

SOSYAL İZOLASYONUN NEDEN OLDUĞU STRESİN OKSİDATİF STRES BELİRTEÇLERİ VE ÖĞRENME İLE İLİŞKİLİ NÖROGRANİN/ CAMKII/CREB PROTEİNLERİNE ETKİSİ

THE EFFECTS OF SOCIAL ISOLATION-INDUCED STRESS ON OXIDATIVE STRESS MARKERS AND LEARNING-RELATED NEUROGRANIN/CAMKII/CREB PROTEINS

İnci TURAN, Hale SAYAN ÖZAÇMAK

Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Tıp Fakültesi, Fizyoloji Ana Bilim Dalı

ÖZET

AMAÇ: Sosyal izolasyon (Sİ) hem insanlar için hem de ratlar gibi sosyal hayvanlar için önemli bir stres faktörüdür. Sİ stresine maruz kalan ratların davranışsal bozukluklar gösterdiği ve kognitif fonksiyonlarının bozulduğu bilinmektedir. Bu çalışmanın amacı erken dönemde oluşturulan Sİ stresinin öğrenme ve hafızayı nasıl etkilediğini ve sinaptik proteinlerde meydana gelen değişiklikleri incelemektir.

GEREÇ VE YÖNTEM: Çalışmada 21 günlük 20 adet erkek Wistar albino cinsi rat kullanıldı. Ratlar rastgele 2 gruba ayrıldı: 1) Kontrol grubu (n=10), 2) Sİ grubu (n=10). Sİ doğum sonrası 21. günde sütten kesmenin ilk gününden itibaren 6 hafta boyunca her sıçanın farklı kafeslerde barındırılmasıyla gerçekleştirildi. Kontrol grubu hayvanları ise her kafeste 3-4 sıçan olacak şekilde ve sosyal etkileşimin gerçekleşeceği standart koşullarda barındırıldı. 6 haftalık süre sonunda öğrenme ve hafızayı değerlendirmek için Morris su labirent (MWM) testi kullanıldı. Test sonunda ratlar feda edilerek hipokampus dokuları toplandı. Doku malondialdehid (MDA) ve indirgenmiş glutatyon (GSH) seviyeleri spektrofotometrik olarak ve nörogranin, kalsiyum/kalmodulin bağımlı protein kinaz tip II (CaMKII), Döngüsel AMP (cAMP) cevap elementine bağlanan protein (CREB) ve Beyinden türeyen nörotrofik faktör (BDNF) seviyeleri ELISA ile değerlendirildi.

BULGULAR: Sİ ve kontrol grubu arasında MWM testinde öğrenme ve hafıza açısından fark saptanmadı. Hipokampus dokusunda nörogranin, CaMKII ve CREB düzeyleri gruplar arasında farklı değildi. Sİ yapılan grupta hipokampus MDA düzeyi artarken, GSH ve BDNF düzeyleri azaldı.

SONUÇ: Çalışmamızda sütten kesme sonrası oluşturulan altı haftalık Sİ stresinin öğrenme ve hafıza bozukluğuna neden olmadan hipokampüste oksidatif stresi arttırdığı, BDNF düzeylerini düşürdüğü ve diğer sinaptik proteinleri değiştirmediği gösterildi.

ANAHTAR KELİMELEER: Sosyal İzolasyon Stresi, Öğrenme ve Hafıza, Nörogranin/CaMKII/CREB Yolağı, BDNF.

ABSTRACT

OBJECTIVE: Social isolation (SI) is an important stress factor for both humans and social animals such as rats. It is known that rats exposed to SI stress show behavioral disorders and their cognitive functions are impaired. The aim of this study is to examine how early period social isolation stress affects learning and memory and changes in synaptic proteins.

MATERIAL AND METHODS: In this study, 20 male Wistar albino rats aged 21 days was used. Rats were randomly divided into 2 groups: 1) Control group (n=10), 2) SI group (n=10). SI was achieved by keeping each rat in different cages for 6 weeks from the first day of weaning on the 21st postnatal day. Control group animals were housed with 3-4 rats in each cage and in standard conditions where social interaction would take place. The Morris water maze (MWM) test was used to assess learning and memory at the end of the 6-week period. At the end of the test, rats were sacrificed and hippocampus tissues were collected. Tissue malondialdehyde (MDA) and reduced glutathione (GSH) levels were determined spectrophotometrically and neurogranin, calcium/calmodulin-dependent Protein kinase II (CaMKII), cyclic AMP (cAMP) Response-Element Binding Protein (CREB) and Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) Levels Were Evaluated by ELISA.

RESULTS: There was no difference between the social isolation and control groups in terms of learning and memory in the MWM test. Neurogranin, CaMKII and CREB levels in hippocampus tissue were not different between groups. In the SI group, while hippocampus MDA levels increased, GSH and BDNF levels decreased.

CONCLUSIONS: In our study, it was shown that SI induced-stress for six weeks in post-weaning period increased oxidative stress and decreased BDNF levels and did not change other synaptic proteins in the hippocampus without causing learning and memory impairment.

KEYWORDS: Social Isolation Stress, Learning and Memory, Neurogranin/ CaMKII/CREB Pathway, BDNF.

Geliş Tarihi / Received: 29.08.2024

Kabul Tarihi / Accepted: 12.01.2025

Yazışma Adresi / Correspondence: Doç. Dr. İnci TURAN

Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Tıp Fakültesi, Fizyoloji Ana Bilim Dalı

E-mail: dr.incituran@gmail.com

Orcid No (Sırasıyla): 0000-0003-2211-3914, 0000-0002-3564-0468

Etik Kurul / Ethical Committee: Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (2019-12-12/09).

