

DeneySEL Şizofreni Modelinde Bilişsel Fonksiyonlar ve Hipokampal Sinaptofizin Düzeylerinin İncelenmesi

Erkan ERMİŞ¹, Cansu KOÇ¹, Şule MERGEN¹, İbrahim MAKİNECİOĞLU²,
Ayşe Pınar VURAL³, Mehmet CANSEV¹, Gökhan GÖKTALAY¹,
Şafak ERAY ÇAMLI⁴

¹ Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, Bursa.

² Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Bursa Yüksek İhtisas Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Çocuk ve Ergen Ruh Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Bursa.

³ Fatih Sultan Mehmet Üniversitesi, İnsan ve Toplum Bilimleri Fakültesi, Psikoloji Anabilim Dalı, İstanbul.

⁴ Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk ve Ergen Ruh Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Bursa.

ÖZET

Şizofreni pozitif, negatif ve bilişsel belirtiler ile seyreden kronik bir beyin hastalığıdır. Bilişsel belirtiler hastalığın prodromal döneminden itibaren gözlenebilmektedir. Bu çalışmanın amacı irkilme refleksinin ön uyarıcı inhibisyonu (ÖUAI) ile oluşturulan deneySEL şizofreni modelinde sıçanların bilişsel fonksiyonlarını ve hipokampal presinaptik proteinlerden sinaptofizin düzeylerini araştırmaktır. Çalışmada 30 adet erkek Wistar türü sıçanlar bazal ÖUAI ölçümüne tabi tutulmuş ve bu değerlere göre düşükten yükseğe sıralanmıştır. İlk 10 sıçan "düşük" ve son 10 sıçan "yüksek" inhibisyonlu grup olarak ayırdıktan sonra 5 gün boyunca Morris Su Tankı (MST) testine tabi tutulmuştur. Testin bitiminde sıçanlar sakrifiye edilerek hipokampus bölgeleri eksize edilmiş ve hipokampal presinaptik proteinlerden sinaptofizin Western Blot yöntemiyle analiz edilmiştir. Sonuçlara göre her iki grubun öğrenme düzeyleri arasında fark bulunmaz iken ve hafıza fonksiyonlarının platform alanından geçme sıklığı ($p<0,05$) ve platform alanında geçirilen süre parametreleri ($p<0,05$) düşük ÖUAI grubundaki sıçanlarda anlamlı olarak daha düşük bulunmuştur. Sinaptofizin düzeyleri de benzer şekilde düşük ÖUAI grubundaki sıçanlarda anlamlı olarak ($p<0,01$) düşük tespit edilmiştir. Çalışmamızın sonuçları yüksek ÖUAI değerine sahip sıçanlarla kıyaslandığında ÖUAI değerleri düşük olan sıçanların bazı bilişsel fonksiyonlarının ve hipokampal presinaptik proteinlerden sinaptofizin düzeylerinin anlamlı olarak daha düşük olduğunu göstermektedir. Bu sonuçlar aynı zamanda uzun zamandır şizofreni çalışmalarında güvenilir bir yöntem olarak kullanılan ÖUAI testinin insan ve hayvan çalışmalarındaki benzer sonuçlarına vurgu yaparak şizofreni araştırmalarındaki önemini desteklemiştir.

Anahtar Kelimeler: Şizofreni. Ön Uyarıcı Aracılı İnhibisyon. Endofenotip. Sinaptofizin. Hafıza.

Examination of Cognitive Functions and Hippocampal Synaptophysin Levels in an Experimental Schizophrenia Model

ABSTRACT

Schizophrenia is a chronic brain disease and is clinically characterized by positive, negative and cognitive symptoms. Cognitive symptoms can be observed starting from the prodromal period of the disease. The aim of this study is to investigate the cognitive functions of rats and hippocampal levels of the presynaptic protein synaptophysin in an experimental schizophrenia model created by prepulse-mediated inhibition (PPI) of the startle reflex. In the study, 30 male Wistar type rats were subjected to basal PPI measurements and were ranked from low to high according to these values. After the first 10 rats were divided into the "low" and the last 10 rats into the "high" inhibition group, they were subjected to the Morris Water Maze (MWM) test for 5 days. At the end of the test, the rats were sacrificed, hippocampus regions were excised, and the presynaptic synaptophysin protein was analyzed by Western Blot method. According to the results, while there was no difference between the learning levels of both groups, the frequency of memory functions frequency to cross the platform area ($p<0,05$) and time spent in the platform area ($p<0,05$) parameters were found to be significantly lower in rats in the low PPI group. Synaptophysin levels were similarly found to be significantly ($p<0,01$) lower in rats in the low PPI group. The results of our study show that some cognitive functions and presynaptic protein synaptophysin levels are significantly lower in rats with low PPI values compared to those with high PPI values. These results also supported the importance of the PPI test, which has been used as a reliable method in schizophrenia research for a long time, by emphasizing its comparable outcomes in human and animal studies of schizophrenia.

Keywords: Schizophrenia. Prepulse Inhibition. Endophenotype. Synaptophysin. Memory.

Geliş Tarihi: 30.Ekim.2023

Kabul Tarihi: 01.Aralık.2023

Dr. Şafak ERAY ÇAMLI
Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Çocuk ve Ergen Ruh Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı,
Bursa.
Tel: 0224 295 18 80
E-posta: drsafakeray@gmail.com

Yazarların ORCID Bilgileri:

Erkan ERMİŞ: 0000-0001-5359-3477

Cansu KOÇ: 0000-0002-6097-5585

Hilmiye Şule MERGEN: 0000-0001-7589-2013

İbrahim MAKİNECİOĞLU: 0000-0002-7637-0994

Ayşe Pınar VURAL: 0000-0002-3358-0019

Mehmet CANSEV: 0000-0003-2918-5064

Gökhan GÖKTALAY: 0000-0001-6261-4233

Şafak ERAY ÇAMLI: 0000-0002-4847-7751

Şizofreni beynin algı, bilişsel işlevler, düşünce ve duygulanım gibi neredeyse tüm fonksiyonlarını etkileyen kronik bir hastalıktır. Hastalığın etiyojisi tam olarak açıklığa kavuşturulamamış olmakla birlikte, genetik, çevresel ve sosyal faktörlerin de katkıda bulunduğu, prenatal dönemde başlayan bir nörogelişimsel psikopatoloji olduğu kabul edilmektedir¹. Şizofreni sıklıkla yaşamın ergenlik döneminden itibaren belirti vermeye başlayan yirmili yaşlardan sonra tüm belirtileri ile ortaya çıkan bir hastalıktır. Hastalık belirtilerinin ergenlik döneminde başlaması nedeniyle, çocuk ve ergen psikiyatristleri tarafından erken dönemde tanınması ve takipleri önem arz etmektedir. Hastalığın kompleks yapısı ve karmaşık semptomlarla seyretmesi, özellikle beyinde farklı nörotransmitter sistemleri etkilemesi ve bu nörotransmitter sistemler üzerinden geliştirilen ilaçların hastalığın semptomlarını tam olarak iyileştirmemesi, hastalığın karmaşık bir patogenezi olduğunu göstermektedir. Bugün için psikiyatrik hastalıkların çoğunda doğrudan ve tam teşhise yönelik yardımcı laboratuvar ve görüntüleme yöntemi bulunmamaktadır. Bu nedenle psikiyatri yazınında, hastalıkların klinik semptomlarını destekler biyobelirteç ve öngörüsül yöntemlerin geliştirilmesine yönelik araştırmalar önem kazanmıştır².

Şizofreni pozitif, negatif ve kognitif belirtileri ön planda olan bir hastalıktır. Aslında bu ayrım hem teşhis ve tedavi hem de hastaların takibinde kolaylık sağlaması açısından geliştirilmiştir. Bu ayrım aynı zamanda temel çalışmalar, özellikle deney hayvanlarında hastalığı modellemek açısından da fayda sağlamıştır. Bu modeller ilaç ile indüklemeye (MK801, Apomorfın, Amfetamin vb.), beyinde belirli bölgelerde lezyon oluşturma, genetik mutasyonlar meydana getirme veya hamile sıçanlara lipopolisakkarit (LPS) enjeksiyonu yaparak doğan yavrularda nörogelişimsel problemler oluşturma suretiyle şizofreniye benzer semptomlar ortaya çıkarmak şeklinde özetlenebilir. Bu yaklaşımların hemen hemen hepsi şizofrenideki semptom kümesinin bir kısmını modelleyebilmektedir³.

Şizofreniyi daha iyi değerlendirebilmek için ortaya atılan görüşlerden biri şizofreninin aslında tek bir hastalık olmayıp birçok bozukluğun birden barındırması hipotezidir. Bu alt grupların belirlenmesi için endofenotip teoremi ortaya atılarak hastalık için çeşitli endofenotip tanımlanmıştır. Endofenotipler genetik bağlantısı iyi kurulmuş semptomlar ya da fenotiplerdir. Şizofreni için öne sürülmüş endofenotip adaylarından bazıları Ön Uyarın Aracılı İnhibisyon (ÖUAI), P50 baskılanması, antisakkad hareket ve yönetici işlevlerde (Wisconsin kart sıralama test performansı) bozulmadır^{4,5}.

Bu endofenotiplerden ÖUAI, irkilme refleksi oluşturacak kadar kuvvetli bir sesli, görsel ya da dokunsal uyarın öncesinde verilen daha düşük

şiddette ve kısa sürede bir ön uyarının (prepulse) irkilme refleksinde azalmaya neden olmasıdır ve başta şizofreni olmak üzere birçok psikiyatrik hastalıkta bozulmaktadır⁶. Bu özellikleri sayesinde ÖUAI, şizofreni hastalığının yaygın olarak kabul gören deneysel bir modelini oluşturmakta ve düşük ÖUAI şizofreninin bir biyo-belirteci olarak kabul edilmektedir⁷.

Şizofreninin özellikle erken prodromal dönemde gözlenen, negatif belirtilerle birlikte gelişen bilişsel işlevlerdeki bozulmanın tespit edilmesi psikoz gelişmesi açısından klinisyene önemli bir uyarı niteliği taşımaktadır. Bilişsel işlevler ve öğrenmede birçok nörotransmitter rol oynamakta, farklı yollar üzerinden sinaptik bilgi işleme mekanizmaları aktif olmaktadır. Bilgi işleme mekanizmalarında nörotransmitterler kadar sinaptik proteinler de büyük önem arz etmektedir ve yapılan çalışmalar şizofreni hastalığında sinaptik protein seviyelerinde önemli değişiklikler bulunduğunu göstermektedir. Postmortem çalışmalarda başta hipokampus ve korteks olmak üzere presinaptik sinaptofizin⁸ ve postsinaptik PSD-95⁹ seviyelerinde anlamlı azalmalar tespit edilmiştir.

Yakın zamanda yapılan bir çalışmada düşük ÖUAI değerine sahip farelerin sosyal etkileşimlerinin ve boşluksal hafızalarının yüksek ÖUAI değerine sahip farelere göre anlamlı olarak daha kötü olduğu ve bu farelerin bilişsel bozukluk sergiledikleri gösterilmiştir¹⁰. Bu bilgilerin ışığında çalışmamızın amacı, ÖUAI değerlerinin ölçülmesi yoluyla doğal yoldan ÖUAI değerleri bozuk (düşük grup) ve sağlıklı (yüksek grup) olarak ayrılan sıçanlarda Morris Su Tankı (MST) testi ile öğrenme-hafıza fonksiyonları ile birlikte hipokampal sinaptik protein düzeylerinde bir fark olup olmadığını araştırmaktır.

