, Kawakami Y. "Oxidative Stresses Induced the Cystine Transport Activity in Human Erythrocytes" *Biochem Biophys Res Commun*, 1988; 155: 160-166.

Olalla L, Gutierrez A, Campos JA, Khan ZU, Alonso FJ, Segura JA, Marquez J, Aledo JC. "Nuclear Localization of L-Type Glutaminase in Mammalian Brain" *J Biol Chem*, 2002; 277: 38939-38944.

Olsen RH, Johnson LA, Zuloaga DG, Limoli CL, Raber J. "Enhanced hippocampus-dependent memory and reduced anxiety in mice over-expressing human catalase in mitochondria" *J Neurochem*, 2013; 2: 303-13.

Olton DS, Samuelson RJ. "Remembrance of Places Passed - Spatial Memory in Rats" *Journal of Experimental Psychology-Animal Behavior Processes*, 1976; 2: 97-116.

Oppedisano F, Pochini L, Galluccio M, Indiveri C. "The Glutamine/Amino Acid Transporter (Asct2) Reconstituted in Liposomes: Transport Mechanism, Regulation by Atp and Characterization of the Glutamine/Glutamate Antiport" *Biochim Biophys Acta*, 2007; 1768: 291-298.

O'Keefe J, Dostrovsky J. "The Hippocampus as a Spatial Map. Preliminary Evidence from Unit Activity in the Freely-Moving Rat" *Brain Res*, 1971; 34: 171-175.

O'Keefe J, Nadel L. *The Hippocampus as a Cognitive Map*. Clarendon Press, Oxford, 1978.

Ozawa S, Kamiya H, Tsuzuki K. "Glutamate Receptors in the Mammalian Central Nervous System" *Prog Neurobiol*, 1998; 54: 581-618.

Ozsoy O, Hacioglu G, Savcioglu F, Kucukatay V, Yargicoglu P, Agar A. "The Effect of Sodium Metabisulphite on Active Avoidance Performance in Hypercholesterolemic Rats" *Environ Toxicol*, 2012; 27: 453-460.

Ozturk N, Yargicoglu P, Derin N, Akpinar D, Agar A, Aslan M. "Dose-Dependent Effect of Nutritional Sulfite Intake on Visual Evoked Potentials and Lipid Peroxidation" *Neurotoxicol Teratol*, 2011; 33: 244-254.

Palmada M, Centelles JJ. "Excitatory Amino Acid Neurotransmission. Pathways for Metabolism, Storage and Reuptake of Glutamate in Brain" *Front Biosci*, 1998; 3: d701-718.

Palmer AM, Procter AW, Stratmann GC, Bowen DM. "Excitatory Amino Acid-Releasing and Cholinergic Neurones in Alzheimer's Disease" *Neurosci Lett*, 1986; 66: 199-204.

Parmeggiani B, Moura AP, Grings M, Bumbel AP, De Moura Alvorcem L, Tauana Pletsch J, Fernandes CG, Wyse AT, Wajner M, Leipnitz G. "In Vitro Evidence That Sulfite Impairs Glutamatergic Neurotransmission and Inhibits Glutathione Metabolism-Related Enzymes in Rat Cerebral Cortex" *Int J Dev Neurosci*, 2015; 42: 68-75.

Pines G, Danbolt NC, Bjoras M, Zhang Y, Bendahan A, Eide L, Koepsell H, Storm-Mathisen J, Seeberg E, Kanner BI. "Cloning and Expression of a Rat Brain L-Glutamate Transporter" *Nature*, 1992; 360: 464-467.

Platenik J, Kuramoto N, Yoneda Y. "Molecular Mechanisms Associated with Long-Term Consolidation of the Nmda Signals" *Life Sci*, 2000; 67: 335-364.

Platt SR. "The Role of Glutamate in Central Nervous System Health and Disease-a Review" *Vet J*, 2007; 173: 278-286.

Pothuizen HH, Zhang WN, Jongen-Relo AL, Feldon J, Yee BK. "Dissociation of Function between the Dorsal and the Ventral Hippocampus in Spatial Learning Abilities of the Rat: A within-Subject, within-Task Comparison of Reference and Working Spatial Memory" *Eur J Neurosci*, 2004; 19: 705-712.

