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

Tez Yöneticisi
Doç. Dr. Ruhan Deniz TOPUZ

İkinci Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Kansu BÜYÜKAFŞAR

RHO/RHO-KİNAZ YOLAĞININ

BAĞLAMSAL KORKU KOŞULLANMADAKİ ROLÜ

(Yüksek Lisans Tezi)

Nur Sena KÖSE

EDİRNE-2022

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

Tez Yöneticisi
Doç. Dr. Ruhan Deniz TOPUZ

İkinci Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Kansu BÜYÜKAFŞAR

RHO/RHO-KİNAZ YOLAĞININ

BAĞLAMSAL KORKU KOŞULLANMADAKİ ROLÜ

(Yüksek Lisans Tezi)

Nur Sena KÖSE

Destekleyen Kurum: TÜBAP- 2020/132

Tez no:

EDİRNE-2022

T. C.

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü

ONAY

Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Tıbbi Farmakoloji Yüksek Lisans Programı çerçevesinde ve Doç. Dr. Ruhan Deniz TOPUZ danışmanlığında Yüksek Lisans öğrencisi Nur Sena KÖSE tarafından tez başlığı "RHO/RHO Kinaz Yolağının Bağlamsal Korku Koşullanmadaki Rolü" olarak teslim edilen bu tezin tez savunma sınavı 24 Haziran 2022 tarihinde yapılarak aşağıdaki jüri üyeleri tarafından "**Yüksek Lisans Tezi**" olarak kabul edilmiştir.

PROF. DR. Ç.HAKAN KARADAĞ
Jüri Başkanı

PROF. DR. AHMET ULUGÖL
Üye

PROF. DR. KANSU BÜYÜKAFŞAR
Üye (2. Tez Danışmanı)

DOÇ. DR. AKİF HAKAN KURT
Üye

DOÇ. DR. RUHAN DENİZ TOPUZ
(Danışman) Üye

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

PROF. DR. TAMMAM SİPAHİ

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimimde ve tez çalışma sürecinde gösterdikleri emek, sabır ve desteklerinden dolayı başta tez danışmanlarım Prof. Dr. Kansu BÜYÜKAFŞAR ve Doç. Dr. Ruhan Deniz TOPUZ olmak üzere, hocalarım Prof. Dr. Ahmet ULUGÖL, Prof. Dr. Çetin Hakan KARADAĞ ve Doç. Dr. Özgür GÜNDÜZ'e, her zaman yanımda olan arkadaşım Arş. Gör. Hilal Sancar'a, üzerimde en büyük emeğe sahip olan aileme ve desteklerinden dolayı TÜBAP'a teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ 1

GENEL BİLGİLER 3

ÖĞRENME VE BELLEK 3

KORKU BELLEĞİ 6

RHO-KİNAZ YOLAĞI 11

GEREÇ VE YÖNTEM 21

BULGULAR 32

TARTIŞMA 40

SONUÇLAR 47

ÖZET 49

SUMMARY 51

KAYNAKLAR 53

ŞEKİLLER LİSTESİ 64

ÖZGEÇMİŞ 65

EKLER 66

SİMGE VE KISALTMALAR

BA **:** Bazal amigdala

BLA **:** Bazolateral amigdala

CA **:** Cornu Ammonis

CeA **:** Santral amigdala

DG **:** Dentat girus

GTP **:** Guanozin trifosfat

GAP **:** GTPaz aktive edici proteinler

GDI **:** GTPaz ayırıcı inhibitörler

GDP **:** Guanozin difosfat

GEF **:** Guanin nükleotid değiştirici faktör

GTP **:** Guanozin trifosfat

GTPaz **:** Guanin trifosfataz

LA **:** Lateral amigdala

Rho-GTPaz **:** Rho proteinleri

GİRİŞ VE AMAÇ

Santral sinir sisteminde nöronlar arasında iletişim sinapslar aracılığıyla olmaktadır. Sinaptik ağların kurulmasında en önemli faktörlerden biri aktin hücre iskeletidir ve aktin hücre iskeletinin temel düzenleyicilerinden biri de Rho/Rho-kinaz sinyal yolağıdır. Rho/Rho-kinaz yolağı hücre iskeletinin oluşması ve adezyonu gibi birçok hücresel olaya aracılık etmektedir ve santral sinir sisteminde de birçok etkisi olduğu gösterilmiştir (1,2). Santral sinir sisteminde nöronlarda akson büyümesi, dentrit gelişimi ve plastisite, nörit retraksiyonu ve nöronal migrasyon gibi morfolojik olaylarda etkilidir (3,4).

Rho proteinleri; 20-40 kDa monomerik yapıda olan küçük G proteinleridir (5). Çeşitli uyaranlarla aktive olan Rho proteinleri hücre içi sinyal yolaklarının değişimi ve düzenlenmesinde kritik rol oynar (6). Rho proteinleri, alt efektörü olan Rho-kinaz ile etkileşerek; düz kas kasılması, kas olmayan hücrelerde (endotel, eritrosit, trombosit, lökosit, makrofaj, kanser hücreleri vb.) hücre membran şekil değişikliği, endotelyal permeabilite artışı, hücre iskeleti aktin re-organizasyonu, hücre göçü, invazyon, metastaz, trombosit agregasyonu ve adezyonu gibi birçok hücresel fonksiyonda görev almaktadır (7).Rho/Rho-kinaz yolağının hücrelerde aracılık ettiği en temel olay, hücre içi kalsiyum yükselmesi sonucu kalsiyumun depolara geri çekilmesi sırasında aktive olan Ca^{2+}-duyarlılığı (Ca^{2+}-sensitization) olayıdır. Bu fenomen sayesinde hücreler hem kalsiyumun toksik tesirlerinden korunmuş olur hem de onun başlattığı olaylar idame ettirilmiş olur (8,9). Rho proteinlerinin GDP-bağlı inaktif ve GTP-bağlı aktif olan ve aynı zamanda birbirine dönüşebilen iki formu mevcuttur. Rho'nun aktivitesi siklik olarak proteinlerce düzenlenmektedir (4).

Periferik etkilerine ek olarak, Rho/Rho-kinaz yolağı son zamanlarda santral sinir sistemi ile ilgili fizyolojik ve patolojik olaylarda, örneğin depresyon, epilepsi, Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı ve otizm ile ilişkilendirilmiştir. Nörodejeneratif hastalıkların patogenezinde genellikle artmış protein birikimi, inflamasyon, otofaji, apoptoz, nöron kaybı gibi süreçler rol oynamaktadır ve birçok çalışmada bu süreçlerin Rho-kinaz yolağında ve Rho-kinaz (ROCK) enzim aktivitesinde meydana gelen değişikliklerle ilgili olabileceğine dikkat çekilmektedir. Ayrıca yapılan çeşitli çalışmalarda ROCK inhibitörlerinin antiepileptik, antinosiseptif ve antidepresan etkiler oluşturduğu gösterilmiştir (10-14).

Öğrenme ve bellek formasyonu gibi önemli kognitif fonksiyonların altında yatan temel mekanizmalardan biri, Rho-kinaz yolağının önemli bir düzenleyici olarak rol oynadığı sinaptik plastisitedir. Birçok çalışmada Rho-kinaz yolağının inhibisyonun farklı kognitif bozukluk modellerindeki etkisine dikkat çekilmektedir (15,16).

Yaygın olarak kullanılan öğrenme bellek modellerinden biri olan bağlamsal korku koşullanma daha çok hipokampüs bağımlı bir testtir ve hipokampüsün fonksiyonlarını değerlendirmek için kullanılır. Bağlamsal korku koşullanmada, bağlam (çevresel uyaranlar) ipucu olarak kullanılır ve deney hayvanının çevresel ipuçlarına dayanarak öğrenmesi beklenir. Bu modelde bağlamın öğrenilmesinde Rho-kinaz yolağının aktivasyonunun rol oynayabileceği düşünülmektedir (17). Ayrıca ipuçlu korku koşullanma modelinde de Rho-kinaz yolağının inhibe olmasının edinimi arttırdığı gösterilmiştir (18).

Bu verilerden yola çıkarak, çalışmamızda Rho-kinaz inhibitörü Y-27632'nin farklı dozlarda bağlamsal korku koşullanmada edinim, konsolidasyon, geri çağırma, sönme ve rekonsolidasyon süreçlerindeki akut etkisini incelemeyi amaçladık. Ayrıca bağlamsal korku koşullanma modelinde farelerde hipokampüste Rho-kinaz (ROCK) enzim aktivitesinin ne şekilde değiştiğini tespit etmek için bu doku homojenatlarında ROCK aktivitesi, kolormetrik olarak ticari kitlerle ölçüldü.

GENEL BİLGİLER

ÖĞRENME VE BELLEK

Öğrenme ve bellek, alt bileşenlerden oluşan yüksek bilişsel (kognitif) fonksiyonlardır. Öğrenme ve belleği; belleğin içeriği, edinilme mekanizması ve zamansal niteliklerine göre ayırt etmek mümkündür (19). Öğrenme; organizmanın çevresel bir uyarana karşı verdiği tepkide değişiklik olması şeklinde tanımlanabilir. Bellek ise öğrenilmiş bilginin saklanması ve ihtiyaç duyulduğunda geri çağırılması olarak tanımlanmıştır. Belleğin temeli olan öğrenme aynı zamanda çevreden gelen bilgiyi algılama ve işleme olarak da tanımlanabilir (20,21).

Belleğinin sınıflandırılmasında esas alınan iki ana kavram bilginin saklanma süresi ve saklanan bilginin niteliğidir (20). Belleği saklama süresine göre kısa süreli ve uzun süreli bellek olarak ayırmak mümkündür.

Saklama Süresine Göre Bellek Tipleri

Kısa süreli bellek:

Kısa süreli belleğin diğer bir ifadesi olan kısa dönem depolama, öğrenilmiş (edinilmiş) bilginin çok kısa süreliğine depolandığı, kategorize edilip bilince ulaştırıldığı bellek fonksiyonudur (22). Öğrenilen bir bilginin hangi bellekte depolandığı, uyaranın şiddeti ve bu uyaranla karşılaşma sayısı tarafından belirlenmektedir (20,22).

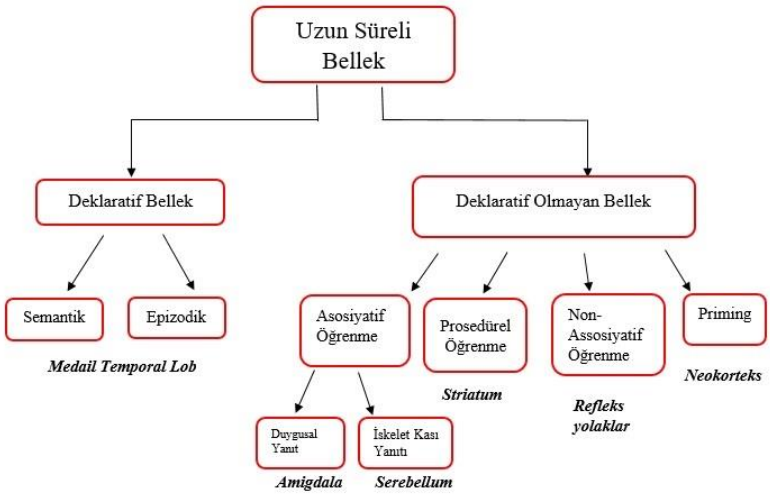
Kısa süreli bellek, belleğin en hızlı, en erken aşamalarında geçici duyusal ve algısal uyaranların işlenmesiyle ilişkilidir (20).

Bu bellek tipi aynı zamanda duyusal uyaranlarla yeni öğrenilmiş bilginin ve uzun süreli bellekte depolanıp şu anda geri çağrılmış bilginin işlenmesinde çift yönlü olarak çalışmaktadır. Yani kısa süreli bellek hem girdi hem de çıktı iletimine sahiptir (19,20).

Uzun süreli bellek

Uzun süreli bellek, edinilmiş belleğin süreklilik kazanması, biyokimyasal ve yapısal değişimlerle güçlenerek etkileşimlere dirençli hale gelmesi şeklinde tanımlanabilir. Uzun süreli bellekte bilgiler aylar, yıllar hatta bir ömür boyunca saklanabilir (20,23). Uzun süre depolama; bilginin kodlanması, kısa süre depolanması, konsolidasyonu ve bilginin geri çağırılması aşamalarından oluşmaktadır (19).

Uzun süreli bellek bilginin niteliğine göre deklaratif (bildirimsel) ve deklaratif olmayan (bildirimsel olmayan) bellek olarak sınıflandırılır. Bu sınıflandırma biçimi ve burada rol oynayan beyin bölgeleri Şekil 1'de gösterilmiştir.



Şekil 1. Uzun süreli bellek türlerinin sınıflandırılması (20)

Deklaratif bellek bilinçli olarak bilmek ve hatırlamak olarak tanımlanabilir (22,24). Yeni bilgilerin bilinçli olarak edinilmesi veya hayatımızda meydana gelen olaylar için, istendiğinde geri çağrılabilecek anıların oluşturduğu bellek türüdür (20). Açık bellek olarak da bilinen deklaratif bellek; bilginin hızlı bir şekilde öğrenilmesine ve bilgiler arası karşılaştırmaya olanak sağlar (25).

Deklaratif bellek semantik (anlamsal) ve epizodik (olaysal) bellek olmak üzere 2 kısma ayrılır. Semantik bellekte, anılar kavramdan bağımsızdır, kişisel yorum içermezler ve genel geçer bilgilerden oluşur.

Epizodik bellek ise, tatil anıları veya otobiyografik olaylar gibi zaman ve mekanla bağlantılı bilgileri içerir ve tecrübelerden oluşur (19,25). Bir ülkede yenen yemeğin tadını hatırlamak epizodik belleğe; yemeğin o ülkeye ait olduğunu bilmek ise semantik belleğe örnek verilebilir.

Bilinçli öğrenme türlerinde olduğu gibi, deklaratif öğrenme de hipokampüs bağımlıdır. Müzik, ses, duygu, hissetmek, koku gibi duyular ve kavramlar deklaratif belleğe aittir (20). Bu bellek türünde belleğin, uzun süreli saklanmasından sorumlu en önemli yapılar hipokampüs ve medial temporal lobtur (22,25).

Deklaratif olmayan bellek; bağlamsal öğrenme gibi davranışlarla kazanılan, alışkanlık rutinlerinden ve kognitif becerilerden oluşan bir bellek türüdür (19,25). Serebellum, neokorteks, striatum ve limbik sistem bu bellek türündeki en önemli beyin yapılarıdır (19). Yapılan çalışmalarla deklaratif olmayan bellek 4 ana başlıkta incelenebilir (20). Bunlar; prosedural öğrenme, *priming*, assosiyatif öğrenme ve non-assosiyatif öğrenmedir.

Prosedural öğrenme (beceri): Bu öğrenmede, bilgi ile ilk defa karşılaşıldığında bilinçli bir şekilde motor beceriler ve alışkanlıklar kullanılır. Kavram öğrenildikten sonra ise hatırlanarak davranış gerçekleştirilir. Prosedural öğrenmeye, at binmeyi öğrenmek örnek verilebilir (22). Striatal alanlar ve korteks bu öğrenmede aktif yapılardır (19).

Priming (hazırlama, başlatma): Aynı ya da ilgili uyaranla daha önceden karşılaşmanın sonucu olarak; uyaranın tanınması, sınıflandırılması ve verilen yanıtta değişiklik sağlanması şeklinde ifade edilebilen, neokorteks fonksiyonudur (26).

Assosiyatif öğrenme (koşullanma): İki farklı uyarandan kaynaklanan ilişki veya uyaran ile uyaranın oluşturduğu tepki (davranış) arasındaki ilişki incelenir (20). Koşullanma, klasik ve edimsel koşullanma olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Assosiyatif öğrenmede amigdala ve serebellum yapıları önemli rol oynar.

İlk defa Ivan Pavlov tarafından tanımlanan klasik koşullanma, koşullu ve koşulsuz uyaranın birbiriyle eşleştirildiği öğrenme biçimidir (19,20). Pavlov'un, köpekte yaptığı klasik koşullanma deneyi bağlamsal koşullanma testi olarak bilinir. Köpekte yemeği görünce oluşan tükürük salgısı koşulsuz tepki, yemek ise koşulsuz uyarandır. Daha sonra köpeğe yemek vermeden kısa bir süre önce zil çalınmaya başlamıştır. Bu noktada zilin amacı nötr bir uyaran ile koşulsuz uyaranı ilişkilendirmektir. Zamanla köpek, zil ve yemek arasındaki ilişki kurar ve tek başına zil çaldığında da tıpkı yemek verildiği zamanki gibi bir tükürük salgısı olmaya başlar. Burada zil sesi koşullu uyaran, ona bağlı gelişen tükürük salgısı ise koşullu tepkidir (20).

Edimsel koşullanma davranış ve sonuç arasındaki ilişkiyi açıklayan, temelde ödül ve ceza sistemine dayalı bir öğrenme biçimidir (19).

Non-assosiyatif öğrenme (Habituasyon ve Sensitizasyon): İlişkisel olmayan öğrenme olarak tanımlanmaktadır. *Habituasyon* yani alışma, uyaranla ilk defa karşılaşılıp hayvanda rahatsızlık oluşturmaması durumunda, tekrarlanan uyaranlarla hayvanın bu uyarana alışıp zamanla verdiği tepkinin azalması ya da yok olması durumudur (20). *Sensitizasyon* yani duyarlılaşma canlının herhangi bir uyarana karşı beklenen yanıttan daha fazla yanıt vermesi olarak açıklanabilir (19). Refleks yolaklar, *non-assosiyatif* öğrenmeden sorumlu yapılardır (20).

KORKU BELLEĞİ

Korku, bir dış tehdit ve tehlike durumunda savunma mekanizmasını harekete geçirerek organizmanın hayatta kalmasını sağlayan nörofizyolojik bir süreçtir (27). Korku kavramı aynı zamanda öznel bir duygu durumu ile tehdit edici çevresel durumlara tepki olarak ortaya çıkan davranışsal ve fizyolojik tepkilerin uyumudur (21,28).

Aynı zamanda korku, gerçek veya hayali tehditlere maruz kalmanın neden olduğu *asosiyatif* (bağlantılı) ve *asosiyatif olmayan* (bağlantılı olmayan) bileşenlerden oluşan bilinçli bir durumdur (29-31).

Korku belleği belirli nöral mekanizmalar ile kontrol edilir. Ön medial temporal lobda yer alan amigdala korkunun öğrenilmesi ve korku belleğinin oluşumunda önemli bir rol oynamaktadır (27).

Stres ve kaygı, korkuya ait kavramlardır. Korku meydana geldiğinde kaygı oluşur ve bu durum strese neden olur. Stres ve kaygıdan korkuyu ayıran durum, ortamda bir tehdit olduğunda korkunun ortaya çıkmasıdır. Stres ve kaygı için bu durum şart değildir (29). Korku çoğunlukla olaya özgü ipuçları ve bağlamlar ile oluşurken, kaygı tetikleyiciler olmaksızın meydana gelebilir (32). Korku belleğinin oluşmasındaki önemli iki faktör; tehdit ve ona verilen tepkidir (29). Kemirgenlerde yapılan araştırmalarda korku ve anksiyete, beyinde savunma davranışını organize eden motivasyonel savunma mekanizmalarını harekete geçirerek organizmanın hayatta kalmasını sağlamaktadır (30).

Korku belleği, diğer bellek türleri arasından gücü ve kolaylıkla uzun süreli bellek oluşumu ile ayrılır. Korkunun edinilmesi sonrasında konsolidasyon ve rekonsolidasyon ile en ayrıntılı ve uzun süreli olan bilgilerin oluşması sağlanır (29). Korku belleğinin diğer bir özelliği de bir anda oluşup canlının yaşamı boyunca sağlamlığını koruyabilmesidir (32).

Korku Koşullanma

Korku koşullanma, deney hayvanlarında kullanılan ve hayvanların rahatsız edici olayları tahmin etmeyi ve tehditlere uygun şekilde tepki vermeyi öğrendiği temel bir öğrenme şeklidir (29). Belli bir uyaranın kontrolü altında davranışsal ve fizyolojik tepkilerin ölçülebilmesi bu testin deneylerde sıklıkla kullanılma sebeplerinden biridir (21).

Pavlov'un korku koşullanma modelinde; hayvan rahatsızlık oluşturmayan duyusal bir uyarana (koşullu uyaran) ve rahatsızlık oluşturan ya da strese yol açan bir uyarana (ayak şoku gibi, koşulsuz uyaran) maruz bırakılır. Zaman geçtikçe hayvan, rahatsızlık vermeyen koşullu uyarandan da korkmayı öğrenir. Korku belleği oluşmuş hayvana, yalnızca koşullu uyaran verildiğinde bulunduğu ortamın etkisiyle korku tepkileri verdiği gözlemlenmiştir. Bu tepkiler kalbin atış hızında, kan basıncında, defekasyonda ve stres hormon seviyelerinde artma gibi otonomik ve endokrin değişikliklerin yanı sıra, donma (hareketsiz kalma) gibi türe özgü savunma davranışı şeklinde de görülebilir (32-34).

