

Maternal Fotoperiyodik Geçmişin Erkek Sıçan Yavrularının Morris Su Labirenti Davranışına Etkisi

The Effect of Maternal Photoperiodic History on Morris Water Maze Behavior of Male Rat Offspring: Circadian Changes at Gestational Period and Learning Memory

Mervehatun BOYRAZ*
Cem SÜER**
Bilal KOŞAR***
Oğuzhan YAYLALI****
Nurcan DURSUN*****

ÖZET

Amaç: Bu çalışmada; hipokampüsteki moleküler saat sistemiyle öğrenme bellek ilişkisi ve döngü değişikliği gestasyonel dönemden itibaren olursa öğrenme belleğin nasıl etkileneceği, aydınlık/karanlık döngü değişiklikleri yöntemiyle araştırmak amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışma 20 gebe sıçandan doğan 48 erkek sıçanda yapılmıştır. 6 gebe sıçan, 12 saat karanlık-12 saat aydınlık (12K/12A) döngüsüne yerleştirildi, yavrular doğumdan sonra bu döngüde kaldı (yapay fotoperiyot grubu, YFG). 14 gebe sıçan 16K/8A döngüde tutuldu ve rasgele seçilen 16 erkek yavru doğumdan sonra aynı döngüde tutuldu (gece uzatılmış fotoperiyot grubu, UFG), kalan 16'sı doğumdan itibaren 12K/12A döngüde tutuldu (gecenin restore fotoperiyot grubu, rYFG). Yavruların 60. gününde Morris tankı deneyleri başladı, sıçanların performansı, bir görüntü değerlendirme sistemiyle kaydedildi. Beşinci günde probe deneyinin ardından hafif anestezide sakrifiye edilen sıçanların hipokampusları alındı, Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) Microtubule-Associated Protein Tau (MAPT), Period2 (PER2), BMAL1, Cryptochrome1 gen ekspresyonları, Western-blot'la sirkadiyen ritim protein seviyeleri ölçüldü.

Bulgular: Uzamsal öğrenme ölçütündeki yüzme hızı, YFG'de UFG'ye göre anlamlı ölçüde yüksek bulundu, kaçma mesafesi ve süresi her grupta her gün ve her denemede anlamlı ölçüde azaldı ama gruplar arasında anlamlı fark bulunmadı, platforma olan mesafe ölçütünde rYFG, YFG ve UFG'ye göre platforma daha yakın yüzdü. Bellek performansında; yüzme hızında gruplar arasında anlamlı fark bulunmadı, rYFG hedef kadranda diğer gruplara göre anlamlı ölçüde çok zaman geçirdi, YFG diğer gruplara göre platforma en uzak kalan gruptu. Gen ekspresyonlarında PER2'de anlamlı farklılık bulundu; PER2, UFG'de rYFG'ye göre anlamlı ölçüde yüksektir. Protein analizi sonuçlarında anlamlı fark bulunamadı.

Sonuç: Çalışma, gebelik döneminden itibaren aydınlık-karanlık döngüsünün değiştirilip yavruda restore etmenin hafıza performansını bozmadığını aksine güçlendirdiğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Bellek, hipokampus, öğrenme, sirkadiyen döngü

ABSTRACT

Objective: Aim of this study is to investigate relationship between learning memory with molecular clock system in hippocampus, and how learning memory will be affected if cycle changes starting from gestational period, using light/dark cycle changes method.

Material and Method: Study was done in 48 male rats born from 20 pregnant rats; 6 pregnant rats, 12h dark-12h light (12D/12L)-16 pups, 12D/12L (synthetic photoperiod group, YFG). Fourteen pregnant rats, 16D/8L-16 randomly selected male pups (night extended photoperiod group, UFG), 16K/8L-16 randomly selected male pups, 12K/12L (restored photoperiod group, rYFG). Morris began on day 60 of pups, performances being recorded with an image evaluation system. After probe day, hippocampus of rats sacrificed under mild anesthesia were taken. Circadian genes including Period2 (PER2) and circadian rhythm proteins were measured.