Pu F, Mishima K, Egashira N, Iwasaki K, Kaneko T, Uchida T, Irie K, Ishibashi D, Fujii H, Kosuna K, Fujiwara M. "Protective Effect of Buckwheat Polyphenols against Long-Lasting Impairment of Spatial Memory Associated with Hippocampal Neuronal Damage in Rats Subjected to Repeated Cerebral Ischemia" *J Pharmacol Sci*, 2004; 94: 393-402.

Pundir CS, Rawal R. "Determination of Sulfite with Emphasis on Biosensing Methods: A Review" *Anal Bioanal Chem*, 2013; 405: 3049-3062.

Ramonet D, Rodríguez MJ, Fredriksson , Bernal F, and Mahy N. "In Vivo Neuroprotective Adaptation of the Glutamate/Glutamine Cycle to Neuronal Death" *Hippocampus*, 2004; 14:586-594.

Reist M, Jenner P, Halliwell B. "Sulphite Enhances Peroxynitrite-Dependent Alpha1-Antiproteinase Inactivation. A Mechanism of Lung Injury by Sulphur Dioxide?" *FEBS Lett*, 1998; 423: 231-234.

Robert SM, Ogunrinu-Babarinde T, Holt KT, Sontheimer H. "Role of Glutamate Transporters in Redox Homeostasis of the Brain" *Neurochem Int*, 2014; 73: 181-191.

Rothstein JD. "Excitotoxic Mechanisms in the Pathogenesis of Amyotrophic Lateral Sclerosis" *Adv Neurol*, 1995; 68: 7-20; discussion 21-27.

Rothstein JD, Dykes-Hoberg M, Pardo CA, Bristol LA, Jin L, Kuncl RW, Kanai Y, Hediger MA, Wang Y, Schielke JP, Welty DF. "Knockout of Glutamate

Transporters Reveals a Major Role for Astroglial Transport in Excitotoxicity and Clearance of Glutamate" *Neuron*, 1996; 16: 675-686.

Rothstein JD, Martin LJ, Kuncl RW. "Decreased Glutamate Transport by the Brain and Spinal Cord in Amyotrophic Lateral Sclerosis" *N Engl J Med*, 1992; 326: 1464-1468.

Salman MS, Ackerley C, Senger C, Becker L. "New Insights into the Neuropathogenesis of Molybdenum Cofactor Deficiency" *Can J Neurol Sci*, 2002; 29: 91-96.

Santos-Fandila A, Zafra-Gomez A, Barranco A, Navalon A, Rueda R, Ramirez M. "Quantitative Determination of Neurotransmitters, Metabolites and Derivates in Microdialysates by UHPLC-Tandem Mass Spectrometry" *Talanta*, 2013; 114: 79-89.

Schafer MK, Varoqui H, Defamie N, Weihe E, Erickson JD. "Molecular Cloning and Functional Identification of Mouse Vesicular Glutamate Transporter 3 and Its Expression in Subsets of Novel Excitatory Neurons" *J Biol Chem*, 2002; 277: 50734-50748.

Schoepp D, Bockaert J, Sladeczek F. "Pharmacological and Functional Characteristics of Metabotropic Excitatory Amino Acid Receptors" *Trends Pharmacol Sci*, 1990; 11: 508-515.

Schwarz G. "Molybdenum Cofactor and Human Disease" *Curr Opin Chem Biol*, 2016; 31: 179-187.

Sepkuty JP, Cohen AS, Eccles C, Rafiq A, Behar K, Ganel R, Coulter DA, Rothstein JD. "A Neuronal Glutamate Transporter Contributes to Neurotransmitter GABA Synthesis and Epilepsy" *J Neurosci*, 2002; 22: 6372-6379.

Sharma S, Rakoczy S, Brown-Borg H. "Assessment of Spatial Memory in Mice" *Life Sci*, 2010; 87: 521-536.

Shashidharan P, Clarke DD, Ahmed N, Moschonas N, Plaitakis A. "Nerve Tissue-Specific Human Glutamate Dehydrogenase That Is Thermolabile and Highly Regulated by Adp" *J Neurochem*, 1997; 68: 1804-1811.

Shashidharan P, Michaelidis TM, Robakis NK, Kresovali A, Papamatheakis J, Plaitakis A. "Novel Human Glutamate Dehydrogenase Expressed in Neural and Testicular Tissues and Encoded by an X-Linked Intronless Gene" *J Biol Chem*, 1994; 269: 16971-16976.