Gereç ve Yöntem

Deney Hayvanları

Çalışmada Wistar ırkı, 4-6 haftalık, yaklaşık 150-200 gram ağırlığında, erkek sıçanlar kullanılmıştır. Deney hayvanları Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Yetiştirme ve Araştırma Birimi'nden temin edilmiştir. Deneysel çalışmalar için Bursa Uludağ Üniversitesi Hayvan Deneyleleri Yerel Etik Kurulu'ndan onay alınmıştır (Onay No: 2019 - 04/04). Sıçanlar dörtlü kafeslerde 12 saatlik karanlık/aydınlık döngüsüne tabi tutulacak şekilde 22±2°C ortam sıcaklığında muhafaza edilmişlerdir.

ÖUAI Ölçümü

ÖUAI ölçümleri önceki çalışmalarımızda bildirdiğimiz şekilde yapılmıştır¹¹. Sıçanlar bazal ÖUAI değerlerinin ölçülmesi için irkilme refleksi ölçüm cihazına (SR-LAB, Startle Response System,

Bilişsel Fonksiyonlar ve Hipokampal Sinaptofizin

San Diego Instruments, USA) yerleştirilmiştir. ÖUAİ ölçümü için bazal gürültü 70 dB olacak şekilde ayarlanmış, deney sırasında sıçanlara geliş güzel bloklar halinde sesli uyarılar (120 dB) ve bazal gürültüye göre +4 dB, +8 dB ve +16 dB olacak şekilde 3 farklı desibelde ön uyarılar (74 dB, 78 dB, 86 dB) verilmiştir. Her iki uyarının arasındaki süre 100 ms olarak ayarlanmıştır. Bazal ÖUAİ ölçümü içerisinde 120 db irkilme ve +4 dB, +8 dB ve +16 dB olacak şekilde 3 farklı desibelde ön uyarıların bulunduğu 10 blok şeklinde ve toplam 35 dakika süresince yapılmış ölçüm sonunda sıçanlar kafeslerine yerleştirilmiştir. ÖUAİ değeri aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

$$\% \text{ ÖUAİ} = 100 - [(\text{Ön Uyarı varken irkilme şiddeti}) / (\text{Ön uyarı yokken irkilme şiddeti})] \times 100$$

Bazal Değerlerine Göre Düşük - Yüksek Grupların Belirlenmesi

Otuz adet wistar erkek sıçan yukarıda bahsedildiği şekilde bazal ÖUAİ testine tabi tutulduktan sonra 78 db ön uyarıdaki inhibisyon değerlerine göre düşükten yükseğe sıralanmıştır. Düşük değere sahip 10 sıçan düşük ÖUAİ'lu grubu, yüksek değere sahip 10 sıçan ise yüksek ÖUAİ'lu grubu oluşturmak üzere ayrılmıştır. Orta inhibisyon değerine sahip sıçanlar başka çalışmada kullanılmak üzere bu çalışmadan çıkarılmıştır. Dolayısıyla çalışmamızdaki deneyler toplam 20 adet sıçanda gerçekleştirilmiştir. Bu ayırma yöntemi daha önceki çalışmalarımıza dayanılarak yapılmıştır¹¹.

Morris Su Tankı (MST) Testi

ÖUAİ değerlerine göre düşük ve yüksek olarak ayrılan sıçanlar önceki çalışmalarımızda¹² bildirdiğimiz şekilde MST testine tabi tutulmuştur. Su tankı yaklaşık 150 santimetre çapında 60 santimetre derinliğinde yuvarlak bir havuz olup bütün alanı merkezine dik olacak şekilde konumlandırılmış olan video kamerayla kayıt altına alınmıştır. Tankta musluk suyu kullanılmış olup sıcaklığı 22-24 °C olarak ayarlanmıştır. Deney hayvanının tırmanacağı 10x10 santimetre ebatlarında kaçış platformu, kameranın bağlı olduğu bilgisayar yazılımı (Noldus Ethovision XT 15, Hollanda) ile oluşturulan hayali 4 kadrandan birinin ortasına yüzeyden 1 santimetre aşağıya yerleştirilmiştir. Bilgisayar yazılımının sıçanları takip edebilmesi ve platformun yüzeyden görünmemesi için suyun yüzeyi mercimek büyüklüğünde toksik olmayan polimer malzeme ile kaplanmıştır. Tankın çevresi siyah perdeyle örtülüp, deney hayvanının boşluksal olarak yönünü bulması için her bir yöne çeşitli işaretler yerleştirilmiştir. MST testleri iki aşamada gerçekleştirilmiştir: Birinci aşamada hayvanların 4 gün boyunca suyun altında kalan platformun yerini öğrenmeleri test edilirken (Öğrenme Fazı), ikinci aşamada (5. gün) platform bulunduğu yerden kaldırılarak hayvanların platformun bulunduğu alana vardıkları ve burada geçirdikleri süre (Hafıza Fazı)

test edilmiştir. Öğrenme fazında deney hayvanları her bir kadrandan suya bırakılmış ve platformu bulana kadar geçirdikleri süre kaydedilmiştir. Doksan saniye içinde platformu bulamayan hayvanlar yakalanarak platformun üzerine bırakılmışlar ve burada 30 saniye kalmaları sağlanmıştır. Hafıza fazında ise hedef kadrana girme sıklığı, platform alanını geçme sıklığı, hedef kadranda geçirilen süre, platform alanında geçirilen süre ve toplam yüzme mesafesi kaydedilerek hafıza fonksiyonları değerlendirilmiştir.