Korku koşullanmanın oluşumu; edinim *(acquistion)*, konsolidasyon *(consolidation)*, geri çağırma *(retrieval)*, sönme *(extinction)* ve rekonsolidasyon *(reconsalidation)* aşamalarından oluşmaktadır (34).

İlk aşama olan edinimde, bağlam ve şokun eşleştirilmesiyle korku belleği oluşturulur. Edinim sağlandıktan sonra hayvanlar normalde bulundukları ortama geri bırakıldıklarında ise konsolidasyon gerçekleşir (32).

Konsolidasyon, gen ekspresyonu ve yeni proteinlerin sentezlenmesi gibi moleküler mekanizmalarla kısa süreli belleğin uzun süreli belleğe geçmesi durumudur (32). Yeni proteinlerin sentezlendiği bu süreçte protein kinazlar (protein kinaz A, protein kinaz C ve mitojenle aktive olan protein kinaz) fosforilasyonla aktive olurlar. Amigdala, konsolidasyondaki en önemli yapılardandır (21).

Bağlamsal korku koşullanma modelinde herhangi bir ipucu uygulaması yoktur. Hayvanlar deney kabinini çevresel ipucu şeklinde kullanarak bilgileri eşleştirir. Bu deneyde ortam (bağlam) koşullu uyaran, elektroşok ise koşulsuz uyaran durumundadır (35). Hayvanlar aynı bağlamla yeniden karşı karşıya geldiğinde iki ihtimal söz konusudur bunlardan ilki eğer koşulsuz uyaran yoksa daha önce öğrenilen bilginin unutulması yani sönmesidir ikincisi ise koşulsuz uyaran varsa öğrenilen bilginin daha da güçlenmesi yani rekonsolidasyondur (29,36).

Sönme, 1900'lerin başında Pavlov tarafından keşfedilmiş ve daha sonra Konorski tarafından ayrıntılı olarak incelenmiş ve hayvanların geri çağırmayı engellemeyi kavradığı öğrenme biçimi olarak tanımlanmıştır (29).

Rekonsolidasyon bir öğrenme şekli değil, koşullu uyaranlar tarafından tetiklenen belleğin güçlendirilme aşamasıdır (29). Rekonsolidasyonun gerçekleşmesi birkaç günde olabileceği gibi uzun yıllar da sürebilir (34). Korku ve kaygı gibi duyguların azaltılmasında ya da travma sonrası görülen stres bozukluklarında, sönme ve rekonsolidasyon aşamalarına müdahale edilebileceği görüşü, birçok çalışmaya ışık tutmuştur (37).

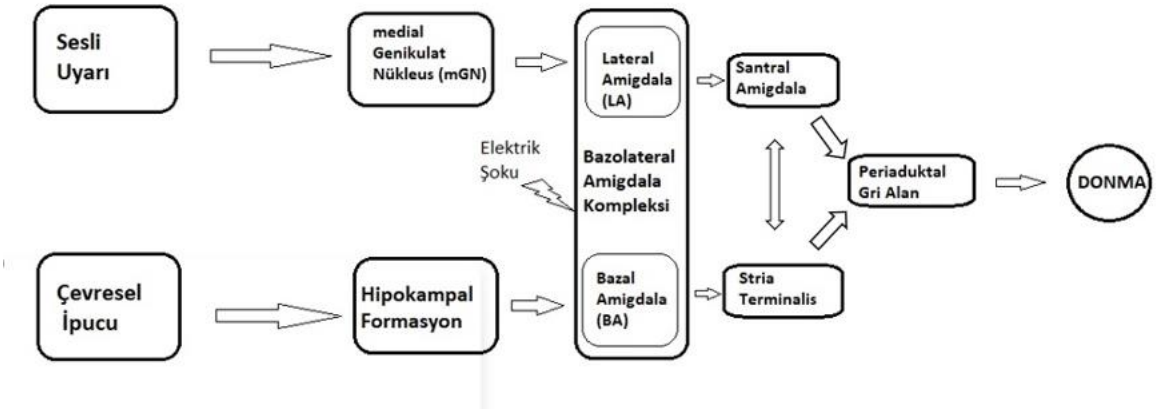
Korku koşullanmada hipokampüs, amigdala, medial genikulat nukleus (mGN), anterior singulat korteks ve ventral periakuaduktal gri alan (vPAG) gibi birçok beyin bölgesi birlikte görev alırlar. Koşullu ve koşulsuz uyaranın amigdalada çakışmasından sonra plastisite oluşarak konsolidasyon sağlanır ve böylece öğrenme gerçekleşir. Korku belleği oluşmasında lateral ve bazal nükleusları içeren BLA kompleksi ve santral amigdala (CeA) rol oynamaktadır (21,27,28,38-40).

Bağlamsal korku koşullanmada koşullu uyaran, hipokampal aktivasyon ile amigdalanın bazal nükleusuna (BA) iletilir ve burada koşulsuz uyaranla (elektriksel şok) eşleşir. İpuçlu korku koşullanmada ise koşullu uyaran mGN aracılığı ile amigdalanın lateral çekirdeğine (LA) iletilerek koşulsuz uyaran (elektriksel şok) ile eşleştirilir. BLA'da bilgiler çakışıp sinaptik plastisite meydana gelerek, CeA ile bağlantı kurar (21,28,40). BLA'da glutamaterjik nöron projeksiyonları, CeA'da ise GABAerjik nöron projeksiyonları yoğundur (40). BLA ve CeA arasındaki bu iletişim GABAerjik ara nöron kümeleri (interkalat hücreleri) ile gerçekleşmektedir (40).

CeA, korku yanıtlarını çeşitli projeksiyonlarla dağıtır. Hipotalamik ve beyin sapı çekirdeklerine projeksiyonlar yaparak otonomik yanıtları oluşturur. CeA, ventromedial prefrontal korteksin infralimbik ve prelimbik yapıları ile etkileşir. Prelimbik yapılar korku edinim ve konsolidasyonunda; infralimbik yapılar ise korku sönmesinde ve unutulmasında görev alır (29,41,42).

Korku ediniminde hipokampüsün özellikle CA1 bölgesinden gelen projeksiyonlar BA'ya iletilip, işlenir (40). Korkunun sönmesinde medial prefrontal kortkeks (mPFC), amigdala ve hipokampus birlikte rol oynar (43).

CeA ayrıca orta beyindeki periakuaduktal gri alana projeksiyon yaparak önemli bir korku yanıtı olan donma davranışını oluşturmaktadır (28,29). Klasik korku koşullanmanın nöral iletimi Şekil 2'de gösterilmiştir.



Şekil 2. Klasik korku koşullanmanın sinirsel iletimi (28)

Korku belleğinin kodlanmasında rol alan hipokampüste; dentat girusun granül hücreleriyle aktive olan CA3 hücre aksonları Schaffer kollateralleri ile bilgiyi, CA1 piramidal hücrelerine iletmektedir. Ventroangular yolak ve entorinal korteks, hipokampüs ve amigdala arasındaki iletişimi sağlamaktadır (29,44).

Korkunun sönmesi için hipokampüste BLA ile infralimbik mPFC'de bulunan glutamat-NMDA reseptörü ile plastisite gerçekleşmelidir. VmPFC, korku öğrenmenin ediniminde, ifade edilmesinde ve sönmesinde kilit bir rol oynar (29,33,45,46). Korkunun öğrenme ve sönme aşamalarında adrenerjik, nöradrenerjik, dopaminerjik ve kolinerjik reseptörler, histamin ve serotonin gibi nörotransmiterler, ACTH ve glikokortikoidler gibi hormonlar önemli rol oynamaktadır (29).

Korku belleğinde geri çağırma, AMPA reseptörünün aktifleşmesi ve yeni proteinlerin sentezlenmesinin hipokampüs, infralimbik alan, kortikal ve subkortikal yapıların birlikte hareket etmesiyle gerçekleşmektedir (29,47,48).

Amigdala

Memelilerde korku belleğinin temel nöroanatomik yapısını oluşturan amigdala, korkuyu öğrenme ve korku belleği oluşumunda kritik bir öneme sahiptir. Medial temporal lobda yer alan amigdala şekil itibari ile bademe benzemektedir (49,50). Amigdala, hipokampus ve prefrontal korteksten projeksiyonlar alarak öğrenilmiş korkuyu düzenlemektedir. (51).

Amigdala; bazolateral kompleks (lateral, bazolateral ve bazomedial çekirdek), CeA ve interkalat hücrelerden oluşmaktadır (32). Bazolateral komplekste piramidal nöronlar ve internöronlar bulunur (33). Piramidal nöronlar glutamaterjik hücrelerle, internöronlar ise GABAerjik hücrelerle çeşitli beyin bölgelerine projeksiyonlar yapar (32,33).

İnterkalat hücreler ise, bazolateral kompleks ve CeA arasında bilgi akışını sağlayan çoğunlukla GABAerjik nöronlardan oluşan hücrelerdir (33).

Amigdala, görsel, somatosensör ve işitsel korteksler aracılığıyla talamik nükleustan gelen bilgiyi işler. Amigdalanın lateral çekirdeğinden giriş yapan bilgiler BLA'da çakışır. CeA'de işlenen bilgiler GABAerjik nöronlar ile hipotalamik, subkortikal ve periakuaduktal gri alana projeksiyon yaparak iletilir. Bazolateral kompleks ve CeA arasındaki bu projeksiyonlar korku koşullanmanın temel plastisitesini oluşturmaktadır (33,49). Böylece bu yapılarda korkunun hormonal, vasküler ve motor yanıtları oluşturulmuş olur (29).

Lateral amigdala, korku koşullanma belleği için önemli bir diğer bölgedir. Yapılan çalışmalarda korku öğrenme aşamasında LA bölgesine enjekte edilen NMDA reseptör antagonisti D, L-2-amino-5-fosfovalerat'ın edinimi önemli ölçüde baskıladığı görülmüştür (52,53).

Santral amigdala, talamus ve neokorteks gibi beynin çeşitli bölgelerine projeksiyonlar yaparak otonomik ve somatomotor korku yanıtlarının görülmesine neden olur. Stres hormon aktivitesi için stria terminalise, sempatik sistem aktivasyonu için lateral hipotalamusa ve donma davranışı için periakuaduktal gri alana projeksiyon yapar (50).

Hipokampüs

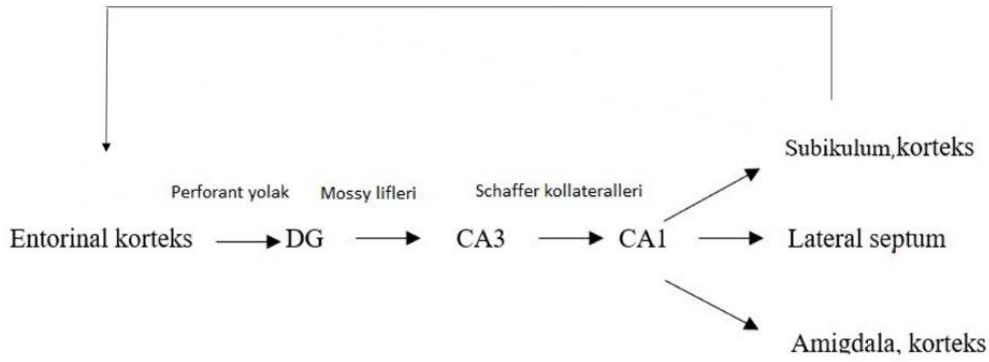
Medial temporal lobda yer alan beyin bölgesi, anatomik yapısının deniz atına benzemesi nedeniyle Yunanca deniz atı anlamına gelen hipokampüs olarak isimlendirilmiştir. Eski adı *Cornu Ammonis* (CA) olan hipokampüsün bölümlerinin adlandırılmasında hala bu adının kısaltması olan CA kullanılır (54,55).

Hipokampüs CA1, CA2, CA3 ve CA4 olmak üzere dört anatomik alt kısımdan oluşmaktadır. Yapısal olarak CA1 ve CA3 en büyük alanları oluşturur. CA1 subikuluma, CA4 ise dentat girusa yakın kısımdır. Piramidal nöronlar, CA bölgelerinin temel nöronudur. Hipokampüsün çıkış nöronu olan CA1'in piramidal nöron aksonları glutamaterjiktir. Hipokampüste aynı zamanda serotonerjik, dopaminerjik, kolinerjik ve noradrenerjik projeksiyon girdileri ve GABAerjik nöromodülatörler bulunmaktadır (54). Hipokampüs, perforant yolak, Mossy lifleri, Schaffer kollateral lifleri aracılığı ile entorinal korteksten duyusal girdiler alır (55).

Hipokampal formasyon ve parahipokampal alandan oluşan yapı hipokampal sistem olarak adlandırılır. Hipokampal formasyon dentat girus (DG), CA1, CA2, CA3 alanları ve subikulumdan; parahipokampal alan ise peririnal, postrinal, entorinal, presubikular ve parasubikular kortekslerden oluşur (56).

Entorinal korteksten perforant yolak aracılığı ile gelen bilgi, DG'yi aktive eder ve Mossy lifleri ile CA3'e gelir. CA3 alanına gelen bilgi Schaffer kollateralleri ile CA1 alanına oradan da subikuluma, prefrontal kortekse ulaşmakta ve tekrar entorinal kortekse geri dönmektedir (Şekil 3) (56,57).

Hipokampüs koşullu uyaranın varlığında bağlamı edinmek ve onu amigdalaya iletmekten sorumludur (33). Limbik sistemin bir parçası olan hipokampüs, aynı zamanda limbik sisteme sinyaller göndererek davranışın şekillenmesinde rol oynamaktadır (55). Hipokampal bölgede lezyon oluşumunun, bağlamsal korku koşullanmayı engellediği ve hayvanlarda donma süresini azalttığı görülmüştür (58,59). Maren ve Fanselow (60) tarafından yapılan başka bir çalışmada ise dorsal hipokampüsün inhibe olmasıyla korku yenilenmemiş yani sönmüştür.



Şekil 3. Bilginin hipokampüs içindeki ilerleyişi ve çıkış yaptığı yapılar (54)

Hipokampüs, bağlamsal korku koşullanmada bağlamın edinimi, depolanması ve konsolidasyonun da rol alır. Aynı zamanda subikulumdan nükleus akumbense yapılan projeksiyonlarla bağlamın özelliklerini düzenler. (61).

Hipokampüs, entorinal-perirhinal-parahipokampal korteksler ile prefrontal korteks arasındaki bu temel döngü öğrenme ve belleğin edinimindeki önemli yapılardandır.

RHO-KİNAZ YOLAĞI

Rho Proteinleri

Rho proteinleri, monomerik guanin trifosfatazların (GTPaz) Ras süper ailesinin Rho alt üyeleridir (62). Rho geni bir **R**as **ho**moloğu **(Rho)** olarak ilk kez 1985 yılında deniz salyangozu olan Aplysia'dan izole edilmiştir (5).

GTP bağlayıcı özellik gösteren bu proteinler, 20-40 kDa ağırlığına sahip monomerik G proteinleridir. Bu küçük G proteinlerini temelde 5 aileye ayırmak mümkündür. Bunlar; Ras, Rho, Rab, Sar1/Arf ve Ran aileleridir. Ras ailesi esas olarak gen ekspresyonunu, Rho ailesi hücre iskeletinin reorganizasyonunu, Rab ve Sar1 ailesi hücre içi trafiği, Ran ailesi ise mikrotübül organizasyonunu düzenlemekle sorumludur (5).

Küçük G proteinleri, diğer G proteinleri gibi GTPaz aktivitesi için sorumlu aminoasit dizilimine, guanozindifosfat (GDP) ve guanozintrifosfat (GTP) ile özel etkileşime ve alt efektörleri *(downstream effector)* ile etkileşime giren bölgeye sahiptir (5). Rho proteinlerinin aktivasyonuna genellikle sitokin, tirozin kinaz, adezyon ve G-protein kenetli reseptörler gibi hücre yüzey reseptörleri aracılık etmektedir (63).

Rho proteinlerini, diğer GTPaz'lardan ayıran yapısal özellik GTPaz alanındaki Rho bağlanma bölgesidir. Rho proteinleri, Rho bağlanma bölgesinde çeşitli efektörleri ile etkileşerek trombosit agregasyonu, lenfosit ve fibroblast adezyonu, hücre hareketliliği, hücre kasılması gibi aktin hücre iskeletine bağlı birçok hücresel süreçlerde görev yaparlar (5).

Rho proteinlerine bağlı sinyalleşme yolağı ilk olarak *Clostridium botulinum'dan* elde edilen ve aynı zamanda Rho inhibitörü olarak kullanılan C-transferaz toksini kullanılarak incelenmiştir (64)

Rho-GTPaz olarak da adlandırılan Rho proteinleri arasında; RhoA, RhoB, RhoC, RhoD, RhoE, RhoG, Rac1, Rac2, Rac3 ve Cdc42 gibi Rho protein alt tipleri bulunmaktadır (63,65). Bu Rho alt tipleri; GDP, GTP ve GTPaz aktivitesi ve aynı zamanda efektörleri ile etkileşmesini sağlayan benzer aminoasit dizilimine sahiptir. Bu proteinlerin hücre içi hedefleri benzer olmasına rağmen fonksiyonel farklılıkları bulunmaktadır (66,67). Tüm Rho-GTPaz'lar arasında Rac1 (Ras ile ilişkili C3 botulinum toksin substratı 1), Cdc42 (hücre bölünme döngüsü 42) ve RhoA (Ras homolog üye A) en kapsamlı şekilde incelenen ve üzerinde en fazla araştırma yapılan proteinlerdir (68).

Rho-GTPaz'lar için 70'ten fazla efektör protein tanımlanmıştır (69). Protein kinaz N, Rhophillin, Rhotekin, citron, citron kinaz, miyozin fosfatazın miyozin bağlayıcı alt birimi (MBS), p140 mDia ve fosfolipaz-D bunlardan bazılarıdır (66). Bustelo ve ark. (69) Rho-GTPaz efektörlerini; protein kinazlar, fosfolipazlar ve iskele proteinleri olmak üzere üç ana gruba ayırmıştır. Rho-GTPaz'lar, mikrotübül hücre iskeletini, hücre polaritesini, gen ekspresyonunu, hücre döngüsü progresyonu ve membran taşıma yollarını düzenlemektedir (70,71).

Rho proteinleri sentezlendikten sonra palmitoil, farnesil ve geranilgeranil gibi lipitlerle etkileşime girerek posttranslasyonel değişimlere uğrar. Lipid modifikasyonu, Rho proteinlerinin membrana bağlanmaları ve alt efektörlerini aktive edebilmeleri için gerekli en önemli yapılardandır (6,69). Rho'nun aktive olabilmesi için ilk olarak lipit modifikasyonuna uğramış C-terminal ucu ile membrana tutunması gerekir. Guanin nükleotidi değişimi gerçekleştiren Rho proteini daha sonra alt efektörlerini aktive eder (66).

Rho proteinleri, GDP bağlı inaktif ve GTP bağlı aktif formu arasında geçiş yaparak moleküler bir anahtar işlevi görmekte ve çoklu sinyal yolaklarını düzenlemektedir (67,70). Rho'nun aktivitesi siklik olarak proteinler tarafından düzenlenir (6). Başlıca bu proteinler; GTPaz aktive edici protein (GAP), GTPaz ayırıcı inhibitör (GDI) ve guanin nükleotid değiştirici faktör (GEF)'dür (72).

Dinlenme halinde hücrede, Rho-GDP ayırıcı inhibitörü (Rho-GDI), GDP-Rho'ya bağlanır ve GDP-Rho'nun membrandan sitozole geçmesini sağlar. Hücre agonistler aracılığıyla indüklendiğinde, GDP-Rho, GTP-Rho'ya dönüşerek aktif hale gelir. Bu dönüşüm GTP-GDP değişim reaksiyonunu uyaran GEF'ler aracılığı ile GEF bağımlı şekilde gerçekleşmektedir (67,70). Bu döngünün sistematiğini düzenleyici proteinler olan GEF'ler ve GAP'lar kontrol etmektedir (69).

Aktive olan GTP-Rho, daha sonra geranil geranillenmiş C-terminal kuyruğu aracılığı ile hücre membranına yönlendirilir ve spesifik hedeflerle etkileşime giren Rho-GTPaz'lar, hücre iskeleti dinamiği, membran geçirgenliği ve gen ekspresyonunu kontrol eden sinyalleşme yolağını başlatır (2,67). GAP'lar aynı zamanda Rho'nun intrinsik GTPaz aktivitesini hızlandırıp, GTP-Rho'yu inaktif GDP-Rho'ya dönüştürerek negatif düzenleyici olarak da görev yaparlar (67).