GİRİŞ

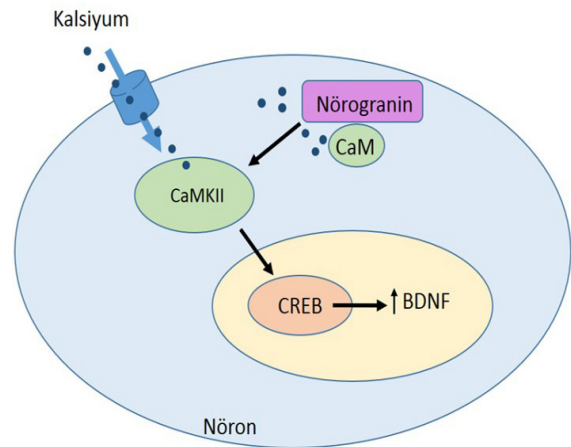
Kronik stres, mental bozuklukların ortaya çıkması için önemli çevresel bir risk faktörüdür. Özellikle erken dönemde yaşanan sosyal izolasyon gibi stresler beyin gelişimini etkilemekte ve mental bozuklukların oluşmasına neden olmaktadır (1). Sosyal izolasyon (Sİ) stresi günümüzde oldukça sık gözlenen ve çevredeki aynı türün üyeleriyle temas eksikliği içeren çevresel bir problemdir. Sİ fiziksel ve mental sağlığı etkilerken, bir yandan da duygusal ve bilişsel bozukluklara yol açmaktadır (2). Yaşamın erken dönemlerinde yaşanan Sİ'nun uzun süreli davranışsal bozukluklara, nöroendokrinolojik ve immünolojik değişikliklere neden olduğu bildirilmiştir (3). Hipokampus hafıza ve öğrenmenin oluşumunda önemli bir beyin bölgesidir. Hipokampal gelişimin çoğu doğum sonrası (post-natal) dönemde gerçekleşir. Postnatal dönem; aşırı seviyelerde endojen salınan kimyasallara maruz kalındığında hipokampusun yapısının kalıcı olarak değişebileceği kritik bir dönemi temsil etmektedir (4). Sİ Alzheimer, depresyon, anksiyete ve şizofreni gibi çeşitli nöropsikiyatrik hastalıklara eğilimi arttırmaktadır. Yapılan çalışmalar sütten kesildikten birkaç hafta sonra Sİ'a maruz kalan kemirgenlerin, anksiyete benzeri davranış ve bilişsel işlev bozukluğu ile birlikte anormal agresif davranışlar sergilediğini göstermektedir (5 - 7). Shao ve ark. (7) 8 haftalık sosyal izolasyonun hipokampüste glutamat ve glutamin düzeylerini azalttığını ve oksidatif stresi arttırdığını göstermişlerdir. Beyinden türeyen nörotrofik faktör (BDNF) nöron sağkalımında, öğrenmede ve yeni sinaps yapımında görev alan en önemli nörotrofinlerden birisidir. Sİ'nun BDNF gibi protein düzeylerinde değişikliklere ve öğrenmede bozulmaya yol açtığı bildirilmektedir (8). Ancak, Sİ'nun öğrenmeyi nasıl etkilediği ve altta yatan karmaşık mekanizmaların açıklanması konusundaki çalışmalar yetersizdir.

Kalsiyum/kalmodulin bağımlı protein kinaz tip II (CaMKII), nöronal dokularda, özellikle hipokampal bölgenin gelişiminde yüksek oranda ifade edilen çok işlevli bir protein kinazdır ve sinaptik bir sinyal molekülüdür (9). CaMKII uzun süreli potansiyasyonda (LTP'de) görev alır ve böylece uzun süreli hafızanın oluşumuna katkı sağlar. CaMKII, cAMP cevap elementi-

ne bağlanan protein (CREB) gibi önemli birçok molekülün fosforilasyonunu sağlar. CREB; bir transkripsiyon faktörüdür ve nöronal gelişme, nöronal sağkalım, sirkadyen ritim, bağımlılık, depresyon, öğrenme ve hafıza ile ilgili yüzden fazla hedef geni düzenlemektedir. CREB transkripsiyonel kaskadındaki herhangi bir bozukluğun oksidatif stres, apoptoz ve nörodejenerasyon ile ilişkili olabileceği gösterilmiştir (10).

Nörogranin postsinaptik bölümde bulunan ve plastisiteyi belirleyen bir proteindir. Nörogranin, özellikle duygu ve davranış ile ilgili beyin bölgeleri başta olmak üzere beyin korteksi, hipokampus, amigdala ve striatumda yüksek miktarda ifade edilmektedir. Nörograninin kalsiyum üzerindeki düzenleyici etkisi LTP oluşumu, sinaptik plastisite ve öğrenme ve hafızadaki rolünü oluşturmaktadır (11). Nörogranin knockout farelerde yapılan çalışmalar farelerin normal bir fenotip gösterdiğini ancak uzamsal öğrenmenin bozulduğunu göstermiştir (12).

Sütten kesim sonrası yapılan izolasyon, sosyal izolasyonun kemirgenlerdeki etkilerini araştırmak için kullanılan yaygın bir prosedürdür. Sütten kesim sonrası Sİ'nun, öğrenme ve hafıza için önemli olan beyin bölgelerini nasıl etkilediğine ilişkin veriler yetersiz olduğundan, çalışmamızın temel amacı Sİ'nun öğrenme ve hafıza üzerindeki etkilerini incelemektir. Ayrıca altta yatan olası mekanizmalara yönelik Nörogranin/CaMKII/CREB/BDNF (Şekil 1) protein düzeylerinin Sİ stresi ile nasıl değiştiğini göstermeyi amaçladık.