Result: In spatial learning criterion, swimming speed significantly higher in YFG group than UFG group. Escape distance and time significantly decreased for each group with each day and trial, but there was no significant difference between the groups. rYFG group was closest to platform in terms of distance. Regarding memory performance, there was no significant difference in swimming speed between the groups. rYFG group spent significantly more time in target quadrant compared to the other groups, while YFG group was farthest from the platform. PER2 expression was significantly higher in UFG group than in rYFG group. There were no significant differences found in the western blot analysis.

Conclusion: This study shows that altering light-dark cycle starting from the gestation period strengthens memory performance rather than impairing it.

Key Words: Memory, hippocampus, learning, circadian cycle

*YL Öğrencisi, Mervehatun BOYRAZ, Erciyes Üniversitesi, Fizioloji, Fizioloji Anabilim Dalı, Kayseri, Türkiye

**Prof. Dr., Cem SÜER, Erciyes Üniversitesi, Fizioloji, Fizioloji Anabilim Dalı, Kayseri, Türkiye

***Öğr. Gör. Dr., Bilal KOŞAR, Erciyes Üniversitesi, Fizioloji, Fizioloji Anabilim Dalı, Kayseri, Türkiye

****Arş. Gör. Oğuzhan YAYLALI, Erciyes Üniversitesi, Fizioloji, Fizioloji Anabilim Dalı, Kayseri, Türkiye

*****Prof. Dr. Nurcan DURSUN, Erciyes Üniversitesi, Fizioloji, Fizioloji Anabilim Dalı, Kayseri, Türkiye

Sorumlu Yazar:

Adı Soyadı: Mervehatun BOYRAZ

Adres: Erciyes Üniversitesi, Fizioloji, Fizioloji Anabilim Dalı, Kayseri, Türkiye

e-mail: merveboyraz0708@gmail.com

GİRİŞ

Öğrenme ve bellek performansı sirkadiyen saatle ilişkilidir ve aydınlık-karanlık döngü değişiklikleri hipokampal öğrenme ve bellek üzerinde etkilidir (Bolsius et al., 2021). Çalışma belleğini tanımlayan bir cümle eklenebilir. Radyal kol labirenti testini kullanan birkaç çalışma, çalışma belleğinin günün saatine göre modüle edildiğini göstermiştir. Rawashdeh et al. (Rawashdeh et al., 2014) radyal kol labirentinde geceyle kıyaslandığında gündüzde anlamlı ölçüde daha iyi performans bildirmiştir. Davies et al. (1973) hem öğrenme hem de bellek verimliliğinin, günün zamanının bir işlevi olarak modüle edildiğini göstermiştir, pasif bir kaçınma görevinde farelerin görevi gece yerine gündüz daha iyi öğrendiklerini ve hatırladıklarını göstermiştir. O zamandır çok sayıda laboratuvar öğrenme belleğin çerçevesini günlük döngünün sınırlandırdığını doğrulamıştır (Davies et al., 1973, Valentinuzzi et al., 2001). Kronik sirkadiyen bozulma ve ardından uzun bir sirkadiyen iyileşme dönemi sonrasında öğrenme ve hafıza değişiklikleri incelenen, kontrol grubu ve aydınlık/karanlık siklusu değişiklikleri yapılan yetişkin erkek spontan hipertansif sıçanlarda morris su tankı testi ile sirkadiyen bozulma grubunun daha uzun kaçış gecikmesi ve yüzme mesafesi gösterdiği bulunmuştur (Zhang et al., 2020). İlgili başka bir çalışmada; endojen aktif dönemlerinin dışında eğitilen sıçanların, dikkat ve uzamsal hafıza görevlerinde gece eğitilmiş sıçanlarla aynı edinim oranı, günlük performansı ve hafıza yeteneğini gösterip göstermediği araştırılmıştır, ayrıca günlük görev eğitiminin sirkadiyen aktivite sıçan modellerini nasıl etkilediği morris su tankı testiyle incelenmiştir. Sıçanların karanlık faz sırasında eğitildiklerinde özenli çaba gerektiren işlemsel bir görevde daha iyi edinim ve performans sergiledikleri bulunmuştur. Günün saati, Morris su labirentinde edinimi veya performansı etkilememiştir; bununla birlikte, hayvanların eğitimi başlangıçta karanlık fazda gerçekleşmişse daha iyi hafıza gözlenmiştir. Bulguların, bilişsel performans ve