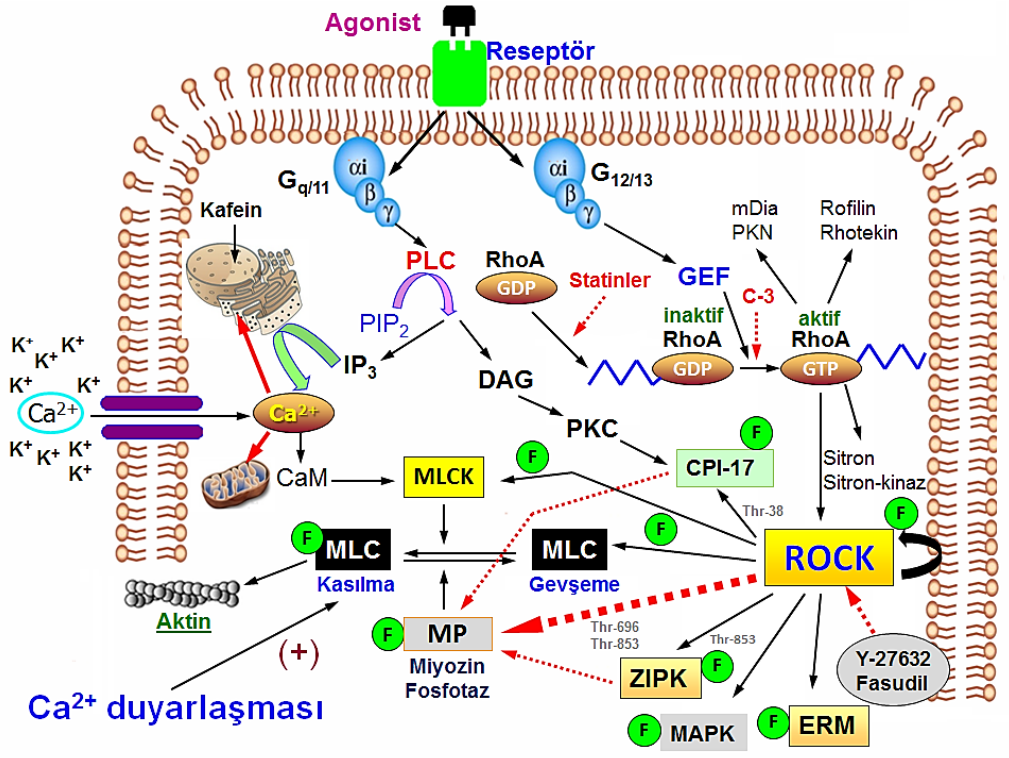
Rho proteinlerinin, hücre içi lokalizasyonu düzenleme, efektörlere bağlanma, diğer hücresel yolaklarla sinyalleşme gibi özellikleri, bu proteinleri çok sayıda hücresel süreç için düzenleme mekanizması haline getirmiştir (69).

Miyozin fosfataz aktivitesini inhibe ederek etki gösteren Rho/Rho-kinaz sinyal yolağı, agonistin uyarılmasıyla indüklenen Ca^{2+} duyarlılığından da sorumludur. Miyozin fosfataz, miyozinin ATPaz aktivitesini miyozinden bir fosfat koparark düzenler. Bunun sonucunda düz kas kasılması azalır. Ayrıca Rho-kinaz yolağında Rho, hücrelerde hücre morfolojisi, motilitesi, hücre iskeleti dinamikleri ve tümör gelişimi gibi birçok hücresel fonksiyonun düzenlenmesinde rol oynamaktadır (73-75). Kalsiyum duyarlaşması fenomeni ve Rho/Rho-kinaz sinyal ileti yolağının detayları Şekil 4'te gösterilmiştir.

Rho-Kinaz

Rho-kinaz diğer bir adıyla ROCK, 160 kDa molekül ağırlığına sahip amino ve karboksil uçları bulunan bir serin/treonin protein kinazdır (76). ROCK aynı zamanda GTP-bağlayıcı Rho protein efektörlerinden biridir (65,77). ROCK enziminin ROCK1 (p160 ROCK, ROCKβ, ROKβ) ve ROCK2 (ROCKα, ROKα) adında iki izoformu bulunmaktadır. İnsanda ROCK1 geni 18. kromozomda (18q11.1) ve ROCK2 geni 2. kromozomda (2p24) konumlanmıştır. ROCK, vücutta nerdeyse her dokuda görülmektedir. ROCK2 beyin, düz kas hücreleri, kemik iliği, böbrek, kolon, göz, mide, uterus, yumuşak doku ve kalpte, ROCK1 ise akciğer, karaciğer, dalak, pankreas, kemik, kan, serviks ve testiste daha baskın şekilde bulunmaktadır (76,78-80). ROCK'un temel rollerinden biri hücresel davranış dinamiklerini düzenlemektir (11).

ROCK enzimleri, birçok fizyopatolojik süreçte rol oynadıkları için potansiyel farmakolojik ilaç hedefleridir (2,68,69).



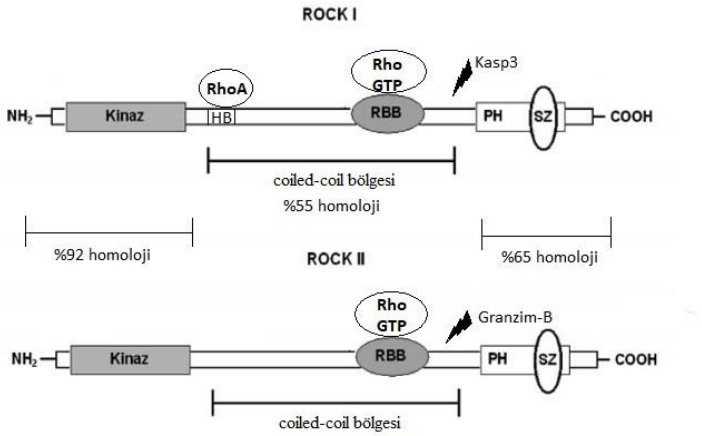
Şekil 4. Rho-kinaz sinyal ileti yolağı (81)

ROCK yapısı ve aktivitesinin düzenlenmesi:

ROCK enzimi temel olarak 3 ana kısımdan oluşmaktadır. Amino (N) terminalinde katalitik kinaz bölgesi, merkezde amfipatik α-heliks formunda *coiled-coil* bölge ve karboksil (C) terminal bölgesinde ise sisteince zengin (SZ) plekstrin homoloji bölgesi yer almaktadır (7,82,83). ROCK1'de RhoA'nın bağlandığı bir homoloji bölgesi yer alır.

Karboksil terminal bölgesinde bulunan plekstrin homoloji bölgesi ROCK'un membrana bağlanmasında rol oynarken, *coiled-coil* bölgesi ise diğer amfipatik α-heliks proteinlerle dimerleşmesini ya da etkileşime girerek proteinlerin fonksiyonel olarak düzenlenmesini ve hücre içi lokalizasyonunu sağlar (7,76,84). ROCK enzim yapısı Şekil 5'te gösterilmiştir.

Aktive olan Rho, ROCK'un *coiled-coil* bölgesinde bulunan Rho proteinlerinin bağlanma bölgesinden bağlanıp, karboksil terminal bölgesiyle etkileşime girerek kinaz bölgesini aktive eder ve oto inhibitör etkinliği bozar. ROCK'un karboksil terminal kısmı çıkarıldığında yapısal olarak aktif hale gelmiş olur. Aktive edilen ROCK, substratları ile fosforile edilerek çeşitli hücre içi olaylara katkıda bulunur (78,85).



Şekil 5. ROCK1 ve ROCK2 enzim yapısı (78)
(PH: plekstrin homoloji bölgesi; RBB: Rho bağlanma bölgesi; SZ: sisteince zengin bölge.)

Enzim inaktif durumda iken karboksil terminal bölge oto inhibitör etkinlik gösterir (86). İnaktif formda ROCK'un C-terminal plekstrin homoloji bölgesi ve Rho bağlanma bölgesi, kinaz bölgesi ile etkileşim içindedir. Bu formdan dolayı enzim katalitik etkisini gösterememektedir. Karboksil terminal bölgesinin yapıda konformasyonel inhibisyonu, kinazın katalitik aktivitesine yol açar. Katalitik etkinlik için 2 tür aktivasyon söz konusudur. Bunlardan biri GTP-Rho'nun Rho bağlanma bölgesine tutunmasıyla oluşan Rho bağımlı aktivasyon diğeri ise ROCK1 için kaspazlar ve ROCK2 için granzim-B enzimleriyle karboksil terminalinin çıkarılması ile Rho'dan bağımsız şekilde oluşan aktivasyondur (7,78,85,87). Rho'dan bağımsız gerçekleşen bu bölünme genellikle apoptoz sırasında kaspaz-3 ile katalitik alandan C-terminalin inhibitör alanının bölünmesiyle gerçekleşir (7,86,88).

Aktive olan ROCK, miyozin hafif zincirinin (MLC) fosforillenmesiyle düz kas kasılması ve LIM-kinaz fosforilasyonuyla stres liflerinin oluşumu, ezrin, radiksin ve moesin proteinlerinin fosforillenmesi ile aktin hücre iskeleti reorganizasyonu, Addusin proteinin fosforillenmesi ile sitokinez, hücre migrasyonu ve hücre şekil değişikliği, CRMP-2'nin (kollapsin yanıt aracılı protein 2) fosforillenmesi ile büyüme koni kollapsıyla hücresel adezyon ve hücre iskelet değişimi ve apoptoz gibi hücresel fonksiyonların düzenlenmesinde önemli görevlere sahiptir (73,74).

Ana hatlarıyla ROCK enziminin substratları ile etkileşimi sonucu ortaya çıkan çeşitli hücresel olaylar Tablo 1'de belirtilmiştir.

Tablo 1. ROCK substratları, fonksiyonları ve hücrede oluşturdukları yanıtlar (73,89)

SUBSTRATLAR	FONKSİYONLARI	HÜCRESEL YANITLAR
Miyozin fosfatazın miyozin bağlayıcı alt ünitesi	Miyozin fosfatazın İnhibisyonu	Düz kas kasılmasında Ca^{2+} duyarlaşması
Miyozin hafif zinciri	Miyozinin F-aktine bağlanmasında artış	Stres lifleri oluşumu, fokal adezyon oluşumu, nörit retraksiyonu, hücre kasılması, hücre motilitesi
CPI-17 proteini	Miyozin fosfatazın inaktive edici aktivitesinin aktivasyonu	Düz kas kasılmasında Ca^{2+} duyarlaşması
Kalponin	F-aktine bağlanmada azalma	Düz kas kasılmasında Ca^{2+} duyarlaşması
Ezrin Radiksin Moesin	Ezrin Radiksin Moesin aktivasyonu	Mikrovillus oluşumu
Addusin	F-aktine bağlanmada artış	Membranel olaylar, hücre motilitesi
İntermediyer filamentler	Filamentlerin dağılımı	Filamentlerin sitokinez için ayrılması
Na^+/H^+ değiştiricisi	Değiştirici aktivitenin aktivasyonu	Stres liflerinin oluşumu
LIM kinaz	Kinaz aktivitesinde artış	Kofilinin fosforilasyonu
CRMP-2		Büyüme konisi kollaps oluşumu
ZIPK	Miyozin fosfatazın İnhibisyonu	Düz kas kasılmasında Ca^{2+} duyarlaşması

CPI-17:17-kDa protein kinaz C-potentiated inhibitory protein of protein phosphatase-1; CRMP-2: collapsin response mediator protein-2; ZIPK: zipper interacting-kinase.

ROCK İnhibitörleri

1980'li yıllardan itibaren ROCK inhibitörleri ile ilgili birçok hastalık ve patolojik durum üzerinde yapılmış çalışmalar bulunmaktadır. ROCK inhibitörleri nörodejeneratif hastalıklar, kanser, böbrek yetmezliği, astım, glokom, osteoporoz, korneal endotel bozukluk, erektil disfonksiyon, insülin direnci, pulmoner arteriyel hipertansiyon ve koronal vazospazm gibi çeşitli hastalıklar için potansiyel tedavi edici ajanlardır (11,80).

ROCK inhibitörlerini, izokinolin türevleri, 4-aminopridin türevleri ve diğer inhibitörler (indazoller, amino ve üre türevleri) olmak üzere 3 ana sınıfta incelemek mümkündür. Çeşitli ROCK inhibitörleri Tablo 2'de gösterilmiştir. ROCK inhibitörleri, kinazların katalitik alanında yer alan ATP bağlanma bölgeleri ile yarışarak etki gösterir. Rho-kinaz inhibitörlerinin çoğu ROCK enzimlerini non-selektif olarak inhibe ederler. XD-4000, Slx2119 gibi ROCK2 selektif inhibitörler de mevcuttur (73,82,90,91).

İzokinolin türevi olan fasudil, ilk olarak köpeklerde serebral vazospazm önlemek amacıyla kalsiyum antagonisti olarak kullanılmıştır (7). Fasudil (Eril®) daha sonra 1995 yılında hipertansiyona bağlı subaraknoid kanamaların tedavisinde vazospazmı engellemek amacıyla klinikte kullanım onayı almış ve ruhsatlandırılmıştır (90,92). Aynı zamanda anjina pektoris tedavisi için klinik çalışmaları bulunmaktadır (91).

Fasudilin hidroksil formu olan hidroksifasudil, aynı ROCK inhibitör etkinliğine sahiptir. Fasudilin insanda yarılanma ömrünün (30 dk) kısalığı kullanımını kısıtlamıştır. Buna karşılık hidroksifasudil, yarılanma ömrünün (5 saat) daha uzun süreli olması, aktif ilaç olması gibi avantajlara sahiptir (82).

4-aminopiridin yapısına sahip ve oral uygulandığında aktif bir ilaç olan Y-27632, ROCK2 için IC_{50} değeri 800 nM ve Ki değeri 140 nM olan bir ROCK inhibitörüdür (91,93).

Günümüzde hem yeni ROCK inhibitörleri geliştirmeye yönelik hem de ROCK inhibitörlerinin klinik kullanımları ile ilgili çalışmalar devam etmektedir (80,93-96).

Tablo 2. Farmakolojik olarak ROCK inhibitörleri (73,90)

İzokinolin Türevleri:	Fasudil, hidroksifasudil, H-1152, dimetil fasudil, ripasudil, 5-aminoizokinolin, netarsudil (AR13324)
4-Aminopiridinler:	Y-27632, Y-32885, Y-39983, Y-30141
Diğer İnhibitörler:	Pirimidin, pirolopiridin, pirazol, benzotiyazol, benzatiofen, aminofurazen, kinazolin ve bor türevleri

Rho-kinaz Yolağının Santral Sinir Sistemindeki Fonksiyonu

Nörodejeneratif hastalıklar ve onların sebep olduğu kognitif bozukluklarla seyreden rahatsızlıklar 21. yüzyılın en büyük sağlık sorunlarındandır. Nörodejeneratif hastalıkların etiyolojisine bakıldığında, dikkat çekici bir şekilde, erken aksonal dejenerasyon, protein agregasyonu, protein temizleme mekanizmalarının bozulması, mitokondriyal bozukluklar, immün sistem disregülasyonu ve hücre ölümü gibi ortak mekanizmalar dikkat çekmektedir (7).

Rho proteinleri ve ROCK2 enzimi beyinde yoğun bir şekilde bulunmaktadır. Serebral damar yatağında Rho-kinaz yolağı, vasküler direnç ve kan akımının kontrolünde aktif rol oynar. Yapılan çalışmalarda spinal kord yaralanması, Alzheimer hastalığı, demans, inflamasyon, multiple skleroz, inme, Parkinson hastalığı, nöropatik ağrı ve diğer nörolojik hastalıkları kapsayan hayvan modellerinde Rho-kinaz sinyal yolağının aktivitesinin anormal şekilde arttığı ve ROCK inhibitörlerinin hastalığa neden olan patolojik durumu azalttığı ya da oluşumunu engellediği bulunmuştur. Bu verilerden yola çıkarak ROCK inhibitörlerinin nörodejeneratif hastalıklar için tedavi edici ajanlar olabilecekleri düşünülmektedir (90).

Rho-GTPazlar, sinir hücrelerinde nöronal göç ve polarizasyon, akson büyümesi, dendrit ve sinaps oluşumu ve plastisite dahil olmak üzere nöronal morfogenezin düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır (4,68,97). Nörit büyümesi ve gelişimi, nöral plastisite için esastır. Rho proteinleri nöronal hücrelerin gelişiminde ve hücre iskelet yapılanmasında önemli rol oynamaktadır (98). Ayrıca GEF ve GAP proteinleri de sinir sisteminde oldukça yoğun bir şekilde bulunmaktadır (97). Özellikle ROCK2, *kollapsin response mediatör protein 2'yi* fosforile ederek sinir sisteminin gelişiminde *semaphorin 3A'nın* oluşturduğu akson uzamasında görevlidir (90).

Rho-kinaz'ın anormal sinyalleşmesi, sinaps ve *spinde* görülen deformasyonlar ile beyinde bozukluklar görülmektedir. Örneğin Rho-GTPaz'ın düzenleyicileri ve efektörlerinde görülen bozulmaların insanlarda mental retardasyon, Rett sendorumu, şizofreni ve otizm gibi hastalıkların patogenezinde rol oynadığı saptanmıştır (2). Ayrıca farelerde yapılan majör depresyon modellemesinde davranış bozukluğu görülen farelerde, sinapslarda bozulmalar ve Rho-kinaz yolağında anormal sinyalleşme olduğu görülmüştür (99).

ROCK inhibitörleri iskemik serebrovasküler hastalıklar, omurilik yaralanması, Alzheimer ve Parkinson hastalığı dahil olmak üzere çeşitli nörolojik hastalıkların tedavilerinde kullanılmaktadır. İnsanlarda ve hayvanlarda yapılan çeşitli çalışmalarda Rho-kinaz yolağının aşırı aktivasyonunun spinal kord yaralanmasının patofizyolojisinde rol oynadığı görülmüştür (87,100).

Spinal kord hasarı oluşturularak farelerde yapılan çalışmada Y-27632 ve fasudilin akson rejenerasyonunu arttırdığı ve fonksiyonel iyileşme sağlandığı gösterilmiştir. (87). Yine farelerde serebral iskemi modelinde yapılan başka bir çalışmada, Rho-kinaz yolağının aktif olduğu özellikle ROCK2'nin beyinde belirgin bir şekilde arttığı görülmüştür. Fasudil ve hidroksifasudilin serebral kan akışını arttırıp inflamatuvar yanıtları azaltarak glutamat kaynaklı nörotoksisiteyi azalttığı, hücre ölümünü inhibe ettiği ve nöronal hasara karşı koruma sağladığı görülmüştür (101).

Sato ve ark. (102) tarafından köpeklerde subaraknoid kanama modelinde yapılan çalışmada, Rho-kinaz yolağında aktivitenin arttığı ve deneyde kullanılan Y-27632'nin arteriyel düz kas kasılmasını önleyerek iyileşme sağladığı bulunmuştur.

Farelerde yapılan bir çalışmada ise ağrı yanıtı oluşumunda rol oynayan ROCK enziminin beyin ve omurilikte eksprese edildiği ve Y-27632'nin antinosiseptif etki oluşturduğu gösterilmiştir (13).

Sonuç olarak, Rho/Rho-kinaz sinyal yolağı santral sinir sistemi patolojilerinin tedavisi için potansiyel bir terapötik hedef olarak durmaktadır.

Rho-kinaz Yolağının Öğrenme ve Bellek ile İlişkisi

Öğrenme ve bellek formasyonun altında yatan moleküler mekanizma henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Ancak öğrenme ve bellek için hücresel düzeyde meydana gelen değişikliklerle sinapslarda oluşan güçlenmenin önemli olduğu bilinmektedir (103). GDP bağlı inaktif ve GTP bağlı aktif formlar arasında geçiş yapan Rho-kinaz sinyal yolağının nöroplastisite ve bellek fonksiyonlarının düzenleyerek, öğrenme ve bellekte temel bir rol oynadığı düşünülmektedir (17).

Rho-GTPazlar, aktin hücre iskeletinin düzenlenmesinde ve morfolojik değişiklikleri kapsayan birçok nöronal gelişim sürecinde yer alırlar. Öğrenme ve bellek için esas olan hipokampal piramidal nöronlarda ROCK aktivitesinin bozulmasıyla dentrit büyümesini engellediği görülmüştür. ROCK aktivitesinin düzenlenmesi, dentrit morfolojisinde ve plastisitede önemli rol oynamaktadır (4).

Santral sinir sistemi hasarında anormal artmış ROCK aktivitesiyle nöronda büyüme konisinin çökmesi, stres liflerinin oluşumu ve aksonal retraksiyon gibi değişimler görülür. Yapılan çalışmalarda ROCK inhibisyonunun, öğrenme ve bellek yapılanmasında önemli yapılardan biri olan hipokampüste sinaptik plastisiteyi arttırdığı ve dentat girusta ise nöron yenilenmesini sağladığı gösterilmiştir (7,57,104).

Sıçanlar üzerinde yapılan bir çalışmada striatuma uygulanan Y-27632'nin, Rho-kinaz yolağını inhibe ettiği ve işler belleğin bozduğu gözlenmiştir. Bu sonuçlar ile Rho-kinaz yolağının aktivitesinin nöroplastisite değişimi ile işler belleğe aracılık edebileceği görülmüştür (17).