Şekil 1: Nöronlarda öğrenme ve hafızada etkili olan Nörogranin/CaMKII/CREB/BDNF sinyalizasyon yolağı, CaM:Kalmodulin, CaMKII: kalsiyum/kalmodulin bağımlı protein kinaz tip II, CREB: cAMP cevap elementine bağlanan protein, BDNF: Beyinden türeyen nörotrofik faktör

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada sıçanlar Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezinden temin edilmiştir. Çalışmada hayvanlar laboratuvarın standart hayvan barındırma koşulları ile 12 saat aydınlık-12 saat karanlık olacak şekilde, 21-22°C sıcaklıkta, %50-60 nem ve standart pellet rat yemi ve su verilerek barındırıldı. Çalışmada 20 adet 21 günlük erkek Wistar albino cinsi sıçanlar kullanıldı. Sosyal izolasyon doğum sonrası 21. günde sütten kesmenin ilk gününden itibaren her sıçanın farklı kafeslere yerleştirilmesiyle gerçekleştirildi. Kontrol grubu hayvanları her kafeste 3-4 sıçan olacak ve sosyal etkileşimin gerçekleşeceği standart koşullarda barındırıldı.

Sıçanlar ilk olarak rastgele 2 gruba ayrıldı:

1. Sİ grubu (n:10)(1 kafeste 1 sıçan barındırıldı)
2. Sosyal Etkileşimli Kontrol grubu (n:10) (1 kafeste 3-4 sıçan barındırıldı)

Sİ 6 hafta boyunca sürdürüldü. Bu süre boyunca hayvanlara herhangi bir ilaç uygulaması ya da girişim yapılmadı. Bu sürenin sonunda öğrenme ve hafızayı değerlendirmek için Morris su tankı testi uygulandı. Hayvanlar feda edildikten sonra çıkarılan beyin dokularından hipokampus dokuları izole edildi. Hipokampus dokularının bir kısmı ile oksidatif stres belirteci olan malondialdehid (MDA) ve indirgenmiş glutatyon (GSH) düzeyleri spektrofotometrik yöntemle ölçüldü. Diğer kısmı ile Nörogranin/CaMKII ve CREB düzeyleri ELISA yöntemi ile ticari kitler kullanılarak ölçüldü.

MWM testi: Uzamsal öğrenme ve hafıza performanslarını değerlendirmek için tüm hayvanlar MWM testine tabi tutuldu (13). Bu testte kullanılan dairesel tank (150 cm çapında, 60 cm derinliğinde ve $22 \pm 1^\circ\text{C}$ 'de opak suyla doldurulmuş) görünmez bir kaçış platformu içermektedir. Platform (10 cm çapında) su yüzeyinin yaklaşık 2 cm altına yerleştirilmiştir. Laboratuvar odasının duvarlarına farklı görsel ipuçları yerleştirilip hayvanların konumlarını belirlemelerine yardımcı olmak için konumları deney prosedürü boyunca sabit kaldı. MWM testi toplam 6 gün sürdü.

Sıçanlar ilk gün görünür platform ile eğitildiler. Tank dört eşit kadrana bölündü [(kuzey (K), doğu (D), güney (S) ve batı (B))]. Art arda 4 gün eğitim aşamasında her sıçan farklı kadrandan kaçış platformunu bulması için suya bırakıldı. Sıçanların 60 saniye boyunca gizli kaçış platformunu bulması beklendi. Sıçanların platformu bulma süresi kaydedildi (latans süresi olarak adlandırılmaktadır). Bu sürede platformu bulamayan sıçanlar platforma yerleştirilip 15 saniye öğrenmeleri için beklendi. Son gün ise gizli kaçış platformu kaldırılarak (probe test olarak bilinmektedir) sıçanların platformun bulunduğu kadranda geçirdikleri süre kaydedildi.

Biyokimyasal Parametreler

MDA ve GSH tayini

Hipokampus dokusu lipid peroksidasyon düzeyi, doku MDA içeriğinin ölçülmesiyle belirlendi. Kısaca, tüm doku numuneleri buz soğukluğunda trikloroasetik asit (%10 TCA) eklenerek doku homojenizatöründe mekanik olarak homojenize edildi ve santrifüj edildi. Ardından elde edilen süpernatana %0.67'lik tiyobarbitürik asit ilave edildi ve 15 dakika boyunca 100°C 'de kaynatıldı. Daha sonra numunelerin absorbansları spektrofotometrik olarak 535 nm'de ölçüldü (14). GSH major endojen bir antioksidandır. GSH seviyeleri Aykac yöntemine göre ölçüldü (15). MDA tayininde elde edilen süpernatant kullanılarak mikrosantrifüj tüplerinde 1,5 ml süpernatant $18-20^\circ\text{C}$ 'de 3000g'de 8 dakika santrifüj edildi. Oluşan süpernatana 1 ml 0,3M Na_2HPO_4 ve 125 μl ditiobisnitrobenzoat eklendi. Vorteksleme sonrası örnekler 412 nm'de spektrofotometrede okundu.

Nörogranin, CaMKII, CREB ve BDNF Tayinleri

Hipokampus doku örnekleri homojenize edildikten sonra (3000 rpm'de 20 dakika) santrifüj edilerek süpernatantlar elde edildi. Nörogranin (Bioassay Technology Laboratory, E2458Ra), CaMKII (Bioassay Technology Laboratory, E0238Ra) ve CREB (Bioassay Technology Laboratory E0039Ra) ve BDNF düzeyleri ticari kit kullanılarak enzyme-linked immün sorbent assay (ELISA) yöntemi ile ölçüldü. Sonuçlar oluşturulan standart eğriye göre hesaplanarak analiz edildi.