sirkadiyen süreçler arasındaki çift yönlü etkileşimler teorisini desteklediği ve vardiyalı çalışma, yaşlanma ve nöropsikiyatrik hastalıklarla ilişkili sirkadiyen anormalliklerin bu popülasyonlarda sıklıkla bulunan biliş üzerindeki zararlı etkilere katkıda bulunabileceği görüşüyle tutarlı olduğu bildirilmiştir (Gritton et al., 2012). İnsan periferik dokularında şimdiye kadar tanımlanan sirkadiyen saat genleri arasında, ana sirkadiyen pacer ile bağlantılı olan Period (Per1-3), Cryptochrome (Cry-1 ve Cry-2), Clock ve Bmal1 bulunur. Aydınlık-karanlık döngüsü gibi "zamanlayıcı" olarak adlandırılan dış faktörler, salınımın çeşitli aşamalarını senkronize ederek iç saat mekanizması ile etkileşime girer (Collop et al., 2008). Saat genlerinin davranışsal etkilerinin incelendiği çalışmalarda, saat gen anomalilerinin insanlarda uyku bozuklukları ile ilişkili bulunmuştur (Garcia et al., 2000; Ebisawa et al., 2001), farelerde ise bağlamsal hafıza, meyve sineğinde de iletişimsel zamanlama ve hafıza oluşumu ile ilişkili olduğu saptanmıştır (Sakai et al., 2004). Bütün bu bulgular, aydınlık-karanlık siklusu değişikliğinin hayvanlarda öğrenme ve belleği bozduğu sonucunu düşündürmüştür ancak yapılan literatür taramasında aydınlık-karanlık siklusunun annede değiştirildiğinde yavrunun öğrenme ve bellek durumunu inceleyen bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmada annede aydınlık-karanlık siklusu değişikliğinin yavrunun öğrenme/bellek performansını ve saat gen anlatımını nasıl değiştirdiği araştırılmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışmada Erciyes Üniversitesi Deneysel ve Klinik Araştırmalar Merkezi'nden (DEKAM) Erciyes Üniversitesi Yerel Hayvan Deneyleri Etik Kurulu'ndan (04/07/2021 tarih ve 21/84 sayılı) izin alınarak temin edilen Wistar albino cinsi ratlar kullanıldı. Çalışma hayvanları; yetişkin (2-3 aylık) 250-300 gram Wistar Albino cinsi 20 dişi sıçan ve 11 erkek sıçan, bu sıçanlardan 2 dişi/1 erkek rastgele ayrılıp çiftleştirildi. Gruplar; yapay fotoperiyot (YF) grubu: Gebeliği sırasında 12 saat A/K döngüsündeki annelerin (n=6 gebe) 12 saat

A/K döngüsünde büyütülen 16 erkek yavrusu, uzatılmış yapay fotoperiyot (UYF) grubu: Gebeliği sırasında 16/8 saat A/K döngüsündeki annelerin (n=7 gebe) 16/8 saat A/K döngüsünde büyütülen 16 erkek yavrusu, restore edilmiş yapay fotoperiyot (rYF) grubu: Gebeliği sırasında 16/8 saat A/K döngüsündeki annelerin (n=7 gebe) 12/12 saat A/K döngüsünde büyütülen 16 erkek yavrusu olarak oluşturulmuştur. Yavru erkek sıçanlar 60 gün olduklarında Morris Su Labirenti Testi yaptırıldı. Anne sıçanın gebe kaldığı gestasyonel sıfırinci günden Morris su labirenti testinin tamamlanmasına kadar deney süresi \cong 90 gün olacak şekilde ayarlandı.