Lamprecht ve ark. (105) tarafından yapılan bir çalışmada ipuçlu korku koşullanma testinden 30 dk önce lateral amigdalaya uygulanan Y-27632'nin uzun süreli korku belleğinin edinimini inhibe ettiğini göstermişlerdir.

Yapılan başka bir çalışmada Morris su labirenti testinde eğitimlerden sonra dorsal hipokampüse yapılan Y-27632'nin, belleğin uzun süreli depolanmasını engellediği bildirilmiştir (106).

Rho-kinaz yolağı ile yapılan santral sinir sistemi çalışmalarının sonuçları oldukça komplekstir ve birçok nokta hala açıklanamamıştır. Dolayısıyla, bu tezde ROCK enzim inhibitörü olan Y-27632'nin hipokampüs bağımlı bir öğrenme bellek testi olan bağlamsal korku koşullanma testinde edinim, konsolidasyon, geri çağırma, sönme ve rekonsolidasyon aşamaları üzerinde etkilerini test ettik. Ayrıca bağlamsal korku koşullanmış farelerin hipokampüslerinde ROCK aktivitesinin nasıl değiştiğini, ROCK enzim aktivite kiti kullanarak inceledik.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Trakya Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan 28.08.2020 tarihinde 2020/08 no'lu oturumda 2020/10 protokol no'su ile onaylandı. Daha sonra bağlamsal korku koşullanma testine tabi tutulmayan grup eklenmesi amacıyla etik kurula değişiklik önerisi verildi ve bu değişiklik isteğine 29.12.2021 tarihinde 2021/12 no'lu oturumda onay verildi. Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından TÜBAP-2020/132 proje numarası ile desteklendi. Deneyler T.Ü. Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında gerçekleştirildi.

DENEY GRUPLARI

Bu çalışmada Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Biriminden temin edilen toplam 303 adet, 20-30 gr ağırlığında 2-3 aylık Balb-c erkek fareler kullanılmıştır. Fareler davranış deneylerinden bir hafta önce anabilim dalımızda bulunan hayvan barınma ünitesine getirilmiştir. Deneylerden önce fareler, tartılıp numaralandırıldıktan sonra her kafeste ortalama 7-8 hayvan olacak şekilde kafeslere alındılar. Deneklerin hepsi havalandırma ve ısıtma sistemleri otomatik olarak ayarlanan standart laboratuvar koşullarında (21±1 °C, %55 nem ve 12 saat aydınlık/karanlık siklusu) barındırıldılar. Farelerin beslenmesinde, standart fare yemi ve musluk suyu kullanılmakla birlikte, yem ve su miktarında herhangi bir kısıtlama yapılmadı.

Deney hayvanları gruplarına uygun olan çözücü (serum fizyolojik) ya da ROCK inhibitörü Y-27632 üç farklı dozda (1, 3, 10 mg/kg) uygulandı. Enjeksiyonlar gruplara uygun olarak deneylerden 30 dk önce intraperitoneal yolla yapıldı. Deney hayvanlarına sırasıyla rota-rod, bağlamsal korku koşullanma ve açık alan testleri uygulandı.

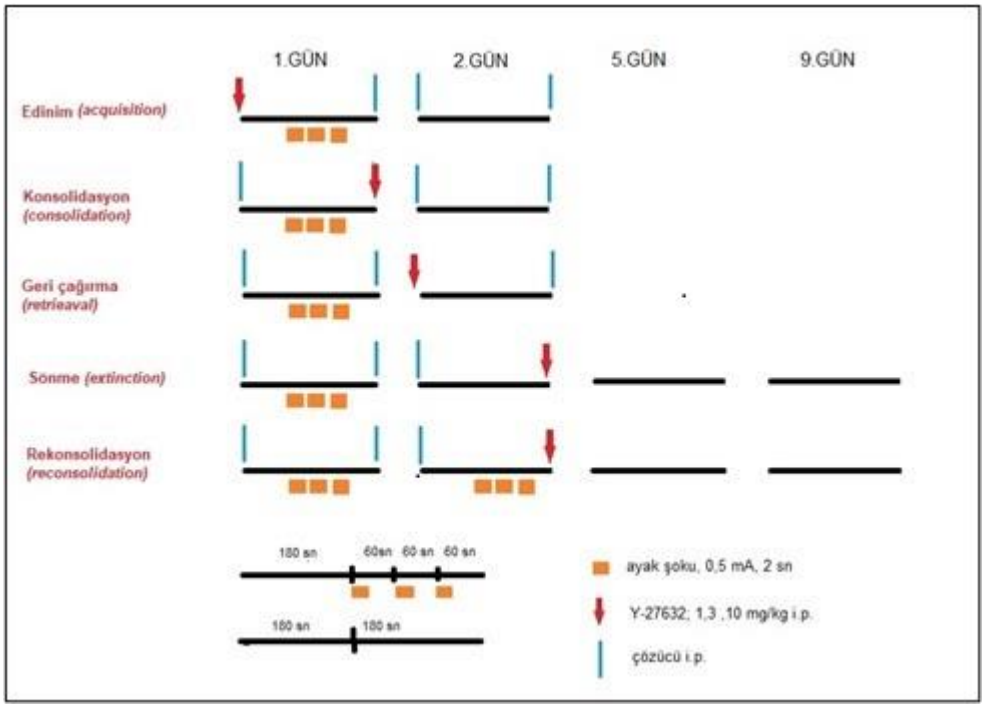
Davranış deneyleri tamamlanan hayvanlara hızla servikal dislokasyon uygulandı ve beyin dokuları alındı. Alınan beyin dokuları hızla -80^{0}C'de buzdolabına kaldırıldı ve tüm deneyler tamamlanana kadar dokular saklandı. Alınan beyin dokularından hipokampüs bölgesinde punch biyopsi ile örnek alınıp, dokulardaki Rho-kinaz aktivitesi ticari kitler kullanılarak değerlendirildi.

Çalışma sürecinde enjeksiyonlar sırasında yaşanan hayvan kayıpları yerine yeni denekler alınarak kapatıldı.

DENEY PLANI

Hayvanların bağlamsal korku koşullanmada öğrenme yani edinim, konsolidasyon, geri çağırma, sönme ve rekonsolidasyon süreçlerini değerlendirmek için; 1. gün, 2. gün, 5. gün ve 9. gün davranış deneyleri uygulandı. Gruplar öğrenme, konsolidasyon ve geri çağırma için 1. ve 2. yani 2 günlük; sönme ve rekonsolidasyon için ise 1., 2., 5. ve 9. günlerde toplam 9 günlük deney sürecine tabi tutuldu. Ayrıca hayvanların maruz kaldığı enjeksiyon sayısını eşit tutabilmek ve enjeksiyonun kendi başına yarattığı anksiyeteyi göz ardı edebilmek için Y-27632 olmayan günlerde hayvanlara çözücü enjeksiyonu yapıldı.

Deney planı Şekil 6'da şematize edilmiştir.



Şekil 6. Deney planı

Deneyin 1. günü:

Edinim: Bağlamsal korku koşullanma testinden 30 dk önce Y-27632 enjeksiyonu uygulandı. Toplam 360 sn sürecek testin son 180 sn'sinin, 3 ayrı 60 sn'lik periyotlarının başlangıcında, 2 sn süre ile ayak şoku uygulandı.

Konsolidasyon: Toplam 360 sn sürecek testin son 180 sn'sinin, 3 ayrı 60 sn'lik periyotlarının başlangıcında, 2 sn süre ile ayak şoku uygulandı ve bağlamsal korku koşullanma testinin hemen bitiminde Y-27632 enjeksiyonu yapıldı.

Geri Çağırma: Toplam 360 sn sürecek bağlamsal korku koşullanma testinin son 180 sn'nin, 3 ayrı 60 sn'lik periyotlarının başlangıcında, 2 sn süre ile ayak şoku uygulandı.

Sönme: Toplam 360 sn sürecek bağlamsal korku koşullanma testinin son 180 sn'sinin, 3 ayrı 60 sn'lik periyotlarının başlangıcında, 2 sn süre ile ayak şoku uygulandı.

Rekonsolidasyon: Toplam 360 sn sürecek bağlamsal korku koşullanma testinin son 180 sn'sinin, 3 ayrı 60 sn'lik periyotlarının başlangıcında, 2 sn süre ile ayak şoku uygulandı.

Deneyin 2. günü:

Edinim: Fareler 360 sn bağlamsal korku koşullanma test ortamında bırakıldı.

Konsolidasyon: Fareler 360 sn bağlamsal korku koşullanma test ortamında bırakıldı.

Geri Çağırma: Farelere bağlamsal korku koşullanma testinden 30 dk önce Y-27632 enjeksiyonu uygulandı. Fareler 360 sn test ortamında bırakıldı.

Sönme: Fareler 360 sn test ortamında bırakıldı ve bağlamsal korku koşullanma testinin hemen bitiminde Y-27632 enjeksiyonu yapıldı.

Rekonsolidasyon: Toplam 360 sn sürecek testin son 180 sn'sinin, 3 ayrı 60 sn'lik periyotlarının başlangıcında, 2 sn süre ile ayak şoku uygulandı ve bağlamsal korku koşullanma testinin hemen bitiminde Y-27632 enjeksiyonu yapıldı.

Deneyin 5. günü:

Sönme ve rekonsolidasyon deneylerinde fareler 360 sn test ortamında bırakıldı.

Deneyin 9. günü:

Sönme ve rekonsolidasyon deneylerinde fareler 360 sn test ortamında bırakıldı.

Deney grupları ve gruplardaki farelere yapılan enjeksiyonlar Tablo 3'te açıklanmıştır.

Tablo 3. Deney grupları ve uygulanan işlemler

Grup 1	Deneyin 1.günü davranış deneyleri öncesi çözücü enjeksiyonu yapılan ve elektroşok alan 2. günün sonunda beyin dokusu alınan grup
Grup 2:	Deneyin 1.günü elektroşok alan ve deney sonrası çözücü enjeksiyonu yapılan, 2. günün sonunda beyin dokusu alınan grup
Grup 3:	Deneyin 1. günü elektroşok alan, 2.günü davranış deneyleri öncesi çözücü enjeksiyonu yapılan ve 2. günün sonunda beyin dokusu alınan grup
Grup 4:	Deneyin 1. günü elektroşok alan, 2.günü davranış deneyleri sonrası çözücü enjeksiyonu yapılan ve 9. günün sonunda beyin dokusu alınan grup
Grup 5:	Deneyin 1. günü elektroşok alan, 2.günü tekrar elektroşok alan ve davranış deneyleri sonrası çözücü enjeksiyonu yapılan 9. günün sonunda beyin dokusu alınan grup
Grup 6:	Deneyin 1.günü davranış deneyleri öncesi 1 mg/kg Y-27632 enjeksiyonu yapılan ve elektroşok alan 2. günün sonunda beyin dokusu alınan grup
Grup 7:	Deneyin 1.günü elektroşok alan ve davranış deneyleri sonrası 1 mg/kg Y-27632 enjeksiyonu yapılan, 2. günün sonunda beyin dokusu alınan grup
Grup 8:	Deneyin 1. günü elektroşok alan, 2.günü davranış deneyleri öncesi 1 mg/kg Y-27632 enjeksiyonu yapılan ve 2. günün sonunda beyin dokusu alınan grup
Grup 9:	Deneyin 1. günü elektroşok alan, 2.günü davranış deneyleri sonrası 1 mg/kg Y-27632 enjeksiyonu yapılan ve 9. günün sonunda beyin dokusu alınan grup
Grup 10:	Deneyin 1. günü elektroşok alan, 2.günü tekrar elektroşok alan ve davranış deneyleri sonrası 1 mg/kg Y-27632 enjeksiyonu yapılan 9. günün sonunda beyin dokusu alınan grup
Grup 11:	Deneyin 1.günü davranış deneyleri öncesi 3 mg/kg Y-27632 enjeksiyonu yapılan ve elektroşok alan 2. günün sonunda beyin dokusu alınan grup
Grup 12:	Deneyin 1.günü davranış deneyleri sonrası 3 mg/kg Y-27632 enjeksiyonu yapılan ve elektroşok alan, 2. günün sonunda beyin dokusu alınan grup
Grup 13:	Deneyin 1. günü elektroşok alan, 2.günü davranış deneyleri öncesi 3 mg/kg Y-27632 enjeksiyonu yapılan ve 2. günün sonunda beyin dokusu alınan grup
Grup 14:	Deneyin 1. günü elektroşok alan, 2.günü davranış deneyleri sonrası 3 mg/kg Y-27632 enjeksiyonu yapılan ve 9. günün sonunda beyin dokusu alınan grup
Grup 15:	Deneyin 1. günü elektroşok alan, 2.günü tekrar elektroşok alan ve davranış deneyleri sonrası 3 mg/kg Y-27632 enjeksiyonu yapılan 9. günün sonunda beyin dokusu alınan grup
Grup 16:	Deneyin 1.günü davranış deneyleri öncesi 3 mg/kg Y-27632 enjeksiyonu yapılan ve elektroşok alan 2. günün sonunda beyin dokusu alınan grup
Grup 17:	Deneyin 1.günü davranış deneyleri sonrası 3 mg/kg Y-27632 enjeksiyonu yapılan ve elektroşok alan, 2. günün sonunda beyin dokusu alınan grup
Grup 18:	Deneyin 1. günü elektroşok alan, 2.günü davranış deneyleri öncesi 3 mg/kg Y-27632 enjeksiyonu yapılan ve 2. günün sonunda beyin dokusu alınan grup
Grup 19:	Deneyin 1. günü elektroşok alan, 2.günü davranış deneyleri sonrası 3 mg/kg Y-27632 enjeksiyonu yapılan ve 9. günün sonunda beyin dokusu alınan grup
Grup 20:	Deneyin 1. günü elektroşok alan, 2.günü tekrar elektroşok alan ve davranış deneyleri sonrası 3 mg/kg Y-27632 enjeksiyonu yapılan 9. günün sonunda beyin dokusu alınan grup
Grup 21:	Bağlamsal korku koşullanma deneyine tabi tutulmayan grup (sonradan eklenen grup, n=3)

DENEYLERDE UYGULANAN DAVRANIŞ TESTLERİ

Farelere, motor koordinasyonlarının değerlendirilebilmesi için rota-rod performans testi; lokomotor aktiviteyi değerlendirmek için açık alan testi, korku belleğinin oluşumu ve sönmesi için ise bağlamsal korku koşullanma testi uygulandı.

Rota-rod Performans Testi

Rota-rod performans testi, hayvanların motor koordinasyonlarının değerlendirildiği bir testtir. Deney hayvanlarının belirli bir yükseklikte ve sabit bir hızla dönen mil (rod) üzerinde dengede kalarak yürümesi veya aşağıya düşmemesi prensibine dayanmaktadır.

Rota-rod performans testi May 972-A Rota-Rod Activitiy Metter cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. Düzenek deney hayvanlarının birbirlerini göremeyecekleri şekilde tasarlanmış yan yana kabinlerden oluşmaktadır. Her kabinin ortasından silindir şeklinde yatay mil geçmektedir. Hayvan aşağı düşmemek için milin döndüğü yönün tersi yönde yürümeye çalışır. Deneyde kullanılan rota-rod cihazı Şekil 7'de gösterilmiştir.

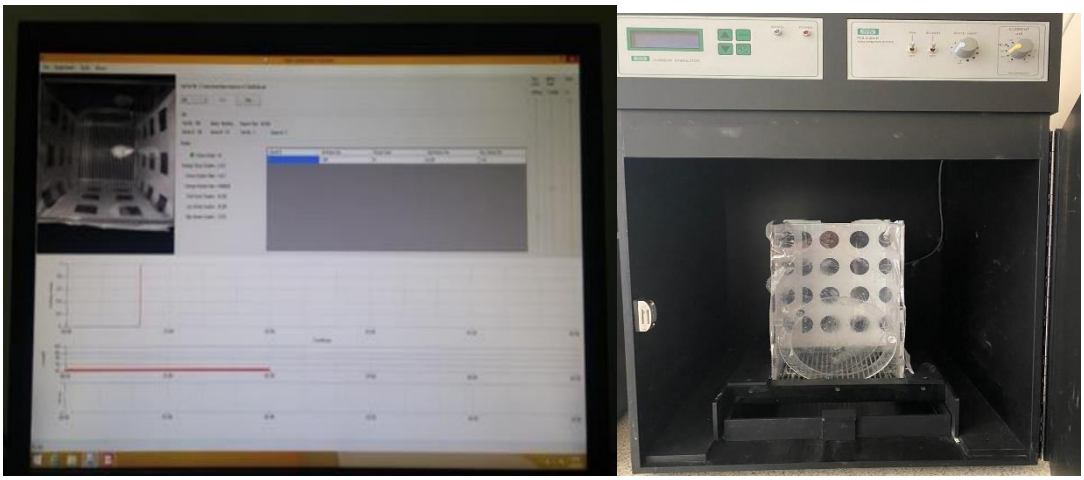
Fareler mil üzerine yerleştirildi ve mil üstünde en uzun kaldıkları süre kaydedildi. Çalışmamızda *cut off* değeri 180 sn olarak kabul edildi.



Şekil 7. Rota-Rod cihazı

Bağlamsal Korku Koşullanma Testi

Bağlamsal korku koşullanma testi farelerde öğrenme ve bellek fonksiyonlarının değerlendirilmesinde kullanılan hipokampüs bağımlı bir testtir. Deney "May Current Stimulator/FCS 21200-R Fear Condition System" ile yapılmıştır. Dış kısmı siyah mat pleksiglas malzemeden oluşmaktadır. İç kısmı şeffaf pleksiglas malzemeden yapılmış bir kabin ve tabanında bulunan çelik ızgaradan oluşmaktadır. Bu çelik ızgara aracılığı ile hayvanlara ayarlanabilir şiddette elektroşok uygulanmaktadır. Şeffaf pleksiglas iç bölümünün ön kısmında 16 cm çapında daire şeklinde kapısı mevcuttur. Tavanda ise aydınlatma amaçlı beyaz ışık bulunmaktadır. Düzeneğin tabanında farelerin dışkılarının toplandığı çıkarılabilir çekmece bulunmaktadır. Kullanılan korku koşullanma düzeneği Şekil 8'de gösterilmiştir.



Şekil 8. Korku koşullanma cihazı: sol kısım yazılım programı, sağ kısım kafes bölümü

Bağlamsal korku koşullanma testi, iki günlük bir davranış testidir. Çalışmamızda fareler grup özelliklerine göre belirli günlerde deney protokolüne tabi tutuldu. Bütün protokollerde bağlamsal korku koşullanma testinin birinci gününde farelere ilk 180 sn'lik periyodunda hiç elektroşok uygulanmadı ikinci 180 sn'de ise eşit aralıklarla 2 sn boyunca 0.5 mA elektroşok uygulandı. Deneyin 2. gününde ise rekonsolidasyon grupları dışında kalan gruplara elektroşok uygulanmadı sadece 6 dk boyunca deney düzeneğinde tutuldular ve toplam donma süreleri hesaplandı. Rekonsolidasyon gruplarında ise farelere 2. günde de deneyin son 180 sn'lik periyodunda eşit aralıklarla 2 sn boyunca 0.5 mA elektroşok uygulandı. Deney hayvanının çevresel ipuçlarından faydalanması için aynı kafeste ve kafesin çevresi damalı bir kâğıt ile kaplanmıştır.

Bu deneyde farelerin toplam donma süreleri öğrenme ve bellek süreçlerini değerlendirmek için kullanıldı.

Açık Alan Testi

Açık alan testi, kemirgenlerde anksiyete ve lokomotor aktivitenin değerlendirilebilmesi için kullanılan bir testtir ve ilk kez Hall tarafından tanımlanmıştır. Hall ve arkadaşları tarafından daire olarak tanımlanan açık alan testinin kare versiyonu Soubrie tarafından geliştirilmiştir (107). Çalışmamızda açık alan testi hayvanların lokomotor aktivitesini değerlendirmek amacıyla kullanıldı.

Açık alan testini düzeneği üzeri açık, dört duvarı ve tabanı siyah mat pleksiglas malzemeden yapılmış, 60 cm x 60 cm boyutunda bir kutudur. Deneyde fare bu düzenek içinde serbest bırakıldı ve tavana sabitlenmiş kamera ile 10 dk boyunca kayıt alındı. Deney boş, dışarıdan ışık almayan ve her zaman sabit ışık kaynağı ile aydınlatılan, duvarlarında ses yalıtımı olan özel bir odada bütün çevresel faktörler sabit tutularak yapıldı. Kamera ile alınan video kayıtları Ethovision XT 11,5 (Noldus, Hollanda) programı aracılığıyla analiz edildi. Bu programla farenin arka ayaklar üzerine kalkma (şahlanma, *rearing*), *grooming* gibi hareketleri ile toplam gezindiği mesafe, merkez alanda geçirilen süre, yürüme hızı gibi veriler hesaplanabilir. Bu verilerden *rearing, grooming*, merkez alanda geçirilen süre gibi veriler farelerin anksiyetesi hakkında bilgi verirken; toplam gezilen mesafe ya da yürüme hızı gibi veriler farelerin lokomotor aktivitesi hakkında bilgi vermektedir. Her fare sonrası düzenek, %10'luk etanol ile temizlendi ve kurutuldu.

Edinim, konsolidasyon ve geri çağırma protokolündeki gruplarda açık alan testi 1. ve 2. günlerde; sönme ve rekonsolidasyon gruplarında ise 5. ve 9. günlerde uygulandı. Bulgular kısmında sadece donma sürelerini kullandığımız güne ait açık alan testi verileri sunuldu.

Açık alan test düzeneği Şekil 9'da gösterilmiştir.



Şekil 9. Açık alan test düzeneğinde kayıt ve video aktarımı

KULLANILAN İLAÇLAR

Deneyde ROCK inhibitörü olarak Y-27632 (BLDpharm, Londra) ve çözücü olarak %0,9 NaCl izotonik çözeltisi kullanıldı. 1, 3 ve 10 mg/kg dozlarında Y-27632, deney protokolüne göre deneyden 30 dk önce intraperitoneal olarak uygulandı.

ROCK AKTİVASYONUNUN ÖLÇÜLMESİ

Davranış deneyleri tamamlanana kadar -80ºC'de saklanan beyin dokularında hipokampüsden bilateral olarak punch biyopsi ile örnekler alındı. Hipokampüs bölgesi Paxinos'un fare beyin atlasına göre belirlendi (108). Alınan hipokampüs örnekleri tartıldı ve kaydedildi. Örnekler ağırlıklarına uygun miktarda proteaz ve fosfataz inhibitör içeren doku ekstraksiyon tamponu (ChemCruz®, Dallas, ABD) ile muamele edildi. +4°C'de cam boncuk kullanılarak homojenizasyon yapıldı. Homojenatlar 10.000 RPM'de 10 dakika santrifüj edilip süpernatantlar alındı. Çalışmamızda fare hipokampüs ağırlıkları çok az olduğundan ve enzim aktivitesi ölçümünde 90 mikrolitre homejenata ihtiyacımız olduğu için doku ekstraksiyon tamponu normalde kullanılması gerekenden 5 kat fazla konarak gereken hacim sağlanmaya çalışıldı.

ROCK enzim aktivitesinin ölçümü için "96-well ROCK Activity Kit" (Cell Biolabs, ABD) kullanıldı. Deney protokolü kit içinde verilen talimata göre yapıldı. Her gruptan yedişer hayvana ait örnek çalışıldı.

1. Substurat kuyucuklarına 90 µl dilüe edilmiş aktif ROCK2 ve örnekler koyuldu.
2. DTT ve ATP solüsyonu içeren 10X kinaz reaksiyon tamponundan (10 mM DTT, 2mM ATP, 10X kinaz tamponu) 10 µl eklenerek reaksiyon başlatıldı.
3. Plakanın üzeri parafin ile kapatıldı ve yavaşça çalkalayarak 30^0C'de inkübe edildi.
4. İnkübasyon sonrası her kuyucuğa pH 8'de 50 µl 0,5 M EDTA eklenerek kinaz reaksiyonu durduruldu.
5. Daha sonra kuyucuklar boşaltılıp kuyucuk başına 250 µl 1X yıkama tamponu ile 3 kez yıkanıp kurutuldu.
6. Her bir kuyucuğa kit içinde bulunan ve 1/1000 oranında dilüe edilen anti-phosfo-MYPT1 (Thr 696) antikorundan 100 µl ilave edildi ve oda sıcaklığında 1 saat çalkalayıcıda inkübe edildi.
7. 1 saat sonunda her kuyucuk boşaltılıp kuyucuk başına 250 µl 1X yıkama tamponu ile 3 kez yıkanıp, kurutuldu.
8. Daha sonra her bir kuyucuğa 100 µl HRP-konjuge ikincil antikor ilave edilmiş ve oda sıcaklığında hafif çalkalayarak 1 saat inkübe edildi.
9. 1 saat sonunda her kuyucuk boşaltılıp kuyucuk başına 250 µl 1X yıkama tamponu ile 3 kez yıkanıp, kurutuldu.
10. Yıkamadan sonra kuyucuklara 100 µl oda sıcaklığına getirilen substrat çözeltisi ilave edildi, oda sıcaklığında çalkalayıcıda 15 dk inkübe edildi.
11. Renk değişimi gözlendikten sonra kuyucuklara reaksiyonu durdurmak için 100 µl durdurma çözeltisi eklendi.
12. Son olarak kuyucukların absorbansı 450 nm spektrofotometrede okunarak, analiz tamamlandı.

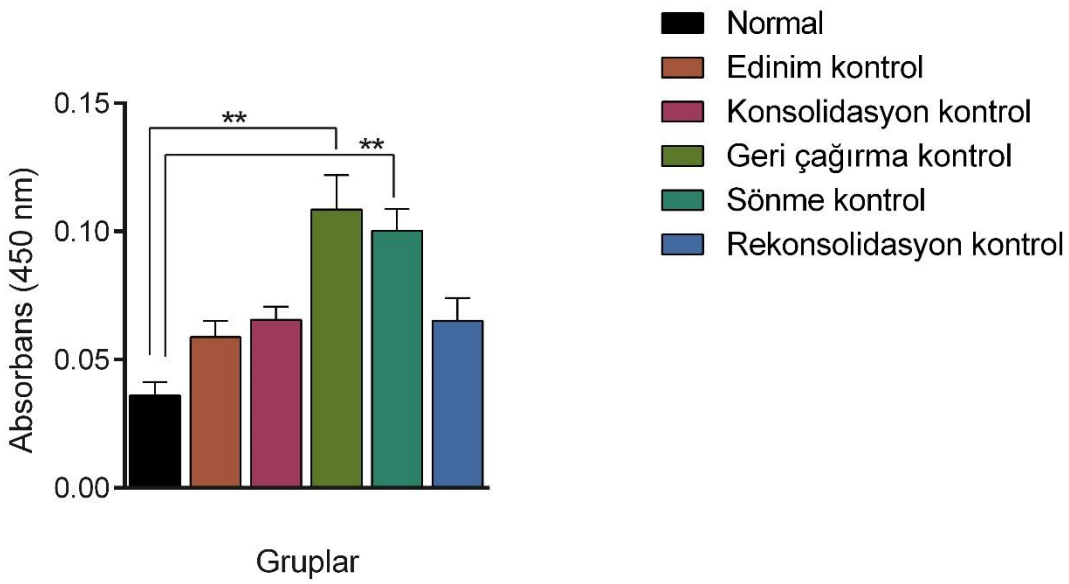
İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Verilerin sunulmasında tanımlayıcı istatistiksel analiz kullanıldı. Rota-rod, bağlamsal korku koşullanma, açık alan ve ROCK aktivite testlerinden elde edilen verilerin analizinde normal dağılım gösteren gruplardaki farklılıklarda tek yönlü ANOVA, normal dağılım göstermeyen gruplarda ise Kruskal Wallis varyans analizi kullanıldı. Analizler Graphpad Prism 6.0 for Mac OS X yazılımında gerçekleştirildi ve $p<0,05$ anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

ROCK ENZİM AKTİVİTESİ SONUÇLARI

ROCK enzim aktivitesi bulguları iki başlık altında sunulmuştur. Birinci bölümde tüm protokollere ait kontrol grupları ile bağlamsal korku koşullanma protokolüne tabi tutulmayan farelerin absorbans düzeyleri karşılaştırıldı. Bu gruplarda edinim, konsolidasyon ve rekonsolidasyon protokollerinde normal hayvanlara göre anlamlı fark görülmezken; geri çağırma ve sönme protokollerinde normal hayvanlara göre ROCK enzim aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış ($p<0,01$) görüldü (Şekil 10).



Şekil 10. Kontrol gruplarının absorbans değerleri

(**: p<0,01. Normal grup için n=3, diğer gruplar için n=7, Kruskal Wallis testi *post hoc Dunn* testi. Grafiklerdeki dikey çizgiler standart hatayı göstermektedir).

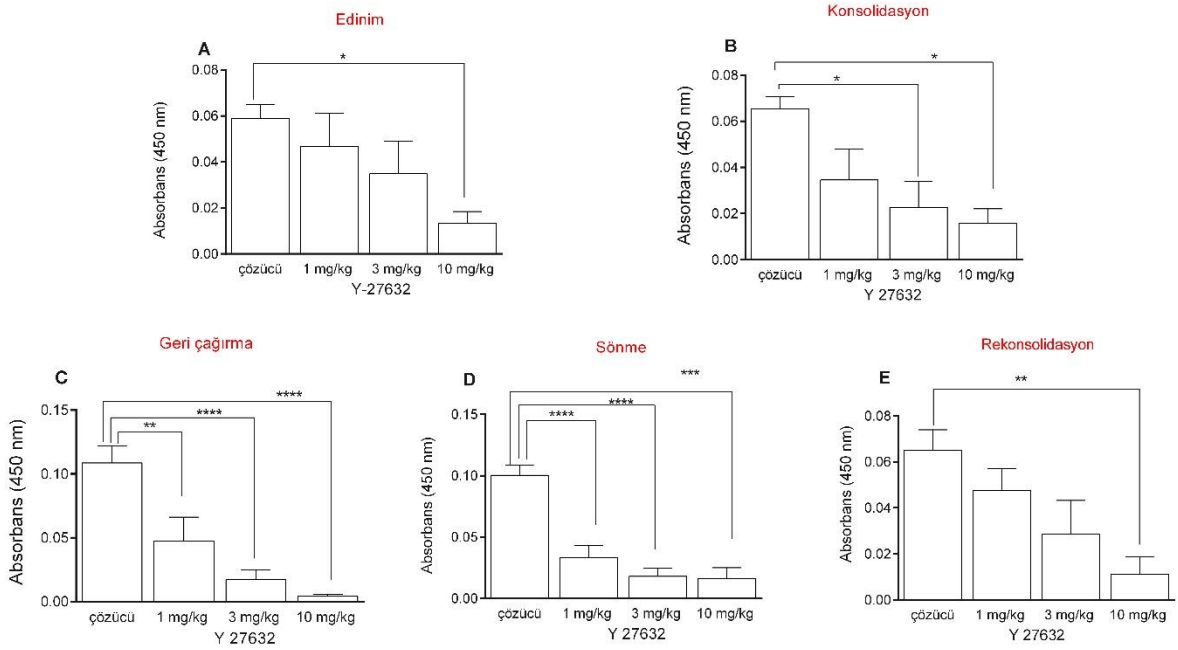
Kontrol grubu ile farklı dozlarda Y-27632 uygulanan gruplar arasındaki ROCK enzim aktivitesi karşılaştırılmaları Şekil 11'de sunulmuştur. Edinim protokolünde 1 ve 3 mg/kg Y-27632 değil ama 10 mg/kg Y-27632, ROCK aktivitesini anlamlı olarak baskıladı ($p<0,05$) (Şekil 11A).

Konsolidasyon protokolünde ise kontrol grupları ile 3 mg/kg ve 10 mg/kg Y-27632 uygulanan gruplarda ROCK aktivitesi anlamlı olarak ($p<0,05$) azaldı (Şekil 11B).

Geri çağırmada 1, 3 ve 10 mg/kg Y-27632 uygulanan gruplarda ROCK enzim aktivitesinin her dozda anlamlı olarak (sırasıyla $p<0,01$; $p<0,0001$; $p<0,0001$) baskılandığı bulundu (Şekil 11C).

Sönme protokolü için de 1, 3 ve 10 mg/kg Y-27632 uygulanan gruplarda ROCK enzim aktivitesinin her dozda anlamlı olarak azalttığı (sırasıyla $p<0,0001$; $p<0,0001$; $p<0,001$) görüldü (Şekil 11D).

Rekonsolidasyon protokolünde 10 mg/kg Y-27632 ROCK enzim aktivitesini anlamlı olarak ($p<0,01$) baskıladı (Şekil 11E).

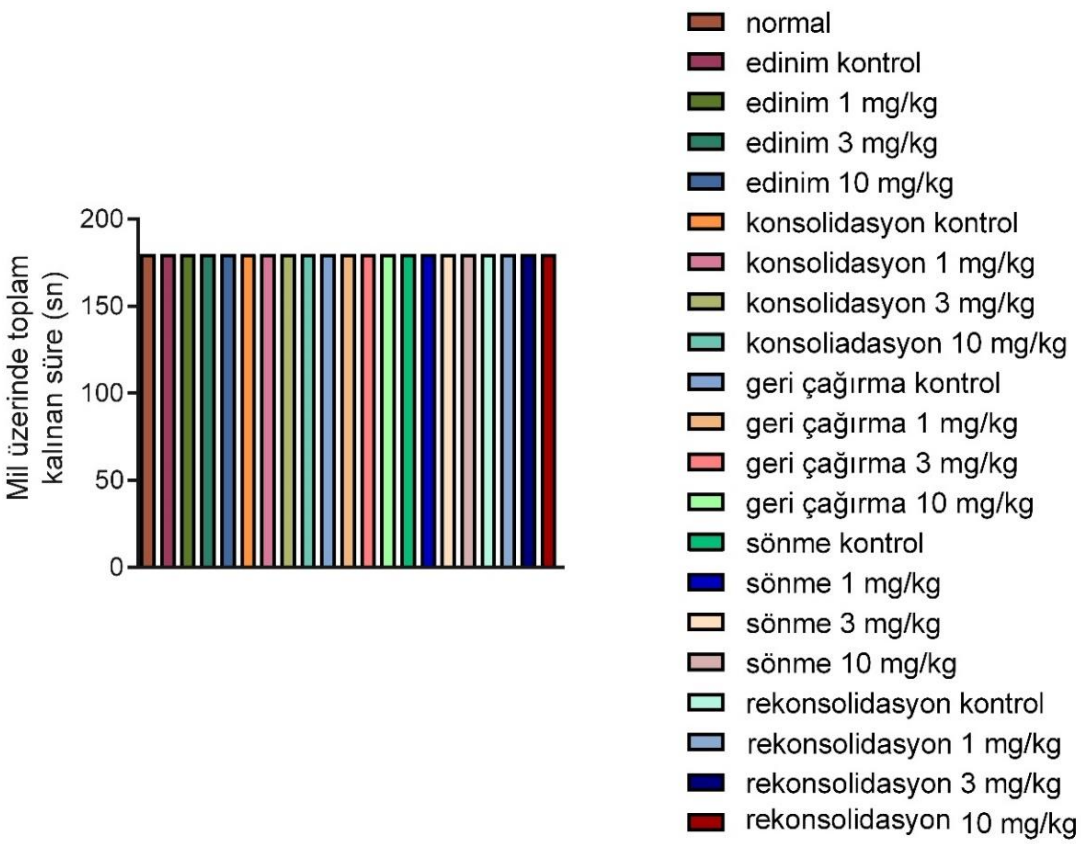


Şekil 11. ROCK enzim aktivitesi: A) Edinim, B) Konsolidasyon, C) Geri çağırma, D) Sönme, E) Rekonsolidasyon

(*: p<0,05, **: p<0.01, ***: p<0,001, ****: p<0,0001. Her grup için n=7, tek yönlü varyans analizi ANOVA, *post hoc Dunnett* testi. Grafiklerdeki dikey çizgiler standart hatayı göstermektedir).

ROTA-ROD PERFORMANS TESTİ SONUÇLARI

Serum fizyolojik ya da Y-27632 (1, 3 ve 10 mg/kg) uygulanan gruplar için mil üzerinde kalınan en uzun süre açısından anlamlı bir fark yoktu. *Cut off* değeri olarak kabul edilen 180 sn boyunca tüm hayvanlar mil üzerinde kaldı. Grupların mil üzerinde en uzun kaldıkları süre (sn) Şekil 12'de gösterilmiştir.

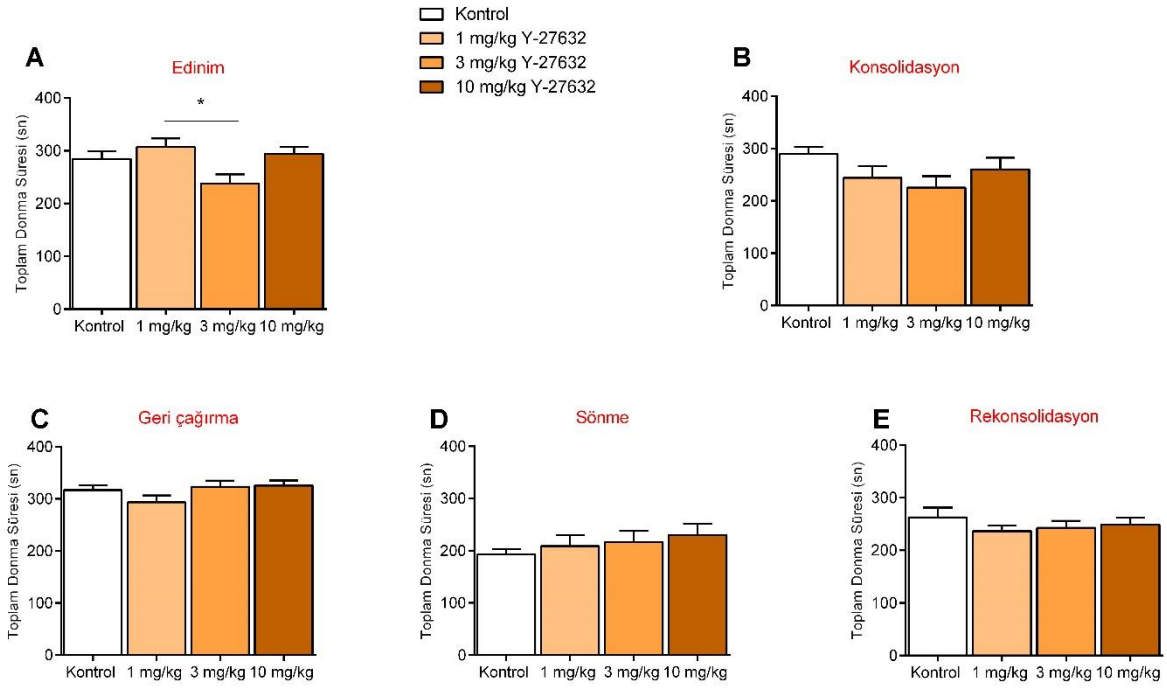


Şekil 12. Rota-rod cihazında mil üzerinde kalınan en uzun süre
(Tek yönlü varyans analizi ANOVA. Grafiklerdeki dikey çizgiler standart hatayı göstermektedir).

BAĞLAMSAL KORKU KOŞULLANMA TESTİ SONUÇLARI

Bağlamsal korku koşullanma testinde, edinimde kontrol grubu ile farklı dozlarda Y-27632 uygulanan gruplar arasında toplam donma süresi açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu. Ancak gruplar arasında çoklu karşılaştırma yapıldığında, edinimde 1mg/kg ve 3 mg/kg Y-27632 grupları arasında istatistiksel fark ($p<0,05$) vardı (Şekil 13A).

Konsolidasyon, geri çağırma, sönme ve rekonsolidasyonun değerlendirildiği artan dozlarda Y-27632 uygulanan gruplar ile kontrol grubu arasında toplam donma süresi açısından anlamlı fark görülmedi.



Şekil 13. Bağlamsal korku koşullanma testinde toplam donma süreleri; A) Edinim, B) Konsolidasyon, C) Geri çağırma, D) Sönme, E) Rekonsolidasyon
(*$p<0,05$. Her grup için n=15, tek yönlü varyans analizi ANOVA, *post hoc Tukey* testi. Grafiklerdeki dikey çizgiler standart hatayı göstermektedir.)

AÇIK ALAN TESTİ SONUÇLARI

Bu çalışmada açık alan testi sadece lokomotor aktiviteyi değerlendirmek amacıyla kullanıldı. Bu nedenle toplam gezilen mesafe ve yürüme hızı verileri sunuldu. Açık alan testi gruplara uygun olarak farklı günlerde yapıldı. Aşağıdaki sonuçlar bağlamsal korku koşullanma testinde toplam donma süresi verisini kullandığımız güne ait açık alan testi sonuçlarıdır.

Toplam Gezilen Mesafe

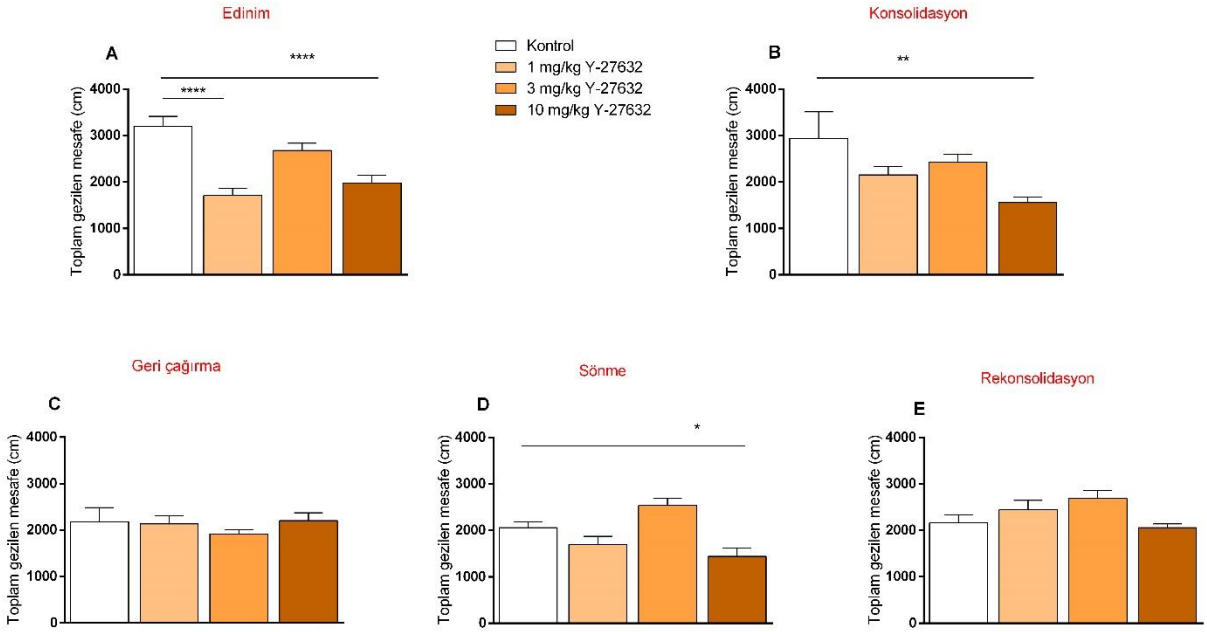
Edinim protokolünde 3 mg/kg Y-27632 değil ama 1 ve 10 mg/kg Y-27632, toplam gezilen mesafeyi anlamlı ($p<0,0001$) bir şekilde azalttı (Şekil 14A).

Konsolidasyonda 10 mg/kg Y-27632 toplam gezilen mesafeyi anlamlı olarak ($p<0,01$) azalttı (Şekil 14B).

Geri çağırma gruplarında kontrol ve farklı dozlarda Y-27632 uygulanan gruplar arasında toplam gezilen mesafe açısından anlamlı bir fark bulunmadı (Şekil 14C).

Sönme protokolünde ise, 1 ve 3 mg/kg dozda Y-27632 değil ama 10 mg/kg Y-27632, farelerin toplam gezilen mesafelerini anlamlı olarak ($p<0,05$) azalttığı görüldü (Şekil 14D).

Rekonsolidasyon protokolünde farklı dozlarda Y-27632 uygulanan gruplar arasında, toplam gezilen mesafe açısından bir fark olmadığı bulundu (Şekil 14E).



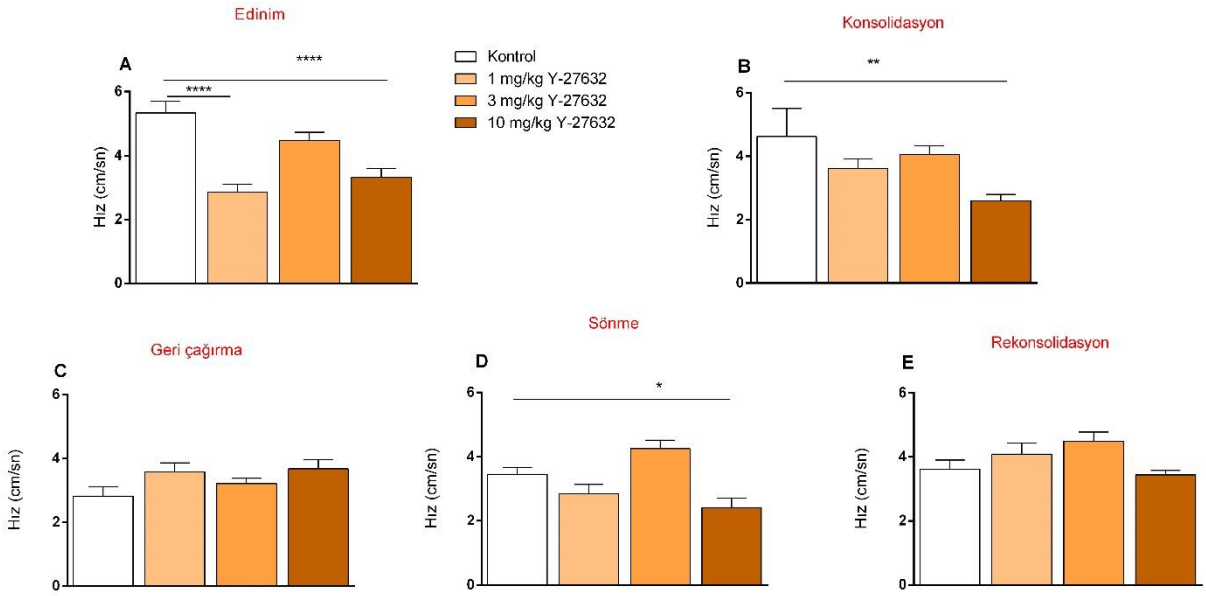
Şekil 14. Açık alan testinde toplam gezilen mesafe alanları: A) Edinim, B) Konsolidasyon, C) Geri çağırma, D) Sönme, E) Rekonsolidasyon
(*: p<0,05, **: p<0,01, ****: p<0,0001. Her grup için n=15, tek yönlü varyans analizi ANOVA, *post hoc Dunnett* testi. Grafiklerdeki dikey çizgiler standart hatayı göstermektedir.)

Yürüme Hızı

Edinim protokolünde 3 mg/kg Y-27632 değil ama 1 ve 10 mg/kg Y-27632, farelerin yürüme hızlarını anlamlı olarak (p<0,0001) azalttı (Şekil 15A).

Konsolidasyonda ve sönme protokollerinde ise sadece 10 mg/kg Y-27632 farelerin yürüme hızlarını anlamlı bir şekilde (sırasıyla p<0,01 ve p<0,05) azalttı (Şekil 15B ve 15D).

Geri çağırma ve rekonsolidasyon protokollerinde, kontrol grubu ile farklı dozlarda Y-27632 uygulanan gruplar arasında yürüme hızı açısından bir farklılık yoktu (Şekil 15C ve Şekil 15E).



Şekil 15. Açık alan testinde hız verileri: A-Edinim, B-Konsolidasyon, C-Geri çağırma, D-Sönme, E-Rekonsolidasyon.
(*: p<0,05, **: p<0,01, ****: p<0,0001. Her grup için n=15, tek yönlü varyans analiz ANOVA, *post hoc Dunnett* testi. Grafiklerdeki dikey çizgiler standart hatayı göstermektedir.)

TARTIŞMA

Öğrenme ve bellek oluşumu yüksek kognitif fonksiyonlardır ve altında yatan fizyolojik mekanizmalar halen tam olarak açıklığa kavuşmamıştır. Rho-kinaz yolağının öğrenme ve bellekte nasıl bir rol oynadığı da ilgi çekici bir çalışma alanıdır. Öğrenme ve bellek formasyonu sırasında gerçekleşen en önemli fizyolojik olaylardan biri sinaptik plastisitedir. Rho-kinaz yolağının sinaptik plastisitede önemli bir role sahip olduğu bilinmektedir (4). Araştırmamızda bağlamsal korku koşullanmada Rho-kinaz aktivitesinin; edinim, konsolidasyon, geri çağırma, sönme ve rekonsolidasyon süreçlerindeki değişimini ve Rho-kinaz yolağının inhibisyonunun oluşturacağı olası etkileri incelemeyi hedefledik. Çalışmamızdan elde ettiğimiz bulgular bir bütün olarak değerlendirildiğinde, bağlamsal korku koşullanmada ROCK enzim aktivitesinin geri çağırma ve sönmede arttığı ancak edinim, konsolidayon ve rekonsolidasyonda değişikliğe uğramadığı görüldü. Ayrıca ROCK inhibitörü Y-27632'nin farklı dozlarda uygulanmasının özellikle 10 mg/kg dozda hipokampüste enzim aktivitesini inhibe ettiği halde, bağlamsal korku koşullanma deneylerinde toplam donma süresi üzerine herhangi bir etki oluşturmadığı görüldü.

Hipokampüs bağımlı bir test olan bağlamsal korku koşullanma, öğrenme ve bellek çalışmalarında sıklıkla kullanılan bir modeldir. Öğrenme ve bellek yapılanmasında hipokampüsün yanı sıra korteks ve limbik sistemin bir parçası olan amigdala gibi bölgeler de rol almaktadır. Öğrenme ve bellek formasyonu sırasında bilgiler için edinim, konsolidasyon, geri çağırma, sönme ve rekonsolidasyon süreçleri gerçekleşmektedir (36).

Korku belleğinin iki formu olan bağlamsal ve ipuçlu korku koşullanmada amigdala ve hipokampüs çoğunlukla birlikte rol oynamaktadır. Ancak ipuçlu korku koşullanmada koşullu uyaranla ilgili girdilerde amigdaladaki nöral bağlantılar daha önemliyken; bağlamsal korku koşullanmada bağlamla ilişkili uyaranlarda hipokampüsteki devreler de rol oynamaktadır (59).

Korku belleğinin ediniminde ve depolanmasında önemli bir diğer bölge olan entorinal korteks, glutamaterjik projeksiyonlarla amigdalanın bazolateral bölgesini aktive etmekte ve NMDA reseptörleriyle uzun süreli potansiyalizasyonu indüklemektedir (58). Dolcos ve ark. (109) insanlarda yaptığı fonksiyonel görüntüleme çalışmaları ile Maren ve Fanselow (60) ise sıçanlarda yaptığı davranış deneyleri ile entorinal korteks, hipokampüs ve BLA arasındaki projeksiyonlarda sinaptik plastisitenin, bağlamsal korku koşullanma süreçleri için gerekli olduğunu göstermişlerdir.

Rho proteinleri küçük G proteinleridir ve metabolizma hastalıkları, kardiyovasküler, gastrointestinal, genitoüriner ve sinir sistemi fonksiyonlarında önemli görevler üstlenirler (82,110). Rho-kinaz yolağının santral sinir sistemindeki etkilerini incelediğimizde kognitif süreçlerde rol oynadığı bildirilmektedir. Rho proteinleri aktin hücre dinamiğinin değişikliklerini, nörit büyümesini, hücre dışı ve hücre içi sinyalleri koordine ederek sinaptik bağlantının düzenlenmesini, kognitif fonksiyonların geliştirilmesini ve belleğin oluşumunu sağlar (106,111). Bu aşamada nöronal değişim mekanizmaları, akson rejenerasyonu, sinaptik bağlantıların güçlenmesi ve bunların sonucu olarak sinaptik plastisite oluşumunu etkilemektedir (4,97).

Diana ve ark. (112) C57BL/6 türü farelere *cytotoxic necrotizing factor 1* (CNF-1)'i intraserebroventriküler yolla uygulayarak Rho proteinlerinin uzun süreli aktive kalması sağlamış ve bu durumun hipokampüsteki etkilerini korku koşullanma testlerinde ve Morris su labirentinde incelemişlerdir. Rho proteinlerinin sürekli aktive olmasının hem ipuçlu hem de bağlamsal korku koşullanma testlerinde farelerin öğrenmesini; su labirenti testinde de öğrenmeyi ve bellek oluşumunu artırdığını bildirmişlerdir.

Kang ve ark. (17) genç ve orta yaşlı sıçanlarda prefrontal korteks, dorsal hipokampus, dorsal striatum ve kortekste öğrenme ve bellek fonksiyonlarında Rho-kinaz aktivitesinin rolünü inceledikleri çalışmalarında orta yaşlı sıçanlarda Rho-kinaz aktivitesinin incelenen bölgelerden sadece striatumda azaldığı, fakat protein seviyesinin genç sıçanlarla karşılaştırıldığında değişmediğini bildirmişlerdir. Ayrıca aynı çalışmada genç sıçanlarda dorsal striatuma Y-27632 uygulanmasının, T labirent testinde işler belleği bozduğu gösterilmiştir.

Kognitif fonksiyonlarda bozulmayla karakterize olan hastalıklara bakıldığında ise ROCK yolağı aktivitesinin anormal şekilde arttığı ve bu anormal sinyalleşmenin sinapslarda, nöronlarda ve aksonlarda bozulmalara neden olduğu gösterilmiştir. Bu durumun mental gerilik, Rett sendorumu, şizofreni, stres bozuklukları, Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı ve otizm gibi hastalıkların patogenezinde ve nörogelişimsel bozukluklarda rol oynadığı bildirilmektedir (2,99). Serebral iskemili sıçanlarda, Rho-kinaz inhibitörü fasudilin bozulan öğrenme ve bellek fonksiyonunda kognitif iyileşme sağladığı Morris su labirenti testi ile gösterilmiştir (113). Jianjun ve ark. (114) sıçanlarda sepsise bağlı serebral hasar ve kognitif bozulmada kronik olarak uygulanan fasudil ve Y-27632'nin, ROCK enzimlerini ve sepsise bağlı inflamasyonu azalttığı ve Morris su labirenti testi ile de öğrenme ve bellek fonksiyonunda önemli bir kognitif iyileşme sağladığını göstermişlerdir.

Yaygın olarak görülen nörodejenaratif bir hastalık olan Alzheimer hastalığında yapılan çalışmalar Rho-kinaz yolağının önemine dikkat çekmektedir. Alzheimer hastalarında yapılan postmortem beyin dokusu incelemelerinde ROCK1 protein seviyelerinin arttığı ve bunun amiloid birikimi ile ilgili olabileceği bildirilmiştir (10). Bununla birlikte Rho-kinaz inhibitörleri Y-27632 ve HA-1077 hücre kültüründe amiloid plak birikimini azaltmaktadır (115). Alzheimer hastalığı için denenen sulindak ve indometazin gibi non-steroid antiinflamatuvar analjeziklerin Rho inhibisyonu yaparak amiloid β42 birikimini azalttığı da gösterilmiştir (116,117). Ayrıca yaşa bağlı meydana gelen nörodejeneratif değişikliklerde de özellikle substantia nigra'da RhoA ve ROCK2'nin ekspresyonunun ve ROCK enzim aktivitesinin arttığı gösterilmiştir (118). Rho/ROCK yolağının SSS'de inflamatuar olaylara karıştığı çeşitli çalışmalarla bildirilmiştir (13,119). Carcak ve ark. (120) genetik absans epilepsili sıçanlar üzerinde yaptıkları çalışmada ROCK inhibitörlerinin (Y-27632 ve fasudil) NSAAİ'lar gibi antiinflamatuar etkinliğe sahip olabileceğini bildirmişlerdir.

Öğrenme ve bellek çalışmalarında birçok deney modelinde Rho-kinaz yolağının rolü incelenmiştir (105,106,112). Ancak korku belleği alanında yapılan çalışmaların sayısı oldukça kısıtlıdır.

Bu nedenle biz de çalışmamızda hem öğrenme ve bellek oluşumu testi olarak hem de post-travmatik stres bozukluğu modeli olarak değerlendirilebilecek olan hipokampüs bağımlı bir test olan bağlamsal korku koşullanma testini kullanmayı tercih ettik. Travma sonrası stres bozukluğunda hipokampüs, mPFC ve amigdala arasındaki projeksiyonların farklılaştığı, korku belleğinde aşırı konsolidasyonun olduğu ve korkunun sönmesinde düzensizliklerin olduğu bildirilmektedir (58).

Wang ve ark. (121) nalokson ile oluşturulmuş morfin yoksunluk sendrom modelinde aktin polimerizasyonun kaçınma davranışındaki rolünü incelemişlerdir. Uyaranla karşılaşmadan önce hipokampüse uygulana Y-27632'nin, sıçanlarda kaçınma davranışının azaldığını göstermişlerdir ve bu azalmanın aktin polimerizasyonundaki azalmaya bağlı olabileceğini bildirmişlerdir.

Travma sonrası stres bozukluğu olan hastalarda, bağlamla hastayı tekrar karşılaştırarak yapılan terapilerle, amigdala ve hipokampüs arasındaki nöral bağlantıları düzenleyerek sönmeyi tetiklemek ve korkunun yenilenmesini engellemek amaçlanmaktadır (58,122). Korku koşullanma deneyleri aynı zamanda travma sonrası stres bozukluğu çalışmaları için model olarak kullanılabilmektedir. Çalışmamızda sönme protokolünde kontrol grubunda ROCK enzim aktivitesinin artması, Rho-kinaz inhibitörlerinin travma sonrası stres bozukluğunda tedavi stratejisi olabileceğini fikrini desteklemektedir.

Santral sinir sisteminde bellek çalışmalarında ROCK inhibitörü olarak daha çok fasudil kullanılmıştır. Y-27632'nin, fasudile kıyasla ROCK2'ye karşı daha yüksek bir potense sahip olduğu, beyin omurilik sıvısına geçtiği ve yarılanma ömrünün daha uzun olduğu bilinmektedir (80,123). Ayrıca fasudil karaciğerde aktif formuna dönüşmesi gereken bir inhibitörken Y-27632 için bu durum gerekli değildir. Bu özellikler, çalışmamızda Y-27632 tercih etmemize sebep olmuştur.

Korku koşullanma belleğinin oluşumunda rol oynayan edinim, konsolidasyon, geri çağırma, sönme ve rekonsolidasyon protokollerinde Rho-kinaz yolağının aktivitesinin ve Y-27632 ile ROCK inhibisyonunun nasıl sonuçlanacağını gösteren çalışma sayısı oldukça kısıtlıdır. Saitoh ve ark. (18) ipuçlu korku koşullanma testinde intraserebroventriküler yolla uygulanan Y-27632'nin edinim sürecindeki etkisini araştırmışlardır. Çalışmamız, sağlıklı farelerde, bağlamsal korku koşullanma modelinde edinim, konsolidasyon, geri çağırma, sönme ve rekonsolidasyon süreçlerinde ROCK enzim aktivitesinin nasıl değiştiğini ve ROCK inhibitörünün etkisinin incelendiği özgün bir çalışmadır. Elde ettiğimiz verilerin bu noktada diğer çalışmalar için yol gösterici olabileceği düşüncesindeyiz.

Bağlamsal korku koşullanmada amigdala ve hipokampüs arasındaki nöral devrelerin önemli bir role sahip olduğu bilinmektedir. Ayrıca korku belleğinin edinim, konsolidasyon, geri çağırma, sönme ve rekonsolidasyon aşamalarında da hem farklı beyin bölgeleri hem de farklı nörotransmiter/nöromodülatörler rol oynamaktadır (30,32) Bu alanda yapılan çalışmalarda elde edilen bulgular farklılıklar göstermektedir.

Biz çalışmamızda bağlamsal korku koşullanmada edinim, konsolidasyon ve rekonsolidasyonda ROCK aktivitesinin değişmediğini ancak geri çağırma ve sönmede ROCK aktivitesinin arttığını gösterdik. Literatürde bu bulguları karşılaştırabileceğimiz çalışma bulunmamaktadır. Verilerimiz oldukça kısıtlı olmasına karşın, çalışmamız sönme ve geri çağırma protokollerinde ROCK enzim aktivitesinin arttığının gösterildiği ilk çalışmadır.

Temel olarak bağlamsal korku koşullanmada sönme yeni bir öğrenme süreci olarak değerlendirilebilecekken çalışmamızda Rho-kinaz aktivitesinin edinimde artmayıp sönmede artıyor olması bize edinim ve sönmenin altında yatan farklı reseptörlerin ve post-reseptör olayların olabileceğini ya da farklı nörotransmiterlerin de rol oynuyor olabileceğini ve bu mekanizmaların Rho-kinaz yolağı ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca geri çağırmada da Rho-kinaz aktivitesinin artması, acaba hatırlama ve unutma süreçleri benzer mekanizmalara mı dayanıyor sorusunu akla getirmektedir.

Y-27632'nin oluşturduğu inhibisyonun bağlamsal korku koşullanma testinde edinim, konsolidasyon, geri çağırma, sönme ve rekonsolidasyon aşamalarında farelerin toplam donma sürelerinde anlamlı bir fark oluşturmadı. Tüm protokollerde özellikle 10 mg/kg dozda hipokampüste Rho-kinaz yolağı inhibe olmasına rağmen bu inhibisyon davranışta bir değişikliğe sebep olmamıştır.

Saitoh ve ark. (18) farelerde ipuçlu korku koşullanma modelinde intraserebroventriküler yolla korku koşullanma testinden önce uygulanan Y-27632'nin 10 nmol dozunda, edinimi artırdığını göstermişlerdir. Bu çalışmanın bulgularıyla bizim çalışmamızda edinim protokolünde elde ettiğimiz bulgular arasındaki zıtlık, bağlamsal korku koşullanma ve ipuçlu korku koşullanmanın oluşumundaki farklılıktan kaynaklanabileceğini düşünmekteyiz.

Lunardi ve ark. (124) tarafından sıçanlarda yapılan çalışmada, aynı zamanda ROCK enzim substratı olan LIMK'in spesifik olmayan inhibitörünün (BMS-5) dorsal hipokampüse uygulanmasıyla sağlanan inhibisyonun bağlamsal korku belleğinin edinim, konsolidasyon, geri çağırma, sönme ve rekonsolidasyon üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. Dorsal hipokampüsteki LIMK aktivitesinin, sıçanlarda bağlamsal korku koşullanmanın konsolidasyonu, edinimi, geri çağırma ve rekonsolidasyonu için gerekli olduğunu; sönme için ise gerekli olmadığını bildirilmişlerdir.

Lunardi ve ark. (124) yaptıkları bu çalışmada Rho-kinaz yolağını dolaylı olarak inhibe etmişlerdir. LIMK, Rho-kinaz yolağının substratı ve daha spesifik bir etki mekanizması yoludur. Bu çalışma sonuçları ile bizim çalışma sonuçlarımız çelişmektedir. Bu çelişki Rho-kinaz yolağının farklı noktalarda inhibe edilmesine, hayvan türünün farklılığına, ilacın uygulanış yolundaki farklılığa bağlı olarak ortaya çıkmış olabileceği gibi Rho-kinazın LIMK dışında başka alt-efektörleri *(downstream effector)* kullanmasından da kaynaklanmış olabilir.

Çalışmamızda ROCK inhibitörü Y-27632'nin farklı dozlarda (1, 3 ve 10 mg/kg) tek doz olarak uygulanmasının özellikle 10 mg/kg dozda tüm gruplarda hipokampüste ROCK enzim aktivitesini inhibe ettiği görüldü. Ancak bu inhibisyon bağlamsal korku koşullanma testinde bir etki oluşturmadı. Dash ve ark. (106) sıçanlarda yaptığı çalışmada Morris su labirentinde eğitimler sonrası hipokampüse uygulanan ROCK inhibitörü Y-27632'nin uzun dönem bellek yapılanmasını bozduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmanın sonuçları ile bulgularımız arasındaki zıtlık, kullanılan davranış deneyinin ve hayvan türünün farklılığından kaynaklanabileceği gibi ilacın beyindeki konsantrasyonuna da bağlı olabilir. Ayrıca uzaysal bellek ve korku belleğinin oluşumunda rol alan değişik mekanizmalarda bu çelişkiye sebep olabilir.

Çalışmamızda farklı dozlarda akut Y-27632 uygulanması farelerin motor koordinasyonlarında herhangi bir bozulmaya yol açmadı. İnan ve Büyükafşar (12) yaptıkları çalışmada fasudil ve Y-27632'nin intraperitoneal yolla uygulandığında farelerin motor koordinasyonda bir bozulmaya yol açmadığını bildirmişlerdir. Ayrıca Lemmes ve ark. (125) tarafından farelerde inme modelinde Y-27632'nin etkilerinin incelendiği çalışmada, inhibitörün motor koordinasyonu bozmadığını bildirmişlerdir. Aynı şekilde Tatenhorst ve ark. (126) Parkinson hastalığı modelinde, farelerde fasudilin motor koodinasyonu bozmadığını göstermişlerdir. Bu açıdan bakıldığında sonuçlarımız literatür ile uyumludur ve Rho-kinaz yolağının inhibe olmasının, farelerde denge ve motor koordinasyonda bir bozulmaya neden olmadığı şeklinde yorumlanabilir.

Farelerde lokomotor aktivitenin değerlendirildiği açık alan testinde ise edinim, konsolidasyon ve sönme protokollerinde özellikle 10 mg/kg dozda Y-27632'nin farelerin yürüme hızında ve toplam gezilen mesafelerinde bir azalma görüldü. İnan ve ark. (127) 6-hidroksidopam ile indüklenen Parkinson hastalığı modelli sıçanlarda subtalamik nükleusa uygulanan Rho-kinaz inhibitörü Y-27632'nin etkilerini inceledikleri çalışmalarında, Y-27632'nin lokomotor aktivitede bir değişikliğe yol açmadığını göstermişlerdir.

Literatürdeki veriler ve çalışmamızda elde ettiğimiz tüm bulgular birlikte değerlendirildiğinde Rho-kinaz yolağının korku koşullanma sürecinin her aşamasında farklı roller üstlendiği söylenebilir. Özellikle geri çağırma ve sönme süreçlerinde Rho-kinaz yolağı normalden daha aktif olurken, bu yolağın inhibisyonunun, geri çağırma ve sönmede herhangi bir davranış değişikliği oluşturmaması Rho-kinaz yolağının tek başına değil ama farklı nöromodülatör sistemlerle ya da farklı alt-efektörlerle *(downstream effector)* birlikte etkileşimde olabileceğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda Y-27632'nin bir yüksek dozunu daha denememiz ya da intraserebroventriküler yolla uygulamamız santraldeki konsantrasyonu artıracağı için davranış deneyi sonuçlarımızda farklılık oluşturabilirdi. Aynı zamanda bağlamsal korku koşullanma modeli yanı sıra ipuçlu korku koşullanma modelini de uygulayabilseydik korku belleği ile ilgili daha genel öngörülerde bulunabilirdik. Korku belleği ve Rho-kinaz yolağının ilişkisini aydınlatabilecek farklı çalışmalara hala ihtiyaç duyulmaktadır. Bu nedenle çalışmamızın, bu alanda yapılacak yeni çalışmalara ışık tutabileceği düşüncesindeyiz.

SONUÇLAR

Çalışmamızda Rho-kinaz yolağının bağlamsal korku koşullanmadaki rolünün incelenmesi hedeflendi. Ayrıca farelere motor koordinasyonu ve lokomotor aktiviteyi değerlendirmek amacıyla rota rod testi ve açık alan testi yapıldı.

Çalışmamızın bulgularını iki bölümde incelemek daha kolay anlaşılmasını sağlayacaktır. İlk bölümünde erişkin Balb/c erkek farelerde bağlamsal korku koşullanma modelinde edinim, konsolidasyon, geri çağırma, sönme ve rekonsolidasyon aşamalarında ROCK enzim aktivitesinin nasıl değiştiği incelendi. Bu gruplarda geri çağırma ve sönme protokollerinde hipokampüste ROCK enzim aktivitesinin normal gruba göre arttığı görüldü.

İkinci aşamada ise ROCK inhibitörü Y-27632'nin farklı dozlarda (1, 3 ve 10 mg/kg, i.p.) tek doz uygulanmasının bağlamsal korku koşullanma testinde edinim, konsolidasyon, geri çağırma, sönme ve rekonsolidasyon aşamalarındaki etkisi, lokomotor aktivite ve motor koordinasyonu değiştirip değiştirmediği incelendi. Bu gruplarda tüm protokollerde 10 mg/kg dozda akut Y-27632 uygulanmasının hipokampüste ROCK enzim aktivitesini inhibe ettiği görüldü. Ancak bu inhibisyonun bağlamsal korku koşullanma testinde edinim, konsolidasyon, geri çağırma, sönme ve rekonsolidasyon aşamalarındaki toplam donma sürelerinde anlamlı bir fark oluşturmadı.

Farklı dozlarda akut Y-27632 uygulanması farelerin motor koordinasyonunda herhangi bir bozulmaya sebep olmadı. Açık alan testinde ise edinim, konsolidasyon ve sönme protokollerinde özellikle 10 mg/kg dozda farelerin yürüme hızında ve buna bağlı olarak toplam gezilen mesafe verilerinde bir azalma olduğu görüldü.

Çalışmamızda farelerde bağlamsal korku koşullanma modelinin edinim, konsolidasyon, geri çağırma, sönme ve rekonsolidasyon aşamalarında Rho-kinaz yolağının inhibisyonu, herhangi bir davranış değişikliğine neden olmamıştır.

ÖZET

Rho-kinaz yolağı nörogenez ve sinaptik plastisitede oldukça önemli bir role sahiptir. Bu çalışmada Rho-kinaz yolağının bağlamsal korku koşullanmanın edinim, konsolidasyon, geri çağırma, sönme ve rekonsolidasyon aşamalarındaki olası değişiminin ve Rho-kinaz yolağının inhibisyonun oluşturabileceği etkilerin incelenmesi amaçlandı.

Toplam 303 adet Balb/c türü erkek fare kullanıldı. Farelere grup özelliklerine göre davranış deneylerinden 30 dk önce serum fizyolojik ya da 1, 3, ve 10 mg/kg dozda ROCK inhibitörü Y-27632, tek doz intraperitoneal yolla uygulandı. Daha sonra farelere rota-rod, bağlamsal korku koşullanma ve açık alan testleri yapıldı. Ayrıca bağlamsal korku koşullanma sürecinde ROCK enzim aktivitesinin nasıl değiştiğinin gösterilmesi amacıyla ROCK enzim aktivitesi ölçüldü.

Bağlamsal korku koşullanmada geri çağırma ve sönme protokollerinde hipokampüste ROCK enzim aktivitesinin normal gruba göre arttığı görüldü. ROCK inhibitörü Y-27632 uygulanması, bağlamsal korku koşullanma deneylerinde davranışta herhangi bir etki oluşturmadı.

Tüm gruplarda farelerin motor koordinasyonları açısından bir fark yoktu. Açık alan testinde ise edinim, konsolidasyon ve sönme protokollerinde özellikle 10 mg/kg dozda farelerin yürüme hızında ve buna bağlı olarak toplam gezilen mesafe verilerinde bir azalma olduğu görüldü. Ayrıca özellikle 10 mg/kg dozda Y-27632, bağlamsal korku koşullanmada tüm protokollerde ROCK enzim aktivitesini azalttı.

Elde edilen bulgular bağlamsal korku koşullanmada geri çağırma ve sönme aşamalarında ROCK enzim aktivitesinin önemli olduğunu ancak bu yolağın inhibisyonunun korku belleğinin oluşumunu, geri çağırılmasını ya da sönmesini etkilemediğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Rho-kinaz yolağı, Bağlamsal korku koşullanma, ROCK inhibitörü; Y-27632.

ROLE OF THE RHO/RHO KINASE PATHWAY IN CONTEXTUAL FEAR CONDITIONING

SUMMARY

The Rho-kinase pathway has a very important role in neurogenesis and synaptic plasticity. In this study, it was aimed to examine the possible changes of the Rho-kinase pathway in the acquisition, consolidation, recall, extinction and reconsolidation stages of contextual fear conditioning and to examine the effects of inhibition of the Rho-kinase pathway.

A total of 303 Balb/c male mice were used. According to the group characteristics, 30 minutes before the behavioral experiments, saline or ROCK inhibitor Y-27632 at 1, 3, and 10 mg/kg doses was administered intraperitoneally as a single dose. Animals were then given rota-rod to mice, contextual fear conditioning, and open field tests. In addition, ROCK enzyme activity was measured to show how ROCK enzyme activity changed during the contextual fear conditioning process.

In contextual fear conditioning, ROCK enzyme activity in the hippocampus was increased compared to the normal group in recall and extinction protocols. Administration of the ROCK inhibitor Y-27632 had no effect on behavior in contextual fear conditioning experiments. There was no difference in motor coordination of mice in all groups.

In the open field test, it was observed that there was a decrease in the walking speed of the mice, especially at the dose of 10 mg/kg, in the acquisition, consolidation and extinction protocols, and thus in the total distance traveled data. In addition, Y 27632 at a dose of 10 mg/kg decreased ROCK enzyme activity in all protocols in contextual fear conditioning.

The finding show that ROCK enzyme activity is important in the recall and extinction stages in contextual fear conditioning, but inhibition of this pathway does not affect the formation, recall or extinction of fear memory.

Keywords: Rho-kinase pathway, Contextual fear conditioning, ROCK inhibitor; Y-27632.

KAYNAKLAR

1. Ba W, Nadif Kasri N. RhoGTPases at the synapse: An embarrassment of choice. Small GTPases 2017;8(2):106-13.

2. Duman JG, Mulherkar S, Tu YK, J XC, Tolias KF. Mechanisms for spatiotemporal regulation of Rho-GTPase signaling at synapses. Neurosci Lett 2015;6014-10.

3. Nakayama AY, Harms MB, Luo L. Small GTPases Rac and Rho in the maintenance of dendritic spines and branches in hippocampal pyramidal neurons. J Neurosci 2000;20(14):5329-38.

4. Luo L. Rho GTPases in neuronal morphogenesis. Nat Rev Neurosci 2000;1(3):173-80.

5. Takai Y, Sasaki T, Matozaki T. Small GTP-binding proteins. Physiol Rev 2001;81(1):153-208.

6. Casey PJ, Seabra MC. Protein prenyltransferases. J Biol Chem 1996;271(10):5289-92.

7. Koch JC, Tatenhorst L, Roser AE, Saal KA, Tonges L, Lingor P. ROCK inhibition in models of neurodegeneration and its potential for clinical translation. Pharmacol Ther 2018;1891-21.

8. Miura Y, Kikuchi A, Musha T, Kuroda S, Yaku H, Sasaki T, et al. Regulation of morphology by rho p21 and its inhibitory GDP/GTP exchange protein (rho GDI) in Swiss 3T3 cells. J Biol Chem 1993;268(1):510-5.

9. Somlyo AP, Somlyo AV. Ca2+ sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. Physiol Rev 2003;83(4):1325-58.

10. Henderson BW, Gentry EG, Rush T, Troncoso JC, Thambisetty M, Montine TJ, et al. Rho-associated protein kinase 1 (ROCK1) is increased in Alzheimer's disease and ROCK1 depletion reduces amyloid-beta levels in brain. J Neurochem 2016;138(4):525-31.

11. Hamano T, Shirafuji N, Yen SH, Yoshida H, Kanaan NM, Hayashi K, et al. Rho-kinase ROCK inhibitors reduce oligomeric tau protein. Neurobiol Aging 2020;8941-54.

12. Inan S, Buyukafsar K. Antiepileptic effects of two Rho-kinase inhibitors, Y-27632 and fasudil, in mice. Br J Pharmacol 2008;155(1):44-51.

13. Buyukafsar K, Yalcin I, Kurt AH, Tiftik RN, Sahan-Firat S, Aksu F. Rho-kinase inhibitor, Y-27632, has an antinociceptive effect in mice. Eur J Pharmacol 2006;541(1-2):49-52.

14. Inan SY, Soner BC, Sahin AS. Infralimbic cortex Rho-kinase inhibition causes antidepressant-like activity in rats. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 2015;5736-43.

15. Xueyang D, Zhanqiang M, Chunhua M, Kun H. Fasudil, an inhibitor of Rho-associated coiled-coil kinase, improves cognitive impairments induced by smoke exposure. Oncotarget 2016;7(48):78764-72.

16. Song X, He R, Han W, Li T, Xie L, Cheng L, et al. Protective effects of the ROCK inhibitor fasudil against cognitive dysfunction following status epilepticus in male rats. J Neurosci Res 2019;97(4):506-19.

17. Kang S, Ling QL, Liu WT, Lu B, Liu Y, He L, et al. Down-regulation of dorsal striatal RhoA activity and impairment of working memory in middle-aged rats. Neurobiol Learn Mem 2013;1033-10.

18. Saitoh A, Yamada M, Yamada M, Kobayashi S, Hirose N, Honda K, et al. ROCK inhibition produces anxiety-related behaviors in mice. Psychopharmacology (Berl) 2006;188(1):1-11.

19. Brem AK, Ran K, Pascual-Leone A. Learning and memory. Handb Clin Neurol 2013;116693-737.

20. Sweatt JD. The Basics of Psychological Learning and Memory Theory. In: Sweatt JD, editor. Mechanisms of Memory2008-2009. p. 3-23.

21. Johansen JP, Cain CK, Ostroff LE, LeDoux JE. Molecular mechanisms of fear learning and memory. Cell 2011;147(3):509-24.

22. Roediger III HL, Zaromb, F.M., Lin, W. A Typology of Memory Terms. In: Menzel R, editor. Learning and Memory: A Comprehensive Reference. 2 ed. Oxford: elsevier; 2017. p. 7-19.

23. Bailey CH, Bartsch D, Kandel ER. Toward a molecular definition of long-term memory storage. Proc Natl Acad Sci U S A 1996;93(24):13445-52.

24. Squire LR. Declarative and nondeclarative memory: multiple brain systems supporting learning and memory. J Cogn Neurosci 1992;4(3):232-43.

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

26. Stevens WD, Wig, G. S. and Schacter, D. L. Implicit Memory and Priming. USA: Elsevier; 2008. p. 623-44.

27. Hamm AO, Weike AI. The neuropsychology of fear learning and fear regulation. Int J Psychophysiol 2005;57(1):5-14.

28. Poulos AM, Christian, K.M., Thompson, R. F. Procedural Learning: Classical Conditioning. USA: Elsevier; 2008.

29. Izquierdo I, Furini CR, Myskiw JC. Fear Memory. Physiol Rev 2016;96(2):695-750.

30. Hamm AO, Flor H. Fear learning, fear memory, and psychopathology. Int J Psychophysiol 2015;98(3 Pt 2):497-8.

31. Costanzi M, Cannas S, Saraulli D, Rossi-Arnaud C, Cestari V. Extinction after retrieval: effects on the associative and nonassociative components of remote contextual fear memory. Learn Mem 2011;18(8):508-18.

32. Pape HC, Pare D. Plastic synaptic networks of the amygdala for the acquisition, expression, and extinction of conditioned fear. Physiol Rev 2010;90(2):419-63.

33. Orsini CA, Maren S. Neural and cellular mechanisms of fear and extinction memory formation. Neurosci Biobehav Rev 2012;36(7):1773-802.

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

35. Caetano MS, Jin LE, Harenberg L, Stachenfeld KL, Arnsten AF, Laubach M. Noradrenergic control of error perseveration in medial prefrontal cortex. Front Integr Neurosci 2012;6125.

36. Abel T, Lattal KM. Molecular mechanisms of memory acquisition, consolidation and retrieval. Curr Opin Neurobiol 2001;11(2):180-7.

37. Dural S, Gür, E., Çetinkaya, H. Öğrenilmiş Korkunun Söndürülmesinde Yeni Bir Yaklaşım: Belleğin Yeniden-Bütünleştirme Sürecine Müdahale. Türk Psikoloji Yazıları 2015;18 (35)67-82.

38. Anagnostaras SG, Gale GD, Fanselow MS. Hippocampus and contextual fear conditioning: recent controversies and advances. Hippocampus 2001;11(1):8-17.

39. Sweatt JD. Rodent Behavioral Learning and Memory Models. In: Sweatt JD, editor. Mechanisms of Memory2008-2009. p. 77-103.

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

41. Sotres-Bayon F, Bush DE, LeDoux JE. Acquisition of fear extinction requires activation of NR2B-containing NMDA receptors in the lateral amygdala. Neuropsychopharmacology 2007;32(9):1929-40.

42. Sotres-Bayon F, Quirk GJ. Prefrontal control of fear: more than just extinction. Curr Opin Neurobiol 2010;20(2):231-5.

43. Sotres-Bayon F, Cain CK, LeDoux JE. Brain mechanisms of fear extinction: historical perspectives on the contribution of prefrontal cortex. Biol Psychiatry 2006;60(4):329-36.

44. Green JD. The Hippocampus. Physiol Rev 1964;44561-608.

45. Quirk GJ, Mueller D. Neural mechanisms of extinction learning and retrieval. Neuropsychopharmacology 2008;33(1):56-72.

46. Milad MR, Quirk GJ. Fear extinction as a model for translational neuroscience: ten years of progress. Annu Rev Psychol 2012;63129-51.

47. Lopez J, Gamache K, Schneider R, Nader K. Memory retrieval requires ongoing protein synthesis and NMDA receptor activity-mediated AMPA receptor trafficking. J Neurosci 2015;35(6):2465-75.

48. Barros DM, Izquierdo LA, Mello e Souza T, Ardenghi PG, Pereira P, Medina JH, et al. Molecular signalling pathways in the cerebral cortex are required for retrieval of one-trial avoidance learning in rats. Behav Brain Res 2000;114(1-2):183-92.

49. Keifer OP, Jr., Hurt RC, Ressler KJ, Marvar PJ. The Physiology of Fear: Reconceptualizing the Role of the Central Amygdala in Fear Learning. Physiology (Bethesda) 2015;30(5):389-401.

50. Kim JJ, Jung MW. Neural circuits and mechanisms involved in Pavlovian fear conditioning: a critical review. Neurosci Biobehav Rev 2006;30(2):188-202.

51. Mahan AL, Ressler KJ. Fear conditioning, synaptic plasticity and the amygdala: implications for posttraumatic stress disorder. Trends Neurosci 2012;35(1):24-35.

52. Yang Y, Wang JZ. From Structure to Behavior in Basolateral Amygdala-Hippocampus Circuits. Front Neural Circuits 2017;1186.

53. Maren S, Aharonov G, Stote DL, Fanselow MS. N-methyl-D-aspartate receptors in the basolateral amygdala are required for both acquisition and expression of conditional fear in rats. Behav Neurosci 1996;110(6):1365-74.

54. Sweatt JD. Studies of Human Learning and Memory. In: Sweatt JD, editor. Mechanisms of Memory2008-2009. p. 25-47.

55. İzci Y, Erbaş YC. Hipokampus: Yapısı ve Fonksiyonları. Türk Nöroşirürji Dergisi 2015.

56. Burwell RD, Agster, K.L. Anatomy of the Hippocampus and the Declarative Memory System. USA: Elsevier; 2008. p. 47-66.

57. Song J, Olsen RH, Sun J, Ming GL, Song H. Neuronal Circuitry Mechanisms Regulating Adult Mammalian Neurogenesis. Cold Spring Harb Perspect Biol 2016;8(8).

58. McDonald AJ, Mott DD. Functional neuroanatomy of amygdalohippocampal interconnections and their role in learning and memory. J Neurosci Res 2017;95(3):797-820.

59. Phillips RG, LeDoux JE. Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. Behav Neurosci 1992;106(2):274-85.

60. Maren S, Fanselow MS. Synaptic plasticity in the basolateral amygdala induced by hippocampal formation stimulation in vivo. J Neurosci 1995;15(11):7548-64.

61. Fanselow MS. Contextual fear, gestalt memories, and the hippocampus. Behav Brain Res 2000;110(1-2):73-81.

62. Valencia A, Chardin P, Wittinghofer A, Sander C. The ras protein family: evolutionary tree and role of conserved amino acids. Biochemistry 1991;30(19):4637-48.

63. Rossman KL, Der CJ, Sondek J. GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors. Nat Rev Mol Cell Biol 2005;6(2):167-80.

64. Genth H, Gerhard R, Maeda A, Amano M, Kaibuchi K, Aktories K, et al. Entrapment of Rho ADP-ribosylated by Clostridium botulinum C3 exoenzyme in the Rho-guanine nucleotide dissociation inhibitor-1 complex. J Biol Chem 2003;278(31):28523-7.

65. Özdemir E, Bağcivan İ. Rho-kinaz enzim sisteminin vasküler kas tonusu üzerine fizyopatolojik etkileri. Genel Tıp Derg 2011;21 (1).

66. Bishop AL, Hall A. Rho GTPases and their effector proteins. Biochem J 2000;348 Pt 2241-55.

67. Fukata Y, Amano M, Kaibuchi K. Rho-Rho-kinase pathway in smooth muscle contraction and cytoskeletal reorganization of non-muscle cells. Trends Pharmacol Sci 2001;22(1):32-9.

68. Boettner B, Van Aelst L. The role of Rho GTPases in disease development. Gene 2002;286(2):155-74.

69. Bustelo XR, Sauzeau V, Berenjeno IM. GTP-binding proteins of the Rho/Rac family: regulation, effectors and functions in vivo. Bioessays 2007;29(4):356-70.

70. Schmidt A, Hall A. Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch. Genes Dev 2002;16(13):1587-609.

71. Chitaley K, Webb RC. Microtubule depolymerization facilitates contraction of rat aorta via activation of Rho-kinase. Vascul Pharmacol 2002;38(3):157-61.

72. Olofsson B. Rho guanine dissociation inhibitors: pivotal molecules in cellular signalling. Cell Signal 1999;11(8):545-54.

73. Amano M, Fukata Y, Kaibuchi K. Regulation and functions of Rho-associated kinase. Exp Cell Res 2000;261(1):44-51.

74. Amano M, Ito M, Kimura K, Fukata Y, Chihara K, Nakano T, et al. Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase). J Biol Chem 1996;271(34):20246-9.

75. Yoshioka K, Matsumura F, Akedo H, Itoh K. Small GTP-binding protein Rho stimulates the actomyosin system, leading to invasion of tumor cells. J Biol Chem 1998;273(9):5146-54.

76. Nakagawa O, Fujisawa K, Ishizaki T, Saito Y, Nakao K, Narumiya S. ROCK-I and ROCK-II, two isoforms of Rho-associated coiled-coil forming protein serine/threonine kinase in mice. FEBS Lett 1996;392(2):189-93.

77. Noma K, Oyama N, Liao JK. Physiological role of ROCKs in the cardiovascular system. Am J Physiol Cell Physiol 2006;290(3):C661-8.

78. Julian L, Olson MF. Rho-associated coiled-coil containing kinases (ROCK): structure, regulation, and functions. Small GTPases 2014;5e29846.

79. Buyukafsar K, Levent A. Involvement of Rho/Rho-kinase signalling in the contractile activity and acetylcholine release in the mouse gastric fundus. Biochem Biophys Res Commun 2003;303(3):777-81.

80. Feng Y, LoGrasso PV, Defert O, Li R. Rho Kinase (ROCK) Inhibitors and Their Therapeutic Potential. J Med Chem 2016;59(6):2269-300.

81. Büyükafşar K. Rho/Rho-kinaz yolağı: Fizyolojik ve Patofizyolojik Olaylardaki Rolü. Türk Farmakoloji Derneği 19 Ulusal Farmakoloji Kongresi. Trabzon2007.

82. Liao JK, Seto M, Noma K. Rho kinase (ROCK) inhibitors. J Cardiovasc Pharmacol 2007;50(1):17-24.

83. Dvorsky R, Blumenstein L, Vetter IR, Ahmadian MR. Structural insights into the interaction of ROCKI with the switch regions of RhoA. J Biol Chem 2004;279(8):7098-104.

84. Wen W, Liu W, Yan J, Zhang M. Structure basis and unconventional lipid membrane binding properties of the PH-C1 tandem of rho kinases. J Biol Chem 2008;283(38):26263-73.

85. Amano M, Chihara K, Nakamura N, Kaneko T, Matsuura Y, Kaibuchi K. The COOH terminus of Rho-kinase negatively regulates rho-kinase activity. J Biol Chem 1999;274(45):32418-24.

86. Jacobs M, Hayakawa K, Swenson L, Bellon S, Fleming M, Taslimi P, et al. The structure of dimeric ROCK I reveals the mechanism for ligand selectivity. J Biol Chem 2006;281(1):260-8.

87. Sladojevic N, Yu B, Liao JK. ROCK as a therapeutic target for ischemic stroke. Expert Rev Neurother 2017;17(12):1167-77.

88. Wickman GR, Julian L, Mardilovich K, Schumacher S, Munro J, Rath N, et al. Blebs produced by actin-myosin contraction during apoptosis release damage-associated molecular pattern proteins before secondary necrosis occurs. Cell Death Differ 2013;20(10):1293-305.

89. Hirano K. Current topics in the regulatory mechanism underlying the Ca2+ sensitization of the contractile apparatus in vascular smooth muscle. J Pharmacol Sci 2007;104(2):109-15.

90. Mueller BK, Mack H, Teusch N. Rho kinase, a promising drug target for neurological disorders. Nat Rev Drug Discov 2005;4(5):387-98.

91. Breitenlechner C, Gassel M, Hidaka H, Kinzel V, Huber R, Engh RA, et al. Protein kinase A in complex with Rho-kinase inhibitors Y-27632, Fasudil, and H-1152P: structural basis of selectivity. Structure 2003;11(12):1595-607.

92. Suzuki Y, Shibuya M, Satoh S, Sugimoto Y, Takakura K. A postmarketing surveillance study of fasudil treatment after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. Surg Neurol 2007;68(2):126-31; discussion 31-2.

93. Davies SP, Reddy H, Caivano M, Cohen P. Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. Biochem J 2000;351(Pt 1):95-105.

94. Sturdivant JM, Royalty SM, Lin CW, Moore LA, Yingling JD, Laethem CL, et al. Discovery of the ROCK inhibitor netarsudil for the treatment of open-angle glaucoma. Bioorg Med Chem Lett 2016;26(10):2475-80.

95. Pan P, Shen M, Yu H, Li Y, Li D, Hou T. Advances in the development of Rho-associated protein kinase (ROCK) inhibitors. Drug Discov Today 2013;18(23-24):1323-33.

96. Nourinia R, Nakao S, Zandi S, Safi S, Hafezi-Moghadam A, Ahmadieh H. ROCK inhibitors for the treatment of ocular diseases. Br J Ophthalmol 2017.

97. Nikolic M. The role of Rho GTPases and associated kinases in regulating neurite outgrowth. Int J Biochem Cell Biol 2002;34(7):731-45.

98. Jalink K, van Corven EJ, Hengeveld T, Morii N, Narumiya S, Moolenaar WH. Inhibition of lysophosphatidate- and thrombin-induced neurite retraction and neuronal cell rounding by ADP ribosylation of the small GTP-binding protein Rho. J Cell Biol 1994;126(3):801-10.

99. Golden SA, Christoffel DJ, Heshmati M, Hodes GE, Magida J, Davis K, et al. Epigenetic regulation of RAC1 induces synaptic remodeling in stress disorders and depression. Nat Med 2013;19(3):337-44.

100. Forgione N, Fehlings MG. Rho-ROCK inhibition in the treatment of spinal cord injury. World Neurosurg 2014;82(3-4):e535-9.

101. Yamashita K, Kotani Y, Nakajima Y, Shimazawa M, Yoshimura S, Nakashima S, et al. Fasudil, a Rho kinase (ROCK) inhibitor, protects against ischemic neuronal damage in vitro and in vivo by acting directly on neurons. Brain Res 2007;1154215-24.

102. Sato M, Tani E, Fujikawa H, Kaibuchi K. Involvement of Rho-kinase-mediated phosphorylation of myosin light chain in enhancement of cerebral vasospasm. Circ Res 2000;87(3):195-200.

103. Martin SJ, Grimwood PD, Morris RG. Synaptic plasticity and memory: an evaluation of the hypothesis. Annu Rev Neurosci 2000;23649-711.

104. Bito H, Furuyashiki T, Ishihara H, Shibasaki Y, Ohashi K, Mizuno K, et al. A critical role for a Rho-associated kinase, p160ROCK, in determining axon outgrowth in mammalian CNS neurons. Neuron 2000;26(2):431-41.

105. Lamprecht R, Farb CR, LeDoux JE. Fear memory formation involves p190 RhoGAP and ROCK proteins through a GRB2-mediated complex. Neuron 2002;36(4):727-38.

106. Dash PK, Orsi SA, Moody M, Moore AN. A role for hippocampal Rho-ROCK pathway in long-term spatial memory. Biochem Biophys Res Commun 2004;322(3):893-8.

107. Küçük AG, A. Deney Hayvanlarinda Anksiyete Modelleri Ve Anksiyetenin Değerlendirilmesi. Sağlık Bilimleri Dergisi (Journal of Health Sciences) 2005;14 (3)209-17.

108. Franklin KP, G. Paxinos and Franklin's the Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates. Fifth Edition ed: Elseiver; 2019.

109. Dolcos F, LaBar KS, Cabeza R. Interaction between the amygdala and the medial temporal lobe memory system predicts better memory for emotional events. Neuron 2004;42(5):855-63.

110. Amin E, Dubey BN, Zhang SC, Gremer L, Dvorsky R, Moll JM, et al. Rho-kinase: regulation, (dys)function, and inhibition. Biol Chem 2013;394(11):1399-410.

111. Ramakers GJ. Rho proteins, mental retardation and the cellular basis of cognition. Trends Neurosci 2002;25(4):191-9.

112. Diana G, Valentini G, Travaglione S, Falzano L, Pieri M, Zona C, et al. Enhancement of learning and memory after activation of cerebral Rho GTPases. Proc Natl Acad Sci U S A 2007;104(2):636-41.

113. Zhang Q, Zhang JJ, Han ZM. Efficacy of Rho kinase inhibitor on cognitive impairment induced by chronic cerebral hypoperfusion in rats. Int J Clin Exp Med 2015;8(2):2435-40.

114. Jianjun Z, Baochun Z, Limei M, Lijun L. Exploring the beneficial role of ROCK inhibitors in sepsis-induced cerebral and cognitive injury in rats. Fundam Clin Pharmacol 2021;35(5):882-91.

115. Leuchtenberger S, Kummer MP, Kukar T, Czirr E, Teusch N, Sagi SA, et al. Inhibitors of Rho-kinase modulate amyloid-beta (Abeta) secretion but lack selectivity for Abeta42. J Neurochem 2006;96(2):355-65.

116. Zhou Y, Su Y, Li B, Liu F, Ryder JW, Wu X, et al. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs can lower amyloidogenic Abeta42 by inhibiting Rho. Science 2003;302(5648):1215-7.

117. Aguilar BJ, Zhu Y, Lu Q. Rho GTPases as therapeutic targets in Alzheimer's disease. Alzheimers Res Ther 2017;9(1):97.

118. Munoz A, Correa CL, Villar-Cheda B, Costa-Besada MA, Labandeira-Garcia JL. Aging-related Increase in Rho Kinase Activity in the Nigral Region Is Counteracted by Physical Exercise. J Gerontol A Biol Sci Med Sci 2016;71(10):1254-7.

119. Tatsumi S, Mabuchi T, Katano T, Matsumura S, Abe T, Hidaka H, et al. Involvement of Rho-kinase in inflammatory and neuropathic pain through phosphorylation of myristoylated alanine-rich C-kinase substrate (MARCKS). Neuroscience 2005;131(2):491-8.

120. Carcak N, Yavuz M, Eryigit Karamahmutoglu T, Kurt AH, Urhan Kucuk M, Onat FY, et al. Suppressive effect of Rho-kinase inhibitors Y-27632 and fasudil on spike-and-wave discharges in genetic absence epilepsy rats from Strasbourg (GAERS). Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 2018;391(11):1275-83.

121. Wang J, Wang YH, Hou YY, Xi T, Liu Y, Liu JG. The small GTPase RhoA, but not Rac1, is essential for conditioned aversive memory formation through regulation of actin rearrangements in rat dorsal hippocampus. Acta Pharmacol Sin 2013;34(6):811-8.

122. Bouton ME. Context, ambiguity, and unlearning: sources of relapse after behavioral extinction. Biol Psychiatry 2002;52(10):976-86.

123. Ishizaki T, Uehata M, Tamechika I, Keel J, Nonomura K, Maekawa M, et al. Pharmacological properties of Y-27632, a specific inhibitor of rho-associated kinases. Mol Pharmacol 2000;57(5):976-83.

124. Lunardi P, Sachser RM, Sierra RO, Pedraza LK, Medina C, de la Fuente V, et al. Effects of Hippocampal LIMK Inhibition on Memory Acquisition, Consolidation, Retrieval, Reconsolidation, and Extinction. Mol Neurobiol 2018;55(2):958-67.

125. Lemmens R, Jaspers T, Robberecht W, Thijs VN. Modifying expression of EphA4 and its downstream targets improves functional recovery after stroke. Hum Mol Genet 2013;22(11):2214-20.

126. Tatenhorst L, Eckermann K, Dambeck V, Fonseca-Ornelas L, Walle H, Lopes da Fonseca T, et al. Fasudil attenuates aggregation of alpha-synuclein in models of Parkinson's disease. Acta Neuropathol Commun 2016;439.

127. Inan SY, Soner BC, Sahin AS. Behavioural effects of basal ganglia rho-kinase inhibition in the unilateral 6-hydroxydopamine rat model of Parkinson's disease. Metab Brain Dis 2016;31(4):849-57.

ŞEKİLLER LİSTESİ

ŞEKİLLER

Şekil 1. Uzun süreli bellek türlerinin sınıflandırılması 4
Şekil 2. Klasik korku koşullanmanın sinirsel iletimi 9
Şekil 3. Bilginin hipokampüs içindeki ilerleyişi ve çıkış yaptığı yapılar 11
Şekil 4. Rho-kinaz sinyal ileti yolağı 14
Şekil 5. ROCK1 ve ROCK2 enzim yapısı 15
Şekil 6. Deney planı 23
Şekil 7. Rota-Rod cihazı 26
Şekil 8. Korku koşullanma cihazı: sol kısım yazılım programı, sağ kısım kafes bölümü 27
Şekil 9. Açık alan test düzeneğinde kayıt ve video aktarımı 29
Şekil 10. Kontrol gruplarının absorbans değerleri 33
Şekil 11. ROCK enzim aktivitesi 34
Şekil 12. Rota-rod cihazında mil üzerinde kalınan en uzun süre 35
Şekil 13. Bağlamsal korku koşullanma testinde toplam donma süreleri 36
Şekil 14. Açık alan testinde toplam gezilen mesafe alanları 38
Şekil 15. Açık alan testinde hız verileri 39

TABLOLAR

Tablo 1. ROCK substratları, fonksiyonları ve hücrede oluşturdukları yanıtlar 16
Tablo 2. Farmakolojik olarak ROCK inhibitörleri 17
Tablo 3. Deney grupları ve uygulanan işlemler 25

ÖZGEÇMİŞ

1994 yılı Kasım ayında Kırklareli'de doğdum. İlk, orta ve lise eğitimimi Kırklareli'de tamamladıktan sonra, 2013 yılında Trakya Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'nde lisans eğitimine başladım. 2018 yılında Eczacılık fakültesinden mezun oldum. 2018 yılında Onur Eczanesi'nde ikinci eczacı olarak görev yaptım. 2018 yılı eylül ayında Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Farmakoloji Yüksek Lisans programına başladım. 2019 yılından beri Kırklareli Eğitim ve Araştırma Hastanesinde çalışmaktayım.

EKLER

Ek-1

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

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARLARI

Oturum Sayısı: 2020/08 **Karar Tarihi**: 28.08.2020
Karar No: 2020.08.01
Hayvan Sayısı ve Cinsi: Fare 320 adet

Yürütücülüğünü Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Dr. Öğr. Üyesi Ruhan Deniz TOPUZ'un yaptığı, Ecz. Nur Sena KÖSE'nin Yüksek Lisans Tezi olarak planlanan, TÜHADYEK-2020/10 protokol nolu "**Rho/Rho kinaz yolağının bağlamsal korku koşullanmadaki rolü**" başlıklı çalışma önerisi görüşüldü. Araştırmanın amaç, yaklaşım, gereç ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmesi sonucunda; Hayvan deneyleri etik kurullarının çalışma usul ve esaslarına dair yönetmelik ve Trakya Üniversitesi hayvan deneyleri yerel etik kurulu yönergesinde belirtilen ilke ve kurallara uygun bulunarak, çalışmanın yapılabileceğine mevcudun oy birliği ile karar verilmiştir.

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

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

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

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

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

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

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

Doç. Dr. Filiz SANAL
Fen Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☐yok
Toplantı Katılım: ☐ evet ☐ hayır

Dr. Öğr. Üyesi F. Gülfeşan ÇANAKÇI
Diş Hekimliği Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☐yok
Toplantı Katılım: ☐evet ☐ hayır

Vet. Hek. Kenan SELVİ
Vet. Hek. Üye
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☐yok
Toplantı Katılım: ☐ evet ☐ hayır

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

-Katılmadı-
Ayhan YILMAZ
Sivil Üye
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☐yok
Toplantı Katılım: ☐ evet ☐ hayır

Ek-2

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

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARLARI

Oturum Sayısı: 2021/12 **Karar Tarihi:** 29.12.2021
Karar No: 2021.12.02
Hayvan Sayısı ve Cinsi: Fare 303 adet

Yürütücülüğünü Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Doktor Öğretim Üyesi Ruhan Deniz TOPUZ'un yaptığı ,Ecz. Nur Sena KÖSE'nin yüksek lisans tezi olarak planlanan,TÜHADYEK-2020/10 protokol no'lu, "**Rho/Rho kinaz yolağının bağlamsal korku koşullanmadaki rolü**" başlıklı çalışmanın değişiklik önerisi görüşüldü. Araştırmanın amaç, yaklaşım, gereç ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmesi sonucunda; Hayvan deneyleri etik kurullarının çalışma usul ve esaslarına dair yönetmelik ve Trakya Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu yönergesinde belirtilen ilke ve kurallara uygun bulunarak, çalışmanın yapılabileceğine mevcudun oy birliği ile karar verilmiştir.

Prof. Dr. Hakan ERBAŞ
Başkan
Araştırma ile İlişki: □ var ☑yok
Toplantı Katılım: ☑evet □ hayır

Prof. Dr. Enis ULUÇAM
Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: □ var □yok
Toplantı Katılım: □ evet □ hayır

Prof. Dr. Suat ERDOĞAN
Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: □ var □yok
Toplantı Katılım: □ evet □ hayır

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

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

Prof. Dr. Necdet SÜT
Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: □ var □yok
Toplantı Katılım: □ evet □ hayır

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

Doç. Dr. Filiz SANAL
Fen Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: □ var □yok
Toplantı Katılım: ☑ evet □ hayır

Dr. Öğr. Üyesi F. Gülfeşan ÇANAKÇI
Diş Hekimliği Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: □ var □yok
Toplantı Katılım: □ evet □ hayır

Vet. Hek. Kenan SELVİ
Vet. Hek. Üye
Araştırma ile İlişki: □ var ☑yok
Toplantı Katılım: ☑evet □ hayır

Ecz. F. Üyesi GÜLER
Sivil Toplum Kuruluşu Sivil Üye
Araştırma ile İlişki: □ var ☑yok
Toplantı Katılım: ☑ evet □ hayır

Tarık AYKIZ
Sivil Üye
Araştırma ile İlişki: □ var ☑yok
Toplantı Katılım: ☑evet □ hayır