Western Blot Yöntemi ile Sinaptofizin Protein Düzeylerinin Analizi

Presinaptik bölgede lokalize Sinaptofizin proteininin düzeyleri Western Blot yöntemi ile analiz edilmiştir¹³. Bu amaçla MST testinin tamamlanmasını takip eden gün sıçanlar Sevofluran (%5) anestezisi altında dekapite edilerek beyinleri çıkarılmış ve bilişsel fonksiyonlarla ilişkili beyin bölgesi olan hipokampus eksize edilmiştir. Takiben hipokampus dokuları soğuk fosfatlı salin (phosphate buffered saline; PBS; pH 7.4) içinde homojenize edilerek elde edilen homojenattan total protein tayini yapılmıştır. Eşit protein miktarına sahip homojenatlar poliakrilamid jel elektroforezine uygulanarak protein bantlarının jel üzerinde ayrışması ve takiben polivinilen diflorid (PVDF) membranlara aktarılması sağlanmıştır. Membranlar gece boyunca primer (rabbit anti-synaptophysin) antikolarıyla inkübe edilmişler ve ertesi gün yıkandıktan sonra primerlere uygun sekonder antikolarla 1 saat boyunca muamele edilmişlerdir. İnkübasyonun sonunda membranların üzerine kemiluminesans solüsyonu dökülerek membranların üzerindeki protein bantları dijital bir tarayıcıda (C-Digit Western Blot Scanner, LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, ABD) okutularak ilgilenilen proteinlerin optik dansiteleri sayısal değere dönüştürülmüştür. Takiben yıkanan membranlarda yapısal bir protein olan beta-aktin (house-keeping protein) tayini yapılması suretiyle sonuçlar sinaptofizin'in beta-aktin'e orantılanmasıyla yarı-kantitatif olarak ifade edilmiştir.

İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler için açık kaynak JASP programı 0.18.1 versiyonu kullanılmıştır. Veriler ortalama ± standart hata olarak sunulmuştur. Düşük ve yüksek grubun üç ön uyarıdaki (74 dB, 78 dB, 86 dB) ÖUAİ verilerinin karşılaştırmaları İki Yönlü Tekrarlı Ölçümler Varyans Analizini takiben *post-hoc* Holm-Sidak testi ile değerlendirilmiştir. Morris su tankı testinde birden fazla zaman aralığındaki karşılaştırmalar için İki Yönlü Tekrarlı Ölçümler Varyans Analizini takiben *post-hoc* Tukey testi ile yapılmıştır. Western Blot ve hafıza testlerinde tek zaman aralığında elde edilen verilerin iki grup arasındaki karşılaştırmaları *student's t* testi ile yapılmıştır. İstatistiksel anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak kabul edilmiştir.

Bulgular

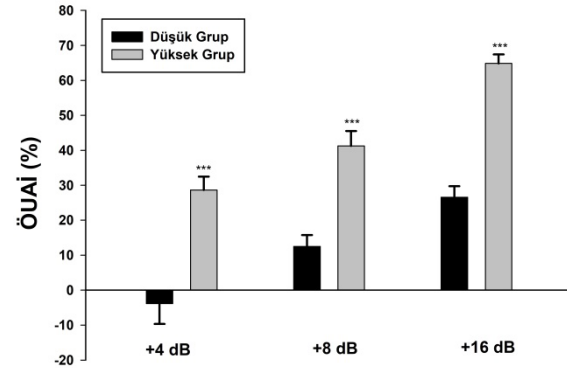
Bazal ÖUAI Değerlerine Düşük ve Yüksek Grupların Oluşturulması

Çalışmanın ilk aşamasında, önceki çalışmalarda gösterildiği gibi düşük ve yüksek gruplara atanan hayvanlar arasında ÖUAI değerleri açısından anlamlı fark olup olmadığını test edildi. ÖUAI değerleri düşük grupta +4 dB için $-3,8 \pm 5,8$; +8 dB için $12,5 \pm 3,2$; +16 dB için $26,5 \pm 3,1$ iken yüksek grupta +4 dB için $28,6 \pm 3,8$; +8 dB için $41,2 \pm 4,2$; +16 dB için $64,8 \pm 2,5$ olarak bulundu. İki Yönlü Tekrarlı Ölçümler Varyans analizi sıçanların bazal ÖUAI düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğunu gösterdi (grup etkisi: $F[1,18] = 53,6$; $p < 0,001$; Şekil 1). Post-hoc testler, yüksek ve düşük grupların her üç ön uyarı seviyesinde de istatistiksel anlamlılığa sahip olduğunu ortaya çıkardı ($p < 0,001$). Bu veriler gruplama stratejimizin başarılı olduğunu gösterdi.

MST Testi ile Öğrenme ve Hafıza Parametrelerinin İncelenmesi

Çalışmanın ikinci kısmında sıçanlar MST testine tabi tutuldu. Öğrenme fazının 1, 2, 3 ve 4. günlerinde platformu bulma süresi düşük inhibisyonlu grupta sırasıyla ortalama $51,96 \pm 6,2$ sn, $35,6 \pm 4,6$ sn, $20,3 \pm 4,1$ sn ve $29,12 \pm 7,9$ sn olarak kaydedilirken yüksek inhibisyonlu grupta ise sırasıyla ortalama $47,88 \pm 4,6$ sn, $26,04 \pm 3,4$ sn, $19,93 \pm 3,9$ sn ve $12,97 \pm 1,9$ sn olarak kaydedildi. İki yönlü tekrarlayan varyans analizi ile yapılan istatistiksel değerlendirmeye göre öğrenme fazında platformu bulma süresi bakımından