Sheldon AL, Robinson MB. "The Role of Glutamate Transporters in Neurodegenerative Diseases and Potential Opportunities for Intervention" *Neurochem Int*, 2007; 51: 333-355.

Sidhu VK, Huang BX, Desai A, Kevala K, Kim HY. "Role of DHA in aging-related changes in mouse brain synaptic plasma membrane proteome" *Neurobiology of Aging*, 2016; 41: 73-85.

Sidoryk-Wegrzynowicz M. "Impairment of Glutamine/Glutamate-Gamma-Aminobutyric Acid Cycle in Manganese Toxicity in the Central Nervous System" *Folia Neuropathol*, 2014; 52: 377-382.

Simantov R, Crispino M, Hoe W, Broutman G, Tocco G, Rothstein JD, Baudry M. "Changes in Expression of Neuronal and Glial Glutamate Transporters in Rat Hippocampus Following Kainate-Induced Seizure Activity" *Brain Res Mol Brain Res*, 1999; 65: 112-123.

Simon RA. "Sulfite Sensitivity" *Ann Allergy*, 1986; 56: 281-288.

Spanaki C, Plaitakis A. "The Role of Glutamate Dehydrogenase in Mammalian Ammonia Metabolism" *Neurotox Res*, 2012; 21: 117-127.

Spangaro M, Bosia M, Zanoletti A, Bechi M, Cocchi F, Pirovano A, Lorenzi C, Bramanti P, Benedetti F, Smeraldi E, Cavallaro R. "Cognitive Dysfunction and Glutamate Reuptake: Effect of Eaat2 Polymorphism in Schizophrenia" *Neurosci Lett*, 2012; 522: 151-155.

Squire LR, Genzel L, Wixted JT, Morris RG. "Memory Consolidation" *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2015; 7: a021766.

Steele WV, Appelman EH. "The Standard Enthalpy of Formation of Peroxymonosulfate (Hso5-) and the Standard Electrode Potential of the Peroxymonosulfate-Bisulfate Couple" *Journal of Chemical Thermodynamics*, 1982; 14: 337-344.

Szeliga M, Matyja E, Obara M, Grajkowska W, Czernicki T, Albrecht J. "Relative Expression of Mrnas Coding for Glutaminase Isoforms in Cns Tissues and Cns Tumors" *Neurochem Res*, 2008; 33: 808-813.

Takehara-Nishiuchi K. "Entorhinal Cortex and Consolidated Memory" *Neurosci Res*, 2014; 84: 27-33.

Tanabe Y, Masu M, Ishii T, Shigemoto R, Nakanishi S. "A Family of Metabotropic Glutamate Receptors" *Neuron*, 1992; 8: 169-179.

Tanaka K. "Expression Cloning of a Rat Glutamate Transporter" *Neurosci Res*, 1993; 16: 149-153.

Tanaka K, Watase K, Manabe T, Yamada K, Watanabe M, Takahashi K, Iwama H, Nishikawa T, Ichihara N, Kikuchi T, Okuyama S, Kawashima N, Hori S, Takimoto M, Wada K. "Epilepsy and Exacerbation of Brain Injury in Mice Lacking the Glutamate Transporter Glt-1" *Science*, 1997; 276: 1699-1702.

Taylor SL, Higley NA, Bush RK. "Sulfites in Foods: Uses, Analytical Methods, Residues, Fate, Exposure Assessment, Metabolism, Toxicity, and Hypersensitivity" *Adv Food Res*, 1986; 30: 1-76.

Til HP, Feron VJ, De Groot AP. "The Toxicity of Sulphite. I. Long-Term Feeding and Multigeneration Studies in Rats" *Food Cosmet Toxicol*, 1972; 10: 291-310.

Tulving E. Episodic and semantic memory. In: Tulving, E, Donaldson, W (Eds.), *Organization of Memory*. Academic Press, New York, pp. 381-403, 1972.

Tulving E, Markowitsch HJ. "Episodic and Declarative Memory: Role of the Hippocampus" *Hippocampus*, 1998; 8: 198-204.

Tutuncu B, Kucukatay V, Arslan S, Sahin B, Semiz A, Sen A. "Alteration of Drug Metabolizing Enzymes in Sulphite Oxidase Deficiency" *J Clin Biochem Nutr*, 2012; 51: 50-54.