Etik Kurul

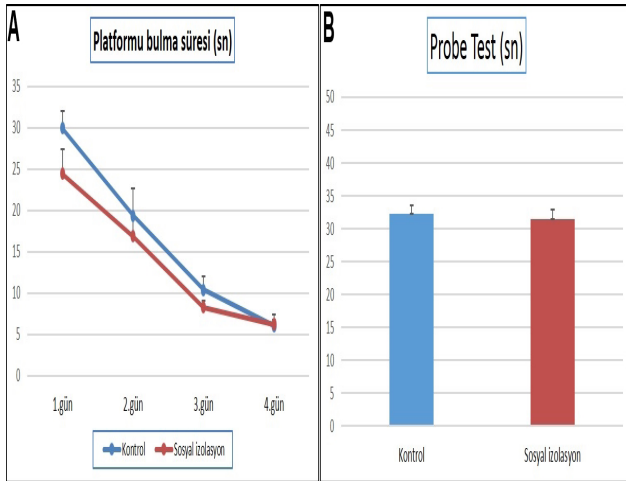
Çalışma prosedürü için Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulundan onaylı etik izin belgesi alınmıştır (Protokol no:2019-12-12/09).

İstatistiksel Analiz

Verilerin değerlendirilmesi SPSS 22 istatistik paket programı kullanılarak yapılmıştır. Tanımlayıcı istatistikler ortalama, standart sapma, medyan, minimum ve maksimum değerleriyle verilmiştir. Nicel değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro Wilk testi ile incelenmiştir. Gruplar arasındaki fark Mann Whitney-U testi ile belirlenmiştir. Sonuçlar için p değeri 0,05'ten küçük olduğunda istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

BULGULAR

MWM sonuçları: Platformu bulma süreleri değerlendirildiğinde; 4 gün boyunca kontrol grubu ile Sİ grubu arasında platformu bulma süresi açısından fark saptanmamıştır ($p>0,05$). Hedef kadranda geçirilen süreyi değerlendiren probe testinde gruplar arasında geçirilen süre bakımından farklılık gözlenmemiştir ($p>0,05$) (**Şekil 2**).



Şekil 2: MWM testinde grupların platformu bulma ve probe test süreleri. Gruplar arasında platformu bulma süreleri ve probe testinde farklılık saptanmamıştır ($p>0,05$).

Yani öğrenme ve hafıza açısından 6 haftalık Sİ ve kontrol grupları arasında farklılık saptanmamıştır. Kontrol grubunda grup içi günler arası karşılaştırma yapıldığında, 1. günden 4. güne kadar yapılan platformu bulma eğitiminde 1. gün ile 3 ve 4. günler arasında anlamlı farklılık saptanmıştır (sırasıyla $p=0,030$, $p=0,01$). Sıçanlar platformu

ilk güne göre karşılaştırıldığında kısa zamanda bulabilmişlerdir. Sİ grubunda günler arası karşılaştırma yapıldığında 1. gün ile 3 ve 4. günler arasında anlamlı farklılık saptanmıştır (sırasıyla $p=0,006$, $p<0,001$). Aynı zamanda 2 ve 4. günler arasında anlamlı farklılık saptanmıştır ($p=0,011$). Sİ grubu da günler arası karşılaştırmada platformu daha kısa sürede bulabilmişlerdir (**Tablo 1**).

Tablo 1: MWM testinde grupların platformu bulma ve probe test süreleri. Değerler ort. (min-maks) olarak verilmiştir.

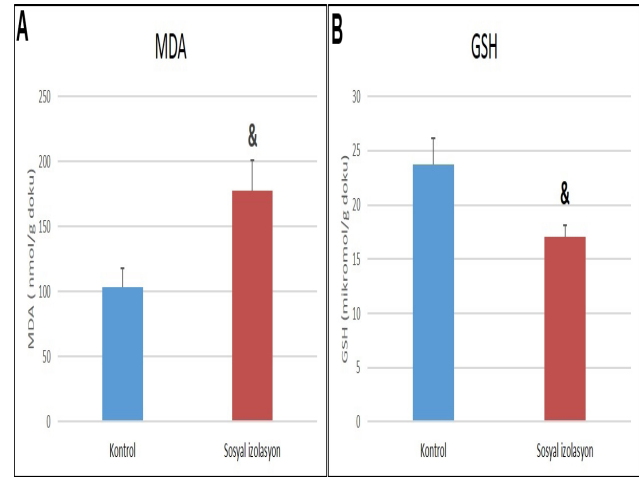
	Kontrol	Sosyal İzolasyon	p
Probe Test (sn)	32 (23 - 37)	32,5 (22 - 39)	0,823
1.Gün (sn)	31 (18,5 - 39,75)	23,25 (9,25 - 45,5)	0,131
2.Gün (sn)	15,87 (4 - 36,75)	17,25 (4 - 29,75)	0,689
3.Gün (sn)	10,62 (5 - 27)*	7,37 (5 - 13,25)*	0,131
4.Gün (sn)	9,12 (2,75 - 17,25)*	5,25 (4,25 - 9,5)**	0,286

* grup içi karşılaştırmada 1. güne göre farklılığı göstermektedir ($p<0,05$).

grup içi karşılaştırmada 2. güne göre farklılığı göstermektedir ($p<0,05$).