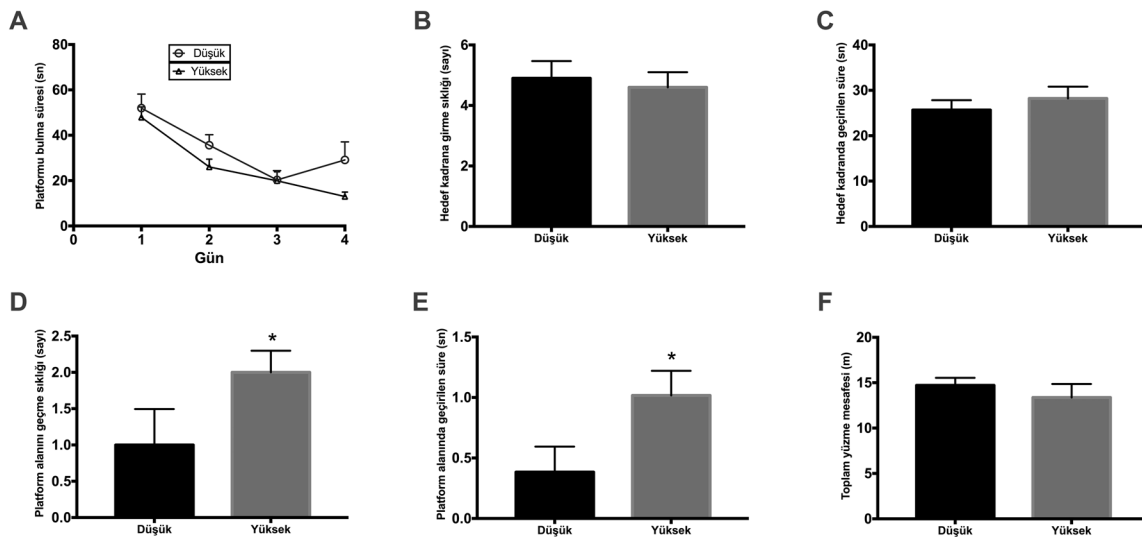
düşük inhibisyonlu grup ile yüksek inhibisyonlu grup arasında anlamlı bir fark bulunamadı ($F[1,18]=2,336$, $p=0,161$; Şekil 2A).



Şekil 1.

Ön Uyarı Aracılı İnhibisyon değerlerine göre sıçanların yüksek ve düşük inhibisyonlu olarak gruplandırılması. Her iki grupta ÖUAI değerleri bazal ses değerine göre (70 dB) +4 dB, +8 dB ve +16 dB'de test edilmiştir. *** $p < 0,001$ düşük ve yüksek grup arasındaki istatistiksel anlamlılığı göstermektedir. ÖUAI=Ön Uyarı Aracılı İnhibisyon.

Öğrenme fazını takiben 5. gün hafıza fazı ölçümleri gerçekleştirildi. Sonuçlara göre düşük inhibisyonlu grup ile yüksek inhibisyonlu grup arasında hedef kadrana girme sıklığı (sırasıyla $4,9 \pm 0,5$ ve $4,6 \pm 0,4$; Şekil 2B) ve hedef kadranda geçirilen süre (sırasıyla $25,6 \pm 2,1$ ve $28,1 \pm 2,4$; Şekil 2C) bakımından



Şekil 2.

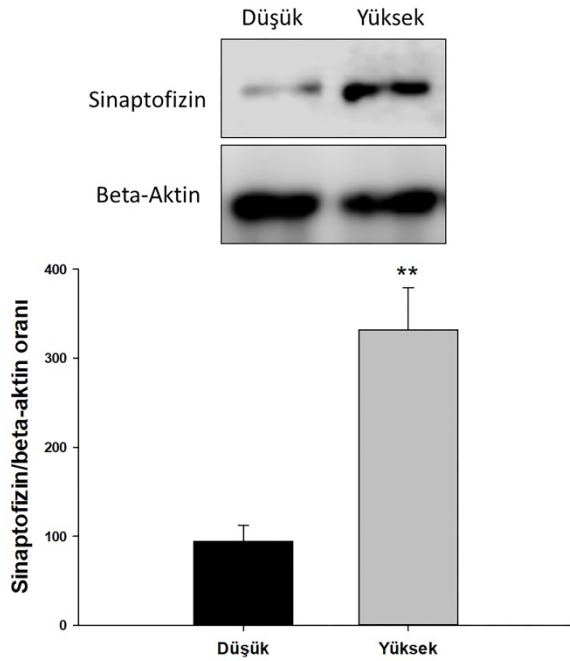
Sıçanların öğrenme (A) ve hafıza (B-F) fonksiyonlarının Morris Su Tankı testi ile incelenmesi. Platformu bulma süresi (A), hedef kadrana girme sıklığı (B), hedef kadranda geçirilen süre (C), platform alanını geçme sıklığı (D), platform alanında geçirilen süre (E) ve toplam yüzme mesafesi (F) analiz edildi. * $p < 0,05$ düşük ve yüksek grup arasındaki istatistiksel anlamlılığı göstermektedir.

Bilişsel Fonksiyonlar ve Hipokampal Sinaptofizin

anlamli bir fark bulunamadı. Ancak platform alanını geçme sıklığı (sırasıyla $1 \pm 0,4$ ve $2 \pm 0,2$; Şekil 2D) ve platform alanında geçirilen süre (sırasıyla $0,38 \pm 0,2$ ve $1,01 \pm 0,1$; Şekil 2E) düşük inhibisyonlu grupta yüksek inhibisyonlu gruba göre anlamlı olarak daha düşük bulundu. Her iki grupta toplam yüzme mesafesinin birbirine çok yakın olması (sırasıyla $14,7 \pm 0,7$ ve $13,3 \pm 1,4$) gruplar arasında motor kuvvet bakımından herhangi bir fark olmadığını gösterdi (Şekil 2F).

Hipokampal Sinaptofizin Düzeyleri

Çalışmanın son ve üçüncü kısmında MST testini takiben sıçanların hipokampus bölgesi çıkarılarak sinaptofizin ve beta-aktin düzeyleri protein düzeyleri Western Blot yöntemi ile ölçüldü. Şekil 3'te görüldüğü üzere düşük grupta sinaptofizin/aktin oranı $94,1 \pm 18,1$ iken yüksek grupta $331,4 \pm 48$ olarak tespit edildi ve istatistiksel anlamlı fark bulundu ($p < 0,01$).



Şekil 3.

Düşük ve yüksek grupta hipokampal sinaptofizin düzeyleri. $**p < 0,01$ düşük ve yüksek grup arasındaki istatistiksel anlamlılığı göstermektedir.