Vally H, Misso NL. "Adverse Reactions to the Sulphite Additives" *Gastroenterol Hepatol Bed Bench*, 2012; 5: 16-23.

Ward HK, Bradford HF. "Relative Activities of Glutamine Synthetase and Glutaminase in Mammalian Synaptosomes" *J Neurochem*, 1979; 33: 339-342.

Ward MT, Stoelzel CR, Markus EJ. "Hippocampal Dysfunction During Aging II: Deficits on the Radial-Arm Maze" *Neurobiol Aging*, 1999; 20: 373-380.

Watts SD, Torres-Salazar D, Divito CB, Amara SG. "Cysteine Transport through Excitatory Amino Acid Transporter 3 (Eaat3)" *PLoS One*, 2014; 9: e109245.

Westergaard N, Sonnewald U, Schousboe A. "Metabolic Trafficking between Neurons and Astrocytes: The Glutamate/Glutamine Cycle Revisited" *Dev Neurosci*, 1995; 17: 203-211.

Woo WH, Yang H, Wong KP, Halliwell B. "Sulphite Oxidase Gene Expression in Human Brain and in Other Human and Rat Tissues" *Biochem Biophys Res Commun*, 2003; 305: 619-623.

Yang TY, Xu ZF, Liu W, Xu B, Deng Y, Li YH, Feng S. "Alpha-Lipoic Acid Protects against Methylmercury-Induced Neurotoxic Effects Via Inhibition of Oxidative Stress in Rat Cerebral Cortex" *Environ Toxicol Pharmacol*, 2015; 39: 157-166.

Zaganas I, Plaitakis A. "Single Amino Acid Substitution (G456a) in the Vicinity of the Gtp Binding Domain of Human Housekeeping Glutamate Dehydrogenase Markedly Attenuates Gtp Inhibition and Abolishes the Cooperative Behavior of the Enzyme" *J Biol Chem*, 2002; 277: 26422-26428.

Ze X, Su M, Zhao X, Jiang H, Hong J, Yu X, Liu D, Xu B, Sheng L, Zhou Q, Zhou J, Cui J, Li K, Wang L, Ze Y, Hong F. "Tio2 Nanoparticle-Induced Neurotoxicity May Be Involved in Dysfunction of Glutamate Metabolism and Its Receptor Expression in Mice" *Environ Toxicol*, 2016; 31: 655-662.

Zhu H, Yoshimoto T, Imajo-Ohmi S, Dazortsava M, Mathivanan A, Yamashima T. "Why are hippocampal CA1 neurons vulnerable but motor cortex neurons resistant to transient ischemia? " *J Neurochem*, 2012; 4: 574-85.

Zhou F, Zhu X, Castellani RJ, Stimmelmayer R, Perry G, Smith MA, Drew KL. "Hibernation, a Model of Neuroprotection" *Am J Pathol*, 2001; 158: 2145-2151.



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Ceren	Uyruğu	T.C.
Soyadı	KENCEBAY MANAS	Tel no	05056295839
Doğum tarihi	26/12/1983	e-posta	ceren_kencebay@hotmail.com

Eğitim Bilgileri

	Mezun olduğu kurum	Mezuniyet yılı
Lise	Metin-Nuran Çakallıklı Anadolu Lisesi	2002
Lisans	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi-Biyoloji	2006
Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi-Biyofizik A.D.	2010
Doktora	Akdeniz Üniversitesi-Biyofizik A.D.	2017

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (yıl-yıl)
Araştırma Görevlisi	Akdeniz Üniversitesi/ Tıp Fakültesi/ Biyofizik A.D.	2010-2017

Yabancı Dilleri	Sınav türü	Puanı
İngilizce	ÜDS	62,5

Proje Deneyimi

1. Deneysel Parkinson Modelinde Lokomotor Aktive ve Görsel Sistem Bozukluklarına Dokosaheksaenoik Asitin Etkisi ve Bu Etkide Siklooksijenaz-2'nin Rolünün Araştırılması, Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi, Proje No: 2007.01.0103.016, 2007.
2. Sodyum Metabisülfite Öğrenme Üzerine Etkilerinde PLA2 Enzimlerinin Rolü, Araştırma Projesi, Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi, Proje No: 2008.01.0103.009, 2008.
3. Sülfite Mide Dokusunda Oluşturduğu Oksidatif ve Apoptotik Parametrelerdeki Değişiklikler Üzerine Ghrelinin Etkisi, Araştırma Projesi, Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi, Proje No: 2009.01.0122.002, 2009.
4. Sıçanlarda Oluşturulan Deneysel Diyabet Modelinde Sodyum Tungstatın Sıçan Femuru Üzerindeki Biyomekanik ve Histomorfometrik Etkileri, Araştırma Projesi,

Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi, Proje No: 2009.01.0103.007, 2009.