Morris Su Tankı Testi

Uzamsal öğrenme belleğin tayini için tasarlanan Morris su labirenti testinde, 1.83 m çap 75 cm derinliğinde dairesel paslanmaz çelik su tankı 50 cm derinliğe kadar nontoksik boyayla opaklaştırılan 22 ± 2 °C su ile dolduruldu, tank 4 kadrana bölündü, 4. kadrana hedef seçilip suyun 2 cm altında kalan platform bu kadrana koyuldu, tavana CCD (Klon CD Diski) kamera takıldı ve kayıtlar, NOLDUS İzleme ve Kayıt Sistemiyle (Noldus, Leesburg, VA) kaydedildi. Test her gün 9.30'da başlayıp 2 saat içinde bitirildi. İlk 4 gün öğrenme denemeleri (her sıçan günde 4 deneme) ve son gün bellek performansı için platform kaldırılan probe denemesi (her sıçan 1 deneme) yaptırıldı (Morris et al., 1982). 4 günlük eğitici yüzme deneylerinde elde edilen kaçma mesafesi, kaçma süresi, yüzme hızı ve platforma olan ortalama uzaklık parametreleri; hipokampal tabanlı uzamsal öğrenme performansını, probe gününde elde edilen yüzme hızı, hedef kadranda geçirilen süre ve platforma olan ortalama uzaklık parametreleriye uzamsal bellek performansını göstermektedir.

Western-Blot Protokolü

Deney grubu sıçanları, deney bitiminden 2 saat sonra saat 12.00'de 1,2 mg/kg ürethan ile anestezi edilip dekapitasyonla kurban edilmiştir. Otoklavla sterilize edilen cerrahi aletlerle kafatasından yumuşak beyin

dokusu çıkarılıp dokudan sağ ve sol hipokampus çıkarılmış ve iki hipokampus de RNA izolasyonu yapılması için içerisinde trizol bulunan 2 ml'lik ependorf tüpe alınıp çalışmaya kadar -80 °C'de saklanmıştır. Örneklerle hipokampal dokulardan RIPA lizis tamponu ile protein izolasyonu yapılmıştır. Biçinkonik asit (BCA) belirteci ile 520nm'de protein konsantrasyon tayini yapılmıştır. Western-blot protokolü uygulaması ardından Total GSK3, Total AKT Total CREB ve Total TAU proteinlerinde Gelişmiş Kemilüminesanssolüsyonu ile sinyal almak için Chemidoc cihazında görüntüleme işlemi yapılmış, elde edilen membran görüntüleri Image-J programı kullanılarak değerleri hesaplanmıştır.

Gerçek Zamanlı PCR Yöntemi

Yöntemde sırasıyla total RNA izolasyonu, cDNA sentezi ve mRNA ekspresyon alışıması (RT-PCR) yapılmıştır. MAPT, PER2, BMAL1 ve CRY1 genlerinin mRNA ekspresyonları SsOAdvanced Universal IT SYBR Green Supermix kit (10000076382, BIORAD, ABD) kullanılarak BIORAD CFX Connect Real Time PCR cihazında (BIORAD, ABD) çalışılmıştır. Kit içerisinden çıkan SYBR Green Supermix, Nuclease Free Water ve Primer F ve Primer R den oluşan bir reaksiyon karışımı hazırlanmış, 96'lık well plate üzerindeki kuyucuklara dağıtılmış ve her bir kuyucuğa cDNA (1 µl) eklenmiştir. Daha sonra CFX Connect Real-Time PCR detection System PCR cihazına yerleştirilmiştir. PCR pre-inkübasyon, çoğaltma ve soğutma koşulları için sırasıyla 95 °C'de 3 dk, 95 °C 5 sn ve 60°C'de 15 sn (45 döngü) ve 40°C'de 30 sn tutulmuştur. Bütün örnekler manipülasyondan dolayı doğabilecek hataları önleyebilmek için çift çalışılmıştır. House-keeping gen olarak β -Actin geni kullanılmıştır. İşlem sonunda kaydedilmiş elde edilen Ct (thresholdcycle) değerleri metodu kullanılarak hesaplanmış ve normalize edilmiştir.