Tartışma ve Sonuç

Çalışmamız bazal ÖUAI değerlerine göre düşük inhibisyonlu ve yüksek inhibisyonlu olarak ayrılan ve Morris su tankı testine tabi tutulan sıçanların hafıza fonksiyonlarının anlamlı olarak farklı olduğunu göstermiştir. Özellikle şizofrenideki ÖUAI bozukluğunu temsil eden düşük grubun hafıza fonksiyonları yüksek gruba göre düşük bulunurken öğrenme düzeyleri arasında anlamlı bir değişiklik

bulunmamıştır. Çalışmanın daha sonraki bölümünden elde edilen veriler sıçanların hipokampus bölgesindeki presinaptik proteinlerden sinaptofizin düzeylerinin düşük inhibisyonlu grupta daha düşük olduğunu göstermiştir. Bulgularımız genetik ve ilaç tedavisi müdahalesi olmadan heterojen sıçanlarda grup taraması yöntemi ile düşük - yüksek ÖUAI olarak gruplandırılmış deneysel şizofreni modelinde gösterilmiş ilk verilerdir.

Şizofreni pozitif, negatif ve bilişsel belirtilerin ön planda olduğu karmaşık bir beyin hastalığıdır. Hastalığın pozitif ve negatif belirtileri genellikle antipsikotik ajanlarla tedavi edilebilirken bilişsel belirtiler için henüz onaylanmış ve kesin olarak ispatlanmış bir tedavi bulunmaması şizofreni hastalarının günlük işlevlerini yerine getirebilmesi açısından sorun oluşturmaktadır. Literatüre bakıldığında deney hayvanları üzerinde yapılan bazı çalışmaların şizofreni hastalarında bilişsel performanstaki spesifik bozulmalarla ÖUAI arasında ilişkili olduğunu öne sürdüğü görülmektedir¹⁰. Aynı şekilde sağlıklı insanlar ve şizofreni hastaları üzerinde yapılan çalışmalar yüksek ÖUAI değerlerine sahip bireylerin strateji oluşturma, planlama verimliliği gibi üstün yürütücü bilişsel işlevleri daha iyi gerçekleştirebildiğini gösterirken düşük ÖUAI sahip bireylerin dikkat ile ilgili testlerde daha düşük derecelerde olduğunu göstermiştir¹⁴⁻¹⁶. Oliveras ve arkadaşları¹⁷, genetik olarak oluşturulmuş, düşük ve yüksek kaçınma davranışı gösteren sıçanlar ile yaptıkları bir çalışmada kaçınma davranışını yüksek oranda gösteren sıçanların ÖUAI değerlerinin daha düşük olduğunu bildirmiştir. Aynı çalışmada düşük ve yüksek ÖUAI değerlerine göre sıçanlar ayrılmış ve su tankı testine tabi tutulmuştur. Uzaysal çalışma hafızası açısından iki grup arasında anlamlı fark bulunmuştur. Düşük inhibisyona sahip grupta uzaysal çalışma hafızası daha kötüdür. Bizim çalışmamızda da platform alanını geçme sıklığı ve platform alanında geçirilen süre düşük inhibisyonlu grupta yüksek inhibisyonlu gruba göre anlamlı olarak daha düşük bulunmuştur. Bulgularımız yukarıdaki çalışma ile paralellik göstermekle birlikte mevcut çalışmamızın bahsedilen çalışmadan en önemli farkı genetik olarak oluşturulmuş bir ırkta değil ilaç ya da genetik herhangi bir müdahalede bulunulmamış olan Wistar Albino ırkı sıçanlarda yapılmış olmasıdır.

Çalışmamızda elde ettiğimiz bir diğer önemli veri ise ÖUAI değerleri ve hafıza fonksiyonları düşük bulunan gruptaki hipokampal sinaptofizin seviyelerinin de dramatik olarak düşük bulunmasıdır. Varty ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışma¹⁸ sosyal izolasyon ile ÖUAI değerleri bozulmuş sıçanların hipokampus bölgesindeki sinaptofizin seviyelerinin düşük olduğunu göstermiştir. Deney hayvanları üzerinden elde edilen bu veri çalışmamızı güçlü şekilde destekler niteliktedir. İlginç olarak Varty ve arkadaşlarının¹⁸

yaptığı çalışmada ÖUAİ seviyelerindeki düşüklük ile sinaptofizin seviyelerindeki düşüklük arasında orantısal paralellik mevcut olup çalışmamızın sonuçlarıyla da uyumludur. Sinaptofizin sinaptik veziküler bir protein olup dağılımı ve yoğunluğu nedeni ile sinaptik belirteç olarak kullanılabilir. İlk olarak Eastwood ve arkadaşlarının¹⁹ şizofreni hastalarının *post mortem* hipokampus bölgesinden elde edilen dokularda sinaptofizin düzeylerinin düşük bulunduğunu göstermelerinin arkasından Glantz ve Lewis²⁰ şizofreni açısından önemli bir bölge olan prefrontal korteks bölgesinde sinaptofizin seviyelerinin düşük olduğunu göstermiştir. Takip eden araştırmalar ile şizofreni hastalığında dorsolateral prefrontal korteks, temporal lobda sinaptofizin, sinapsin II, GAP-43, SNAP-25, Cdc42 ve Duo gibi sinaptik yapı veya fonksiyonda yer alan gen ve proteinlerin ekspresyonunun değiştiği gözlemlenmiştir²⁰⁻²⁹. Yıllar süren uzun araştırmalar ve deneyimler sayesinde şizofreniyi dopamin, glutamat ve serotonin reseptör yollarındaki düzensizliklere bağlayan çeşitli modeller/hipotezler geliştirilmiştir. Şizofreninin patofizyolojisi için kapsamlı olarak incelenen bu yolların önemli bir bölümü presinaptik nörotransmitter salınım mekanizması ile ilgilidir. Bu moleküler olaylar dizisi vezikül alımını, kenetlenmesini, membran füzyonunu ve geri dönüşümünü içeren sinaptik nörotransmisyonuna yol açmaktadır. Birikmiş kanıtlar, şizofrenide rol oynayan önemli beyin bölgelerindeki farklı nörotransmitterler aracılığıyla sinaps sonrası sinyal iletimini etkileyen düzensizliğin son derece önemli olduğunu göstermektedir³⁰. Presinaptik terminallerdeki bu düzensizlik, piramidal, orta dikenli ve internöronlar dâhil olmak üzere farklı nöronların postsinaptik terminalleri üzerinde önemli etkiye neden olabilir ve hastalıkta bildirilen hem dopamin hem de glutamat eksensli patolojilerin altında yatan neden olabilir³¹⁻³³.

Sonuç olarak çalışmamız düşük ÖUAİ düzeylerinin presinaptik sinaptofizin düzeyleri ile ilişkili olabileceğini, sinaptofizinin önemli bir presinaptik veziküler protein olması nedeni ile başta nörotransmitter salınımı ve postsinaptik iletide düzensizliğe neden olabileceğini düşündürmektedir. Düşük ÖUAİ sahip hayvanlarda görülen bilişsel fonksiyon bozukluğu hipokampus bölgesindeki sinaptofizin seviyelerinin düşüklüğü ile uyumlu olup presinaptik dengesizliği ortaya koyan nörotransmitter salınımı konusunda daha ayrıntılı çalışmalar yapılması şizofrenide gözlemlenen bilişsel bozukluğu aydınlatmak adına önem arz etmektedir. Bulgularımız ayrıca çalışmada kullanılan deneysel şizofreni modeli olan düşük-yüksek ÖUAİ modelinin şizofreni patolojisine oldukça yakın patolojileri yansıttığını ve güvenilir bir hayvan modeli olduğunu göstermektedir.

Etik Kurul Onay Bilgisi:

Onaylayan Kurul: Bursa Uludağ Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
Onay Tarihi: 03.04.2019
Karar No: 2019 - 04 / 04

Araştırmacı Katkı Beyanı:

Fikir ve tasarım: A.P.V.,M.C.,G.G.,Ş.E.Ç.; Veri toplama ve işleme: E.E.,C.K.,Ş.M.,İ.M.; Analiz ve verilerin yorumlanması: M.C.,G.G. E.E.,C.K.,Ş.M.; Makalenin önemli bölümlerinin yazılması: E.E.,C.K.,Ş.M., İ.M., A.P.V., M.C.,G.G., Ş.E.Ç.

Destek ve Teşekkür Beyanı:

Bu makalede yer alan çalışmalar KUAP(T)-2020/1 nolu proje kapsamında Bursa Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir.

Çıkar Çatışması Beyanı:

Makale yazarlarının çıkar çatışması beyanı yoktur.

Kaynaklar

- Schultz SH, North SW, Shields CG. Schizophrenia: A review. *Am Fam Physician*. 2007;75(12).
- Weickert CS, Weickert TW, Pillai A, Buckley PF. Biomarkers in schizophrenia: A brief conceptual consideration. *Dis Markers*. 2013;35(1):3-9. doi:10.1155/2013/510402
- Jones C, Watson D, Fone K. Animal models of schizophrenia. *Br J Pharmacol*. 2011;164(4):1162-1194. doi:10.1111/j.1476-5381.2011.01386.x
- Allen AJ, Griss ME, Folley BS, Hawkins KA, Pearlson GD. Endophenotypes in schizophrenia: A selective review. *Schizophr Res*. 2009;109(1-3):24-37. doi:10.1016/j.schres.2009.01.016
- Gould TD, Gottesman II. Psychiatric endophenotypes and the development of valid animal models. *Genes, Brain Behav*. 2006;5(2):113-119. doi:10.1111/j.1601-183X.2005.00186.x
- Parwani A, Duncan EJ, Bartlett E, et al. Impaired prepulse inhibition of acoustic startle in schizophrenia. *Biol Psychiatry*. 2000;47(7):662-669. doi:10.1016/S0006-3223(99)00148-1
- Mena A, Ruiz-Salas JC, Puentes A, Dorado I, Ruiz-Veguilla M, De la Casa LG. Reduced prepulse inhibition as a biomarker of schizophrenia. *Front Behav Neurosci*. 2016;10(OCT). doi:10.3389/fnbeh.2016.00202
- Osimo EF, Beck K, Reis Marques T, Howes OD. Synaptic loss in schizophrenia: a meta-analysis and systematic review of synaptic protein and mRNA measures. *Mol Psychiatry*. 2019;24(4):549-561. doi:10.1038/s41380-018-0041-5
- Catts VS, Derminio DS, Hahn CG, Weickert CS. Postsynaptic density levels of the NMDA receptor NR1 subunit and PSD-95 protein in prefrontal cortex from people with schizophrenia. *npj Schizophr*. 2015;1(1). doi:10.1038/npjischz.2015.37
- Sampedro-Viana D, Cañete T, Mourelo L, et al. Low prepulse inhibition predicts lower social interaction, impaired spatial working memory, reference memory and cognitive flexibility in genetically heterogeneous rats. *Physiol Behav*. 2023;271(May):114355. doi:10.1016/j.physbeh.2023.114355
- Oral S, Göktalay G. Prepulse inhibition based grouping of rats and assessing differences in response to pharmacological agents. *Neurosci Lett*. 2021;755. doi:10.1016/j.neulet.2021.135913
- Goren B, Cakir A, Ocalan B, et al. Long-term cognitive effects of uridine treatment in a neonatal rat model of hypoxic-ischemic encephalopathy. *Brain Res*. 2017;1659:81-87. doi:10.1016/j.brainres.2017.01.026
- Cansev M, Minbay Z, Goren B, et al. Neuroprotective effects of uridine in a rat model of neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *Neurosci Lett*. 2013;542. doi:10.1016/j.neulet.2013.02.035

Bilişsel Fonksiyonlar ve Hipokampal Sinaptofizin

14. Csomor PA, Yee BK, Feldon J, Theodoridou A, Studerus E, Vollenweider FX. Impaired prepulse inhibition and prepulse-elicited reactivity but intact reflex circuit excitability in unmedicated schizophrenia patients: A comparison with healthy subjects and medicated schizophrenia patients. *Schizophr Bull.* 2009;35(1):244-255. doi:10.1093/schbul/sbm146
15. Hagan JJ, Jones DNC. Predicting drug efficacy for cognitive deficits in schizophrenia. In: *Schizophrenia Bulletin.* Vol 31. ; 2005:830-853. doi:10.1093/schbul/sbi058
16. Bitsios P, Giakoumaki SG, Theou K, Frangou S. Increased prepulse inhibition of the acoustic startle response is associated with better strategy formation and execution times in healthy males. *Neuropsychologia.* 2006;44(12):2494-2499. doi:10.1016/j.neuropsychologia.2006.04.001
17. Oliveras I, Río-Álamos C, Cañete T, et al. Prepulse inhibition predicts spatial working memory performance in the inbred Roman high- and low-avoidance rats and in genetically heterogeneous NIH-HS rats: Relevance for studying pre-attentive and cognitive anomalies in schizophrenia. *Front Behav Neurosci.* 2015;9(AUGUST). doi:10.3389/fnbeh.2015.00213
18. Varty GB, Marsden CA, Higgins GA. Reduced synaptophysin immunoreactivity in the dentate gyrus of prepulse inhibition-impaired isolation-reared rats. *Brain Res.* 1999;824(2):197-203. doi:10.1016/S0006-8993(99)01173-7
19. Eastwood SL, Burnet PWJ, Harrison PJ. Altered synaptophysin expression as a marker of synaptic pathology in schizophrenia. *Neuroscience.* 1995;66(2):309-319. doi:10.1016/0306-4522(94)00586-T
20. Glantz LA, Lewis DA. Reduction of synaptophysin immunoreactivity in the prefrontal cortex of subjects with schizophrenia regional and diagnostic specificity. *Arch Gen Psychiatry.* 1997;54(10):943-952. doi:10.1001/archpsyc.1997.01830220065010
21. Eastwood SL, Cairns NJ, Harrison PJ. Synaptophysin gene expression in schizophrenia: Investigation of synaptic pathology in the cerebral cortex. *Br J Psychiatry.* 2000;176(MAR.):236-242. doi:10.1192/bjp.176.3.236
22. Hill JJ, Hashimoto T, Lewis DA. Molecular mechanisms contributing to dendritic spine alterations in the prefrontal cortex of subjects with schizophrenia. *Mol Psychiatry.* 2006;11(6):557-566. doi:10.1038/sj.mp.4001792
23. Ide M, Lewis DA. Altered Cortical CDC42 Signaling Pathways in Schizophrenia: Implications for Dendritic Spine Deficits. *Biol Psychiatry.* 2010;68(1):25-32. doi:10.1016/j.biopsych.2010.02.016
24. Karson CN, Mrak RE, Schluterman KO, Sturmer WQ, Sheng JG, Griffin WST. Alterations in synaptic proteins and their encoding mRNAs in prefrontal cortex in schizophrenia: A possible neurochemical basis for "hypofrontality." *Mol Psychiatry.* 1999;4(1):39-45. doi:10.1038/sj.mp.4000459
25. Sawada K, Young CE, Barr AM, et al. Altered immunoreactivity of complexin protein in prefrontal cortex in severe mental illness. *Mol Psychiatry.* 2002;7(5):484-492. doi:10.1038/sj.mp.4000978
26. Tan ML, Dyck BA, Gabriele J, et al. Synapsin II gene expression in the dorsolateral prefrontal cortex of brain specimens from patients with schizophrenia and bipolar disorder: Effect of lifetime intake of antipsychotic drugs. *Pharmacogenomics J.* 2014;14(1):63-69. doi:10.1038/tpj.2013.6
27. Thompson PM, Sower AC, Perrone-Bizzozero NI. Altered levels of the synaptosomal associated protein SNAP-25 in schizophrenia. *Biol Psychiatry.* 1998;43(4):239-243. doi:10.1016/S0006-3223(97)00204-7
28. Varea E, Guirado R, Gilabert-Juan J, et al. Expression of PSA-NCAM and synaptic proteins in the amygdala of psychiatric disorder patients. *J Psychiatr Res.* 2012;46(2):189-197. doi:10.1016/j.jpsychires.2011.10.011
29. Webster MJ, Shannon Weickert C, Herman MM, Hyde TM, Kleinman JE. Synaptophysin and GAP-43 mRNA levels in the hippocampus of subjects with schizophrenia. *Schizophr Res.* 2001;49(1-2):89-98. doi:10.1016/S0920-9964(00)00052-9
30. Egbujo CN, Sinclair D, Hahn CG. Dysregulations of Synaptic Vesicle Trafficking in Schizophrenia. *Curr Psychiatry Rep.* 2016;18(8). doi:10.1007/s11920-016-0710-5
31. Anzalone A, Lizardi-Ortiz JE, Ramos M, et al. Dual control of dopamine synthesis and release by presynaptic and postsynaptic dopamine D2 receptors. *J Neurosci.* 2012;32(26):9023-9024. doi:10.1523/JNEUROSCI.0918-12.2012
32. Antonucci F, Corradini I, Morini R, et al. Reduced SNAP-25 alters short-term plasticity at developing glutamatergic synapses. *EMBO Rep.* 2013;14(7):645-651. doi:10.1038/embor.2013.75
33. Brunelin J, Fecteau S, Suaud-Chagny M-F. Abnormal Striatal Dopamine Transmission in Schizophrenia. *Curr Med Chem.* 2013;20(3):397-404. doi:10.2174/0929867311320030011