5. Beyinde Sülfetin Apoptozise Etkisi Ve Elektrofizyolojik Parametrelerle İlişkisi, Yüksek Lisans Tezi, Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi, Proje No: 2009.02.0122.001, 2009.

6. Siyatik Sinirin Farklı Hasar-Modellerinde Melatonin Uygulamasının Sinir Rejenerasyonu Üzerine Etkisinin Ultrastruktürel ve Biyokimyasal İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi, Proje No: 2010.02.0122.015,2010.

7. Eritropoietin ve Asetil-L-Karnitinin Siçanlarda Periferik Sinir İyileşmesi Üzerine Etkilerinin Karşılaştırılması, Araştırma Projesi, Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi, Proje No: 2011.01.0103.005, 2011.

8. 900-2200 MHz frekans aralığında kullanılan cep telefonlarından yayılan elektromanyetik alana akut ve kronik maruziyetin siçanlarda öğrenme üzerine etkileri ve mekanizmaları. Araştırma Projesi, Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi, Proje No: 2013.01.0102.013, 2013.

9. Diyetle alınan sülfetin beyin sapı işitsel potansiyellerine etkisi ve moleküler mekanizmaları. Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi, Proje No: 2013.01.0103.014, 2013.

10. Günlük 25 mg kg dozda alınan sülfetin hipokampusta glutamat sentez ve salınımına etkilerinin araştırılması, TÜBİTAK, Proje No:213S090, 2014.

11. Farklı Dozlarda Diyetle Alınan Sodyum Metabisülfetin Öğrenme Üzerine Etkilerinde Glutamatın Rolü. Doktora Tezi, Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi, Proje No: 2014.03.0122.002, 2014.

12. Ellagik Asit'in Fare Depresyon Modellerinde Beyin Kaynaklı Nörotrofik Faktör (BKNF) Düzeylerine Etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi, Proje No: TYL-2014-71, 2016.

Burslar-Ödüller:

Auditory Neuroscience Training School, Czech Republic at the Institute of Experimental Medicine AS CR. 9-11 Eylül 2013.

14. Ulusal El ve Üst Ekstremitte Cerrahisi Kongresi, Prof. Dr. Rıdvan Ege En İyi Bildiri Ödülü, 15-18 Mayıs 2014, Bursa

8. Uluslararası Psikofarmakoloji Kongresi & 4. Uluslararası Çocuk ve Ergen Psikofarmakolojisi Sempozyumu, Sözel Bildiri Araştırma Teşvik 3.'lük ödülü, 20–24 Nisan 2016, Antalya

Yayınlar ve Bildiriler:

Uluslararası Hakemli ve SCI/SCI-Expanded Kayıtlı Dergilerde Yer Alan Yayınlar

1. Ozsoy O., Tanrıover G., Derin N., Uysal N., Demir N., Gemici B., **Kencebay C.**, Yargıoğlu P., Agar A., Aslan M., "The effect of docosahexaenoic acid on visual evoked potentials in a mouse of parkinson's disease: The role of cyclooxygenase-2 and nuclear factor Kappa-B" *Neurotox Res*, 20: 250- 262 (2011)
2. Kaya Y, Sarıkcıoğlu L, Aslan M, **Kencebay C.**, Demir N, Angelov DN, Yıldırım FB, "Comparison of the beneficial effect of melatonin on recovery after cut and crush sciatic nerve injury: a combined study using functional, electrophysiological, biochemical, and electron microscopic analyses.". *Childs Nerv Syst*, 29(3):389-401 (2013).
3. **Kencebay C.**, Derin N, Ozsoy O, Kipmen-Korgun D, Tanrıover G, Ozturk N, Basaranlar G, Yargıoğlu-Akkiraz P, Sozen B, Agar A., "Merit of quinacrine in the decrease of ingested sulfite-induced toxic action in rat brain.", *Food Chem Toxicol*, 52:129-36 (2013).
4. Ercan S, Basaranlar G, Gungor NE, **Kencebay C.**, Sahin P, Celik-Ozenci C, Derin N. , "Ghrelin Inhibits Sodium Metabisulfite Induced Oxidative Stress And Apoptosis In Rat Gastric Mucosa.", *Food Chem Toxicol*, S0278-6915(13)00128-2 (2013).
5. Ercan S, **Kencebay C.**, Basaranlar G, Ozcan F, Derin N, Aslan M. "Induction of omega 6 inflammatory pathway by sodium metabisulfite in rat liver and its attenuation by ghrelin." *Lipids Health Dis*. 2015 Feb 17;14(1):7.
6. Ercan S, **Kencebay C.**, Basaranlar G, Derin N, Aslan M. "Induction of xanthine oxidase activity, endoplasmic reticulum stress and caspase activation by sodium metabisulfite in rat liver and their attenuation by Ghrelin." *Food Chem Toxicol*. 2015 Feb;76:27-32.
7. Bulut M, Dönmez BÖ, Öztürk N, Başaranlar G, **Kencebay Manas C.**, Derin N, Özdemir S. "Effect of sodium tungstate on visual evoked potentials in diabetic rats" *Int J Ophthalmol*. 2016 May 18;9(5):677-81.

Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitaplarında Basılan Bildiriler

1. **Kencebay C.**, Özcanlı H., Tanrıöver G., Arıcan R.Y., Çakıcı İ., Demir N., Derin N. “Erythropoietin and acetyl-L-carnitine ameliorates nerve injury in a rat model.” FENS Forum of Neuroscience, Milan/ ITALY, 5-9 July 2014.
2. **Kencebay C.**, Basaranlar G., Ozturk N., Derin N., Donmez BO., Ozdemir S., Oguz N. “Visual evoked potential changes and lipid peroxidation level in streptozotocin-induced diabetic rats.” FENS Featured Regional Meeting, Prague/CZECH REPUBLIC, 11–14 September 2013.
3. Derin N., Basaranlar G., **Kencebay C.**, Aslan M. “The role of Quinacrine on the effects of ingested sulfite in rat hippocampus.” Nutrition, Oxygen biology and Medicine, 5th International Symposium. Paris/France, 5-7 June, 2013.
4. Başaranlar G., Ercan S., **Kencebay C.**, Derin N. “The Effect of Ghrelin on spatial Learning, Memory and Lipid Peroxidation in Rats Exposed to Sulfite.” Nutrition, Oxygen biology and Medicine, 5th International Symposium. Paris/France, 5-7 June, 2013.
5. Agar A., Ozsoy O., Doğan S., Derin N., **Kencebay C.**, Uysal N., Gemici B., Yargicoglu P. A., Aslan M.,” The Effect of Docosahexaenoic Acid on Visual Evoked Potentials in a Mouse Model of Parkinson’s Disease: The Role of Cyclooxygenase-2 and Nuclear Factor Kappa-B ” Society for neuroscience annual meeting, J20 250.12, Kalifornia, 13- 17 Kasım 2010.

Ulusal Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitaplarında Basılan Bildiriler

1. Derin N., Gökçek Saraç Ç., Er H., **Kencebay Manas C.**, Özen Ş. “900-2200 MHz RF-EMR maruziyetinin protein kinaz A enziminin hipokampustaki seviyesi/aktivitesi üzerine etkilerinin araştırılması” 14. Ulusal Sinirbilim Kongresi. 26-29 Mayıs 2016.
2. Danışman B., Akçay G., Başaranlar G., **Kencebay C.**, Derin N. “Effects of Ingested Sulfite on Auditory Evoked Brainstem Response” 42nd Ulusal Fizyoloji Kongresi, Düzce, 05-08 Eylül 2016.
3. Derin N., **Kencebay C.**, Bülbül M., Kipmen Korgun D., Ocak AG., Aslan M. “Diyetle Alınan Sülfitin Hipokampusta Glutamat Sentez ve Salınımına Etkileri” ” 41. Ulusal Fizyoloji Kongresi, Çanakkale, 09-13 Eylül 2015.
4. Ercan Kelek S., Şahin P., Başaranlar G., **Kencebay C.**, Derin N., Çelik Özenci Ç. “Sülfid ve Ghreline Maruz Kalmış Sıçanlar Mide Dokusunda mTOR Sinyal Yoluyla Proteinlerinin Değerlendirilmesi” 41. Ulusal Fizyoloji Kongresi, Çanakkale, 09-13 Eylül 2015.
5. Özcanlı H., Derin N., **Kencebay C.**, Tanrıöver G., Demir N., Çakıcı İ., Arıcan R.Y. “Sıçanlarda Oluşturulan Periferik Sinir Hasarında Eritropoietin ve Asetil-L-karnitinin Tedavi Edici Etkilerinin Karşılaştırılması”, 14. Ulusal El ve Üst Ekstremité Cerrahisi Kongresi, Bursa, 15-18 Mayıs 2014.