Oksidatif Stres Parametreleri

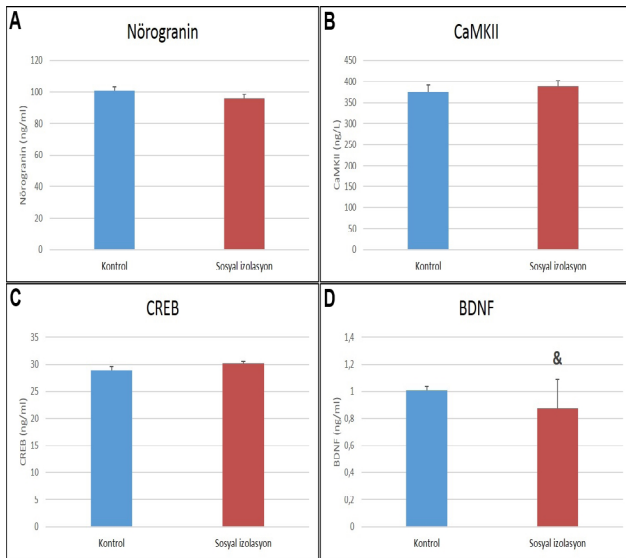
Gruplar arasında hipokampus dokusu MDA düzeyleri karşılaştırıldığında Sİ grubunda kontrol grubuna göre artış saptanmıştır ($p=0,016$). Yani 6 haftalık Sİ stresi hipokampüste oksidatif stresin artmasına neden olmuştur. GSH düzeyleri ise Sİ grubunda kontrol grubuna göre azalmıştır ($p=0,031$) (**Şekil 3**, **Tablo2**).



Şekil 3: Grupların hipokampus MDA ve GSH düzeyleri, & : Kontrol grubuna göre farklılığı göstermektedir ($p<0,05$).

Hipokampus Sinaptik Protein Düzeyleri

Hipokampus nörogranin, CaMKII ve CREB düzeyleri karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir ($p>0,05$). Hipokampus BDNF düzeyleri karşılaştırıldığında Sİ grubunda kontrol grubuna göre anlamlı farklılık gözlenmiştir ($p<0,001$) (**Şekil 4**, **Tablo2**). Altı haftalık Sİ stresinin sinaptik proteinlerden BDNF dışında değişiklik yaratmadığı gözlenmektedir.



Şekil 4: Grupların hipokampus nörogranin, CaMKII, CREB ve BDNF düzeyleri, & Kontrol grubuna göre farklılığı göstermektedir ($p < 0,05$).

Tablo 2: Grupların hipokampus nörogranin, CaMKII, CREB, BDNF, MDA ve GSH düzeyleri. Değerler ort. (min-maks) olarak verilmiştir.

Nörogranin (ng/ml)	94,25 (55,6 - 110,6)	101,9 (73,3 - 113,5)	0,374
CaMKII (ng/L)	371,8 (234,7 - 502,4)	394,5 (312,7 - 501)	0,547
CREB (ng/ml)	28,35 (24,6 - 31,2)	30,05 (27,6 - 33,7)	0,052
BDNF (ng/ml)	1,05 (0,79 - 1,25)	0,925 (0,86 - 1,08)	0,045 ^a
MDA (nmol/g)	103,5 (89,3-117,9)	177,5 (143,2-235,6)	0,016 ^a
GSH (μmol/g)	23,75 (20,4-28,5)	17,08 (15,6-19,9)	0,031 ^a

a kontrol grubuna göre farklılığı göstermektedir.

TARTIŞMA

Çalışmamızda sütten kesme sonrası 6 hafta boyunca oluşturulan Sİ'nun MWM testi ile değerlendirilen öğrenme ve hafızada bir değişiklik yaratmadığı gözlemlendi. Bu çalışmada Sİ ile hipokampüste oksidatif stres artarken, BDNF düzeyleri azalmış olarak bulundu.

Uzamsal bellek, hayvan modellerinde genellikle bilişsel işlevi değerlendirmek için bir indeks olarak kullanılmaktadır ve hipokampus uzamsal bellek için çok önemli bir beyin bölgesidir (16). Çalışmamızda uzamsal bellek gibi bilişsel fonksiyonları değerlendirebilmek için MWM testi kullanılmıştır. Sütten kesme sonrası oluşturulan Sİ'nun öğrenme ve hafızada bozulmalara neden olduğunu (16 - 18) gösteren çok sayıda çalışma olduğu gibi, hafızayı güçlendirdiğini (19) gösteren çalışmalar da bulunmaktadır. Bizim çalışmamızda ise MWM testinde gruplar arasında öğrenme ve hafıza açısından herhangi bir fark bulunamamıştır. Yani sütten kesme sonrası uygulanan 6 haftalık Sİ stresi öğrenme ve hafızayı değiştirmemiştir. Okudan ve ark. (17) sıçanlar-

da sütten kesme sonrası yaptıkları 90 günlük Sİ'nun, prob testinde hedef kadranı çaprazlama sayılarının düşmesine neden olduğunu ve böylece hafızayı etkilediğini göstermişlerdir. Yapılan diğer bir çalışmada 6 haftalık sürenin 3 haftasında günlük 6 saatlik sosyal izolasyona maruz bırakılan ratlarda hafızanın bozulduğu gösterilmiştir (18). Dişi ve erkek ratlarda sütten kesim sonrası gerçekleştirilen 7 haftalık Sİ'nun ise prob testinde hafızanın kontrol grubu hayvanlara göre daha iyi olduğu da gösterilmiştir (19). Bu çalışmalar ve bizim çalışmamızdaki farklı bulgular, kullanılan hayvanın cinsi, deney prosedürünün şekli ve izolasyon stresinin süresi gibi etkenlerin bilişsel fonksiyonlar üzerinde etkili olduğunu düşündürmektedir. Sİ sadece bilişsel fonksiyonlar üzerinde etki göstermez, anksiyete ve depresyon benzeri davranışlara da neden olabilir (18, 20). Sİ'nun neden olduğu bu etkilerin nedeni çeşitli mekanizmalara dayandırılmaktadır.

Hipokampus, uzun süredir strese bağlı nörogeleimsel bozuklukların patogeneğinde yer almaktadır. Ergen hipokampusunda kronik stres ve nöronal yeniden şekillenme arasındaki ilişki birkaç yıl önce gösterilmiştir (21). Sİ stresinin hipokampüste dendritik spin yoğunluğunda değişikliklere neden olduğu bildirilmiştir (8). Kemirgenlerde, uzun süreli çevresel strese maruz kalmak, hipokampus dahil olmak üzere beyinin farklı bölgelerinde moleküler, yapısal ve işlevsel değişikliklere neden olmaktadır. Stresli koşullardan sonra Nöron Büyüme Faktörü (NGF) ve BDNF'nin azaldığı ve dendritik spin yoğunluğu ve nöroenezde azalmalar rapor edilmiştir (8). Bizim çalışmamızda da bu çalışmayla paralel şekilde Sİ stresinin BDNF düzeylerinde azalmaya yol açtığı görülmüştür.

CREB ve BDNF, hipokampus ve prefrontal korteks dokularında nöronal plastisite, proliferasyon, sağkalım, farklılaşma, nöroenez, onarım mekanizmaları ve çeşitli sinyal yollarının geliştirilmesinde önemli roller oynamakta ve böylece öğrenme ve hafıza performansını kontrol etmektedir. BDNF ve CREB'in etki mekanizması şu şekildedir: Kalsiyum/kalmodulin bağımlı protein kinaz II'nin (CaMKII) aktive edilmesi ile postsinaptik bölgede hücre içi kalsiyum konsantrasyonu artar, bu da BDNF üretimini artırabilir ve ardından CREB'i (p-CREB) fosforile

edip aktive edebilir. p-CREB, BDNF ve reseptörü tropomiyozin reseptör kinaz B'nin (TrkB) gen ekspresyonuna bağlı gen transkripsiyonunu artırabilir (22). Nörotrofik faktörler ailesinin bir üyesi olan BDNF, sinaptik plastisite ve hafızanın oluşumunda kritik bir rol oynamaktadır. Bu proteinin, TrkB reseptörü ile birlikte, fizyolojik sinaptik plastisiteyi modüle ederek öğrenme ve hafızayı düzenlediği bilinmektedir (23). Çalışmamızda hipokampus BDNF düzeylerinin Sİ stresi ile azaldığı tespit edilmiştir. Liu ve ark. (26) 8 hafta boyunca izolasyon stresine maruz bırakılan farelerde CREB ve BDNF ekspresyonunun azaldığını ve yeni obje tanıma testinde hafızanın bozulduğunu göstermişlerdir. Yine yapılan bir çalışmada 8 haftalık Sİ stresinin ratların amigdala ve infralimbik bölgesinde BDNF ekspresyonunun azaldığı ve bu durumun agresyon davranışlarını tetikleyebileceği bildirilmiştir (5).

Nörogranin, serebral korteks, hipokampus ve striatumdaki nöronlarda yüksek oranda eksprese edilen kalsiyum duyarlı kalmodulin bağlayıcı bir proteindir. Bu protein, nöronlarda kalsiyum düzenlenmesindeki rolü nedeniyle çok sayıda postsinaptik sinyal iletim yolunun düzenlenmesine katkı sağlamaktadır (24). Fosforile olan nörogranin hücre içi depolardan kalsiyum mobilizasyonunu tetikleyen G-protein-bağımlı ikinci haberci yollarını da uyarır. Protein kinaz C (PKC) nörogranin substratıdır. Önceki çalışmalar nörograninin sinaptik plastisitede kritik bir rol oynadığını göstermiştir (24, 25). Nörogranin düzeylerinin yaşla beraber azaldığı bildirilmiştir (26). Ayrıca nörogranin knockout farelerde yapılan çalışmalarda uzamsal öğrenmenin bozulduğu gösterilmiştir (25). Çalışmamızda Sİ oluşturulan ratlar ile kontrol grubu arasında nörogranin düzeyleri açısından farklılık gözlenmemiştir. Nörograninin çeşitli stres modellerinde azaldığı ve bilişsel fonksiyonları bozduğu (27, 28) bildirilse de Sİ stresinde bildiğimiz kadarıyla nörogranin düzeylerini değerlendiren bir çalışma bulunmamaktadır.

Nörogranin/CaMKII/CREB ve BDNF, sinaptik plastisite ve öğrenme süreçlerinde kritik roller üstlenen bir hücresel sinyalizasyon ağı oluşturur. Nörogranin, kalsiyum-kalmodulin (Ca/CaM) sinyalizasyonunu modüle ederek CaMKII aktivitesini düzenler. Nörograninin kalmodulin bağ-

laması, kalsiyum sinyallerinin amplitüd ve süre açısından hassas kontrolünü sağlayarak sinaptik plastisite için gerekli olan CaMKII'nin aktive olmasını destekler (25). CaMKII, LTP gibi öğrenme ile ilişkili sinaptik mekanizmaları kolaylaştırır (29). Aktive olan CaMKII, CREB fosforilasyonunu tetikleyerek gen ekspresyonunu düzenler. Fosforile CREB, nöronal büyüme ve plastisiteyi destekleyen BDNF gibi öğrenme ve hafızada kritik rol oynayan genlerin transkripsiyonunu artırır (30). BDNF, hem presinaptik hem de postsinaptik düzeyde sinaptik plastisiteyi güçlendirerek öğrenme süreçlerini optimize eder (31). Bu yolak, nörogranin düzeylerindeki değişikliklerin, özellikle kalsiyum-kalmodulin sinyalizasyonunu ve dolaylı olarak CREB/BDNF eksenini etkileyerek öğrenme ve hafıza performansı üzerinde önemli etkiler yaratabileceğini ortaya koymaktadır.

Beyin ve sinir sisteminin oksidatif strese duyarlı olduğu bilinmektedir. Artan oksidatif stres mitokondriyal disfonksiyon gibi nedenlerle nöronlara hasar vermektedir (32). Oksidatif stres, çeşitli stres faktörleri kullanılarak nörolojik hastalıklarda kapsamlı olarak incelenmiştir. Stres yaratan durumlar serbest oksijen radikallerinde artışa neden olur ve buna bağlı oksidatif hasar ile birlikte antioksidan savunmalarda azalma nörotoksisitenin oluşmasına katkıda bulunur (32). Rai ve ark. (33) 8 hafta boyunca kısıtlama stresine maruz kalan sıçan beyinde serbest oksijen radikallerinin arttığını ve süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz gibi antioksidan enzimlerin salınımının azalmasına yol açan bir antioksidan dengesizliği oluştuğunu göstermişlerdir. Yapılan bir çalışmada 28 günlük Sİ stresinin hipokampüste katalaz ve süperoksit dismutaz seviyelerini düşürdüğü ve MDA seviyesini arttırdığı gözlenmiştir (34). Çalışmamızda da benzer şekilde lipid peroksidasyon son ürünü olan MDA düzeylerinin Sİ stresinde arttığı ve GSH düzeylerinin ise düştüğü gözlenmiştir. Ancak oksidan/antioksidan dengedeki bu bozulmalar öğrenme ve hafıza üzerinde etkili görünmemektedir. Çalışmamızın güçlü yönleri sütten kesme sonrası Sİ oluşturulan ratlarda hipokampus nörogranin düzeylerinin incelendiği ilk çalışma olmasıdır. Çalışmamızda değerlendirilen parametrelerin yalnızca spektrofotometrik ve ELISA yöntemleri ile değerlendirilmiş olması, daha ileri western blot ya

da immünohistokimyasal gibi tekniklerin kullanılamamış olması sınırlılığını oluşturmaktadır.

Sonuç olarak bu çalışmada sütten kesme sonrası oluşturulan 6 haftalık Sİ, hipokampus sinaptik proteinlerinden BDNF'de azalmaya neden olmakta, oksidatif stresi arttırmaktadır. Ancak öğrenme ve hafıza değerlendirmelerinde ve hipokampus CREB, CaMKII ve nörogranin düzeylerinde değişikliğe neden olmamaktadır. Sİ stresinin bilişsel fonksiyonlardaki rolünü anlayabilmek için yapılacak daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: 2019-26259946-02). Bu çalışma; 3-4 Eylül 2021 tarihinde çevrimiçi olarak düzenlenen 7. Uluslararası Hipokrat Tıp ve Sağlık Bilimleri Kongresi'nde sözlü bildiri olarak sunulmuştur.

REFERENCES

1. Begni V, Sanson A, Pfeiffer N, et al. Social isolation in rats: Effects on animal welfare and molecular markers for neuroplasticity. *PLoS One*. 2020;15(10):e0240439.
2. Alghamdi BS. The Effect of Melatonin and Exercise on Social Isolation-Related Behavioral Changes in Aged Rats. *Front Aging Neurosci*. 2022;8(14):828965.
3. Sandi C, Haller J. Stress and the social brain: behavioural effects and neurobiological mechanisms. *Nat Rev Neurosci*. 2015;16(5):290-304.
4. Cacioppo JT, Hawkley LC. Perceived social isolation and cognition. *Trends Cogn Sci*. 2009;13(10):447-54.
5. Mikics É, Guirado R, Umemori J, et al. Social Learning Requires Plasticity Enhanced by Fluoxetine Through Prefrontal Bdnf-TrkB Signaling to Limit Aggression Induced by Post-Weaning Social Isolation. *Neuropsychopharmacol*. 2018; 43: 235-45.
6. Ouchi H, Ono K, Murakami Y, Matsumoto K. Social isolation induces deficit of latent learning performance in mice: a putative animal model of attention deficit/hyperactivity disorder. *Behav Brain Res*. 2013;1(238):146-53.
7. Shao Y, Yan G, Xuan Y, et al. Chronic social isolation decreases glutamate and glutamine levels and induces oxidative stress in the rat hippocampus. *Behav Brain Res*. 2015;1(282):201-8.
8. Biggio F, Mostallino MC, Talani G, et al. Social enrichment reverses the isolation-induced deficits of neuronal plasticity in the hippocampus of male rats. *Neuropharmacology*. 2019;151:45-54.
9. Sun H, Wu H, Liu J, Wen J, Zhu Z, Li H. Prenatal Stress Impairs Spatial Learning and Memory Associated with Lower mRNA Level of the CAMKII and CREB in the Adult Female Rat Hippocampus. *Neurochem Res*. 2017;42(5):1496-503.
10. Khakha N, Khan H, Kaur A, Singh TG. Therapeutic implications of phosphorylation- and dephosphorylation-dependent factors of cAMP-response element-binding protein (CREB) in neurodegeneration. *Pharmacol Rep*. 2023;75(5):1152-65.
11. Li Q, Cheng D, Chen R, et al. Expression of neurogranin in hippocampus of rat offspring exposed to restraint stress and pulsed magnetic fields. *Brain Res*. 2014;2(1570):26-34.
12. Miyakawa T, Yared E, Pak JH, Huang FL, Huang KP, Crawley JN. Neurogranin null mutant mice display performance deficits on spatial learning tasks with anxiety related components. *Hippocampus*. 2001;11(6):763-75.
13. Lieberwirth C, Pan Y, Liu Y, Zhang Z, Wang Z. Hippocampal adult neurogenesis: Its regulation and potential role in spatial learning and memory. *Brain Res*. 2016; 1(1644):127-40.
14. Casini A, Ferrali M, Pampella A, Maellaro E, Comporti M. Lipid peroxidation and cellular damage in extrahepatic tissues of bromobenzene-intoxicated mice. *Am J Pathol*. 1986;123: 520-31.
15. Aykac G, Uysal M, Yalan AS, et al. The effects of chronic ethanol injection on hepatic lipid peroxide, glutathione, glutathione peroxidase and glutathione transferase in rats. *Toxicology*. 1985; 36: 71-6.
16. Quan MN, Tian YT, Xu KH, Zhang T, Yang Z. Post weaning social isolation influences spatial cognition, prefrontal cortical synaptic plasticity and hippocampal potassium ion channels in Wistar rats. *Neuroscience*. 2010;169(1):214-22.
17. Okudan N, Belviranlı M. Long-term voluntary exercise prevents post-weaning social isolation-induced cognitive impairment in rats. *Neuroscience*. 2017;30(360):1-8.
18. Keloglan Musuroglu S, Ozturk DM, Sahin L, Cevik OS, Cevik K. Environmental enrichment as a strategy: Attenuates the anxiety and memory impairment in social isolation stress. *Int J Dev Neurosci*. 2022;82(6):499-512.
19. Davari S, D'Costa N, Ramezan R, Mielke JG. Chronic early-life social isolation enhances spatial memory in male and female rats. *Behav Brain Res*. 2023;5(447):114433.
20. Raman S, Asle-Rousta M, Rahnama M. Protective effect of fennel, and its major component trans-anethole against social isolation induced behavioral deficits in rats. *Physiol Int*. 2020;107(1):30-9.
21. Liu N, Wang Y, An AY, Banker C, Qian YH, O'Donnell JM. Single housing-induced effects on cognitive impairment and depression-like behavior in male and female mice involve neuroplasticity-related signaling. *Eur J Neurosci*. 2020;52(1):2694-704.

- 22.** Taherian N, Vaezi G, Neamati A, et al. The dose-dependent neuroprotective effect of norepinephrine in improving memory retrieval in an experimental model of multiple sclerosis, experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain Res Bull.* 2024;209:110907.
- 23.** Shang M, Zhang J, Shen M, et al. Bright light exposure induces dynamic changes of spatial memory in nocturnal rodents. *Brain Res Bull.* 2021;174:389-99.
- 24.** Huang KP, Huang FL, Jäger T, Li J, Reymann KG, Balschun D. Neurogranin/RC3 enhances long-term potentiation and learning by promoting calcium-mediated signaling. *J Neurosci.* 2004;24(47):10660-9.
- 25.** Pak JH, Huang FL, Li J, et al. Involvement of neurogranin in the modulation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, synaptic plasticity, and spatial learning: a study with knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(21):11232-7.
- 26.** Mons N, Enderlin V, Jaffard R, Higeret P. Selective age-related changes in the PKC-sensitive, calmodulin-binding protein, neurogranin, in the mouse brain. *J Neurochem.* 2001;79(4):859-67.
- 27.** Lalrinawma TSK, Sangma JT, Renthlei Z, Trivedi AK. Restraint stress-induced effects on learning, memory, cognition, and expression of transcripts in different brain regions of mice. *Mol Biol Rep.* 2024;51(1):278.
- 28.** Sivasangari K, Rajan KE. Standardized Bacopa monnieri Extract Ameliorates Learning and Memory Impairments through Synaptic Protein, Neurogranin, Pro-and Mature BDNF Signaling, and HPA Axis in Prenatally Stressed Rat Offspring. *Antioxidants (Basel).* 2020;9(12):1229.
- 29.** Lisman J, Yasuda R, Raghavachari S. Mechanisms of CaMKII action in long-term potentiation. *Nat Rev Neurosci.* 2012;13(3):169-82.
- 30.** Minichiello L. TrkB signalling pathways in LTP and learning. *Nat Rev Neurosci.* 2009;10(12):850-60.
- 31.** Lu B, Chow A. Neurotrophins and hippocampal synaptic transmission and plasticity. *J Neurosci Res.* 1999;58(1):76-87.
- 32.** Rai AR, Joy T, Poojari M, Pai MM, Massand A, Murlimanju BV. Role of Acorus calamus in preventing depression, anxiety, and oxidative stress in long-term socially isolated rats. *Vet World.* 2023;16(8):1755-64.
- 33.** Rai AR, Madhyastha S, Prabhu LV, Saralaya VV, Sahu SS, Rao G. Resveratrol reverses the restraint stress-induced cognitive dysfunction involving brain antioxidant system in rats. *Int J Pharm Pharm Sci.* 2014;6(1):768–72.
- 34.** Baghaei Naeini F, Hassanpour S, Asghari A. Resveratrol exerts anxiolytic-like effects through anti-inflammatory and antioxidant activities in rats exposed to chronic social isolation. *Behav Brain Res.* 2023;438:114201.