İstatiksel Analiz

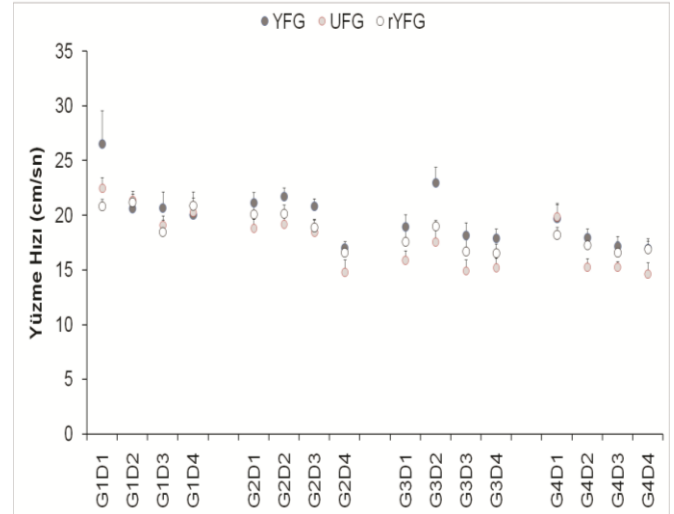
Uzamsal öğrenme ve hafıza fonksiyon testi istatistiksel analizi için SPSS versiyon 21 paket programı ve

Windows10 bilgisayar programında günleri karşılaştıran tekrarlı ölçümlerde iki yönlü varyans analizinden faydalanıldı. Probe gününde, hedef kadranda geçirilen sürenin diğer kadrana kıyasla yüzdesinin rastgele (%25'ten fazla olasılık) olup olmadığı analizinde tek örneklem testi kullanıldı. Hafızayı test etmek için 5. günde gerçekleştirilen probe testinin sonuçları, tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanılarak analiz edildi. Veriler ortalama \pm standart hata olarak kullanıldı. Western-blot ve PCR analizinde gruplar arasında anlamlı farklılığın tayini için, tek yönlü varyans analizi (ANOVA) testi, grupların ikili karşılaştırmasında post-hoc Tukey testi kullanıldı. Veriler ortalama \pm standart hata olarak kullanıldı. Yapılan tüm analizlerde anlamlılık düzeyi $p<0,05$ olarak seçildi.

BULGULAR

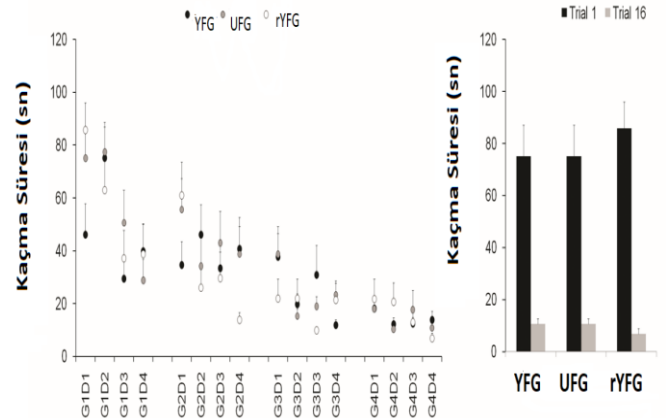
Morris Su Tankı Testinde Uzamsal Öğrenme Performansının Değerlendirilmesi

Yüzme hızı: Morris su tankında ölçülen yüzme hızı değerleri deney hayvanının motor becerisi ile yakın ilişkili bir parametredir. Şekil 1, denemeler boyunca ölçülen ortalama yüzme hızı değerlerini göstermektedir. Yüzme hızı 2 faktörlü [Gün(G) ve Deneme(D)] tekrarlayan ölçümlü ANOVA test sonuçları, yüzme hızının her gün ($F_{3,135}=23,366$; $p<0,001$) ve her denemede ($F_{3,135}=20,437$; $p<0,001$; gün x deneme etkileşimi: $F_{9,405}=5,059$; $p<0,001$) giderek azaldığını; grup ile anlamlı bir etkileşim göstermediğini ($p>0,05$) ortaya koymuştur. Grupların ölçülen bütün yüzme hızı değerleri karşılaştırıldığında farklılık bulunmuştur ($F_{2,45}=5,143$; $p=0,01$). Post-hoc Tukey test sonuçlarına göre YFG sıçanlar, UFG sıçanlara göre anlamlı seviyede daha hızlı yüzmüşlerdir ($p=0,007$).



Şekil 1. Morris Su Tankında grupların ortalama yüzme hızı.

*YFG; Yapay Fotoperiyot Grubu. UFG Uzatılmış Fotoperiyot Grubu. rYFG,; Restore Edilmiş Yapay Fotoperiyot Grubu. Yüzme hızının her gün ve her denemede anlamlı ölçüde giderek azaldığı; grup ile anlamlı bir etkileşim göstermediğini görülmüştür. Gruplar arasında ise, YFG sıçanlar, UFG sıçanlara göre anlamlı seviyede daha hızlı yüzdükleri saptanmıştır. İstatistiksel anlamlılık düzeyi $p<0,05$ olarak seçilmiştir.



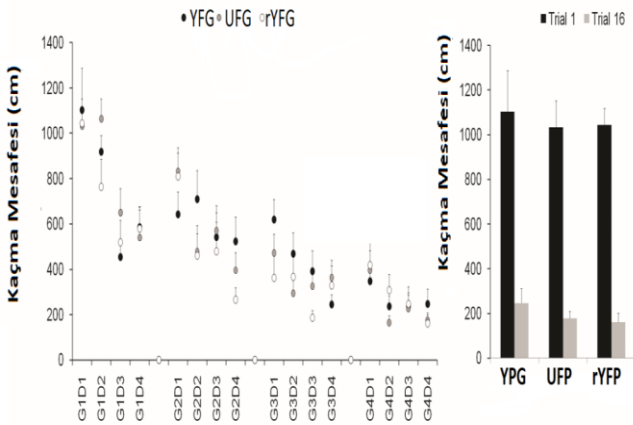
Şekil 2. Morris Su Tankında gruplarında kaçış süresi

*YFG; Yapay Fotoperiyot Grubu. UFG Uzatılmış Fotoperiyot Grubu. rYFG,; Restore Edilmiş Yapay Fotoperiyot Grubu. **Sol:** Öğrenme performansı sıçanların gizli platformu bulana kadar geçirdikleri süre cinsinden verilmiştir. **Sağ:** Kaçma süresinin birinci ve son denemelerindeki değerlerini göstermektedir. Kaçma süresi cinsinden ölçülen öğrenme performansı; her grupta son denemede ilk denemeye göre anlamlı düzeyde azalmıştır ancak gruplar arasında farklılık göstermemektedir. İstatistiksel anlamlılık düzeyi $p<0,05$ olarak seçilmiştir.

Kaçma Süresi: Morris su tankında sıçanların platforma kaçma sürelerinin değişimi Şekil 2'de verilmiştir. Kaçma süresi, ardıl günlerde ($F_{3,135}=40,211$; $p<0,001$) ve denemelerde ($F_{3,135}=14,861$; $p<0,001$) giderek azalmıştır. Ancak grupların kaçış süresini ardıl gün ($F_{6,135}=0,743$; $p>0,05$) ve denemelerde

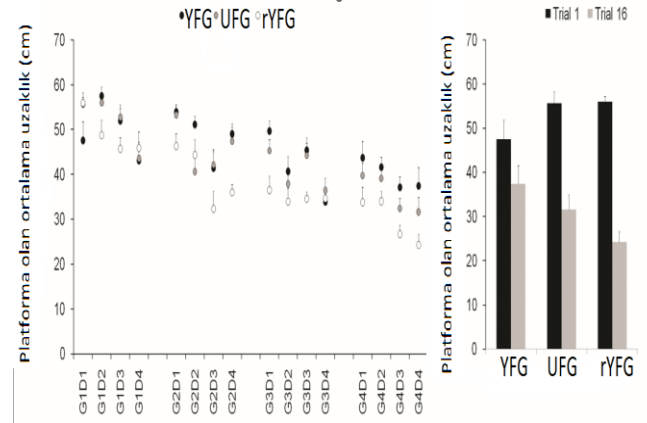
(F6.135=1,964; $p=0,075$) azaltma performansı farklı bulunmamıştır. Grup x Gün x Deneme etkileşimi de anlamlı değildir (F9.405=1,612; $p=0,082$). Dört gün boyunca elde edilen bütün kaçma değerleri, gruplar arasında farklı bulunmamıştır (F2.45= 0,478; $p>0,05$).

Kaçma mesafesi: Morris su tankında sıçanların platforma kaçmak için kat ettikleri mesafenin değişimi Şekil 3'de verilmiştir. Şekil 3'de görüldüğü gibi bütün sıçanlar, platforma kaçma mesafesini ardıl günlerde (F3.135=55,504; $p<0,001$) ve ardıl denemelerde (F3.135= 38,239; $p<0,001$) azaltmışlardır. Bu bulgu, bütün sıçanların gizli platformun yerini öğrendiklerini göstermektedir. Grup x Gün (F6.135= 0,639; $p > 0,05$), Grup x Deneme (F6.135= 0,547; $p = 0,016$) ve Grup x Gün x Deneme etkileşimi (F9.405= 1,240; $p > 0,05$) anlamlı bulunmamıştır. Bu, grupların kaçma mesafesini azaltma performansının benzer olduğunu göstermektedir. Ayrıca, bütün gün ve denemelerden elde edilen Kaçma Mesafesi değerlerinin ortalaması gruplar arasında farklılık göstermemiştir (F2.45= 1,159; $p > 0,05$).



Şekil 3. Morris Su Tankında gruplarında kaçış mesafesi. *YFG; Yapay Fotoperiyot Grubu. UFG Uzatılmış Fotoperiyot Grubu. rYFG; Restore Edilmiş Yapay Fotoperiyot Grubu. **Sol:** Öğrenme performansı sıçanların gizli platformu bulana kadar yürüdüğü mesafe cinsinden verilmiştir. **Sağ:** Kaçma mesafesinin birinci ve son denemelerindeki değerlerini göstermektedir. Kaçma süresi cinsinden ölçülen öğrenme performansı; her grupta son denemede ilk denemeye göre anlamlı düzeyde azalmıştır ancak gruplar arasında farklılık göstermemektedir. İstatistiksel anlamlılık düzeyi $p<0,05$ olarak seçilmiştir.

Platforma Olan Ortalama Uzaklık: Tankta sıçanların platforma kaçmaları sırasında gizli platforma olan ortalama uzaklıklarının değişimi Şekil 4'de verilmiştir. Şekil 4'de görüldüğü gibi, ortalama uzaklık parametresi ardıl gün (F3.135= 51,690; $p<0,001$) ve denemelerde (F3.135= 26,032; $p<0,001$) giderek azalmıştır. Bu, ortalama uzaklık parametresi bakımından bütün grupların gizli platformun yerini öğrendiklerine işaret etmektedir. Grup x Gün ve Grup x Deneme etkileşimi anlamlı bulunmamıştır ancak grup x gün x deneme etkileşimi anlamlıdır (F9.405= 18,405; $p=0,016$). Bütün gün ve denemelerden elde edilen Platforma Olan Ortalama Uzaklık değerlerinin ortalaması gruplar arasında farklılık göstermiştir (F2.45=7,883; $p=0,001$). Post-hocTukey test sonuçlarına göre öğrenme denemelerinde rYFG, YFG'undan ($p=0,001$) ve UFG'ndan ($p=0,017$) platforma daha yakın yüzmüşlerdir.



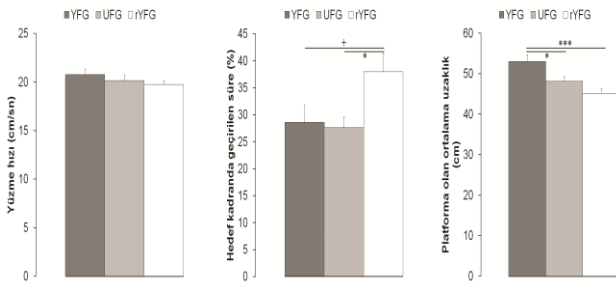
Şekil 4. Morris Su Tankında gruplarında platforma olan ortalama mesafe

*YFG; Yapay Fotoperiyot Grubu. UFG Uzatılmış Fotoperiyot Grubu. rYFG; Restore Edilmiş Yapay Fotoperiyot Grubu. **Sağ:** Platforma ortalama uzaklığın birinci ve son denemelerindeki değerlerini göstermektedir. Platforma olan ortalama uzaklıksından ölçülen öğrenme performansı; her grupta son denemede ilk denemeye göre anlamlı düzeyde azalmıştır, rYFG, YFG'den ve UFG'den anlamlı düzeyde platforma daha yakın yüzmüşlerdir. İstatistiksel anlamlılık düzeyi $p<0,05$ olarak seçilmiştir.

Morris Su Tankı Testinde Uzamsal Bellek Performansının Değerlendirilmesi

Gizli platformun yerini 16 deneme boyunca öğrenen sıçanlar, son denemeden 24 saat sonra, platformun bulunmadığı "probe" denemesine tutulmuşlardır. Bu

denemede, öğrenme denemeleri boyunca platformun bulunduğu kadranda geçirilen sürenin toplam süreye yüzde oranı, bellek performansının göstergesi olarak ele alınmıştır. Bu yüzde oranının %25'den fazla olması sıçanların platformun bulunduğu yeri "hatırladıklarının" göstergesidir. Hedef kadranda geçirilen süre YFG'de %28,6±3,2; UFG'de %27,8±2,1 ve rYFG'de %37,9±3,5 olarak bulundu, fark anlamlı idi (F2.45=4,323; p=0,019). Grup çiftlerinin karşılaştırması, rYFG'nin bellek performansının UFG'den anlamlı seviyede daha iyi olduğunu (p=0,028); YFG'ye göre anlamlı olma eğilimi gösterdiğini (p=0,052) ortaya koydu. YFG ve UFG arasındaysa anlamlı farklılık bulunmadı (p>0,05). Sıçanların probedeki yüzme hızları gruplar arasında farklılık göstermedi (Tek yönlü ANOVA, F2.45 = 0,693, p>0,05). Probede YFG sıçanlar platformun bulunduğu lokasyona ortalama 53,0±1,7 cm; UFG sıçanlar 48,1±1,2 cm uzaklıkta yüzerken; bu parametre rYFG için 45,1±1,2 cm olarak bulundu (F2.45=8,966; p=0,001). Post-hocTukey testi YFG grubu sıçanların platformun bulunduğu yere hem UFG sıçanlardan (p=0,039) hem de rYFG sıçanlardan (p<0,001) daha uzakta yüzdüklerini gösterdi (Şekil 5).



Şekil 5. Morris Su Tankında sıçanların probe gününde

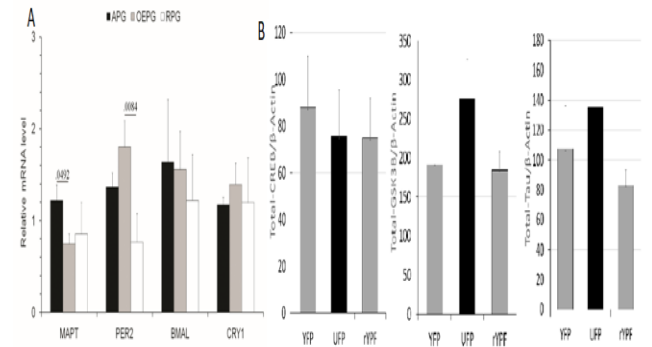
***Sol:** yüzme hızı, **Orta:** hedef kadranda geçirilen süre ve **Sağ:** platforma olan ortalama uzaklık. Veriler ortalama±standart hata şeklinde tanımlandı. İstatistiksel anlamlılık p<0,05'tir. YFG: Yapay Fotoperiyot Grubu, UFG: Uzatılmış Fotoperiyot Grubu, rYFG: Restore edilmiş Yapay Fotoperiyot Grubu. **:İstatistiksel anlamlılık ifade eder.Gruplar arasında yüzme hızında anlamlı bir fark bulunamamıştır. Hedef kadranda diğer gruplara nazaran anlamlı olarak en fazla zaman geçiren grup rYFG'dir, YFG ve UFG arasında anlamlı