6. Başaranlar G., Ercan S., **Kencebay C.**, Derin N. “Sülfite maruz kalan sıçanlarda ghrelinin uzaysal hafıza ve lipid peroksidasyona etkisi”, 12. Ulusal Sinirbilim Kongresi, P59, sayfa 74, İstanbul, 28-31 Mayıs 2014.
7. **Kencebay C.**, Öztürk N., Başaranlar G., Dönmez BÖ., Derin N., Özdemir S., Oğuz N. “Diyabete Bağlı Görsel Uyarılma Potansiyeli Değişikliklerine Sodyum Tungstatın Etkisi“ 25. Ulusal Biyofizik Kongresi, Trabzon, 24-27 Eylül 2013.
8. Derin N., **Kencebay C.**, Özcanlı H., Tanrıöver G., Demir N., Çakıcı İ., Arıcan Y. “Sıçanlarda Oluşturulan Periferik Sinir Hasarında Eritropoietin ve Asetil-L-Karnitinin Tedavi Edici Etkilerinin Karşılaştırılması” 39. Ulusal Fizyoloji Kongresi, Ankara, 10-14 Eylül 2013.
9. Tanrıöver G., Dilmaç S., **Kencebay C.**, Arıcan Y., Derin N., Demir N., Çakıcı İ., Özcanlı H. Eritropoietin ve asetil-L-karnitinin sıçanlarda periferik sinir iyileşmesi üzerine etkilerinin karşılaştırılması. 21. Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi Mersin, 28-31 Mayıs 2013.
10. “Başaranlar G., **Kencebay C.**, Aslan M., Derin N. “Diyetle Alınan Sülfitin Hipokampal Oksidan/Antioksidan Kapasiteler ve Fosfolipaz A2 Enzim Aktivitelerine Etkisi “, 11. Ulusal Sinirbilim Kongresi, İzmir, 28 Nisan- 01 Mayıs 2013.
11. Ercan S., **Kencebay C.**, Güngör NE., Başaranlar G., Çelik-Ozenci C., Derin N., “Sıçan Mide Dokusunda Sodyum Metabisülfite Oluşturduğu Apoptozis Üzerine Ghrelinin Etkisi”, 38. Ulusal Fizyoloji Kongresi, Trabzon, 25-29 Eylül 2012.
12. **Kencebay C.**, Derin N., Özsoy O., Öztürk N., Tanrıöver G., Agar A., Yargıoğlu P., “Sülfite Beyin Dokusuna Etkilerinde Pla2 Enziminin Rolü”, 24. Ulusal Biyofizik Kongresi, İstanbul, 25-28 Eylül 2012.
13. **Kencebay C.**, Derin N., Özsoy O., Öztürk N., Agar A., Yargıoğlu P.,” Beyinde, Sülfite Lipid Peroksidasyona Ve Somatosensoriyel Uyarılma Potansiyellerine Etkisi”, 23. Ulusal Biyofizik Kongresi, P35, sayfa 54, Edirne, 13-16 Eylül 2011.
14. Derin N., Başaranlar G., **Kencebay C.**, Agar A., Yargıoğlu P.,” Sodyum Metabisülfite ve quinacrinin sıçanlarda hipokampus bağımlı spasyel hafıza ve öğrenme üzerine etkileri” , 10. Ulusal Sinirbilim Kongresi, P51, sayfa 144, İstanbul, 09-12 Nisan 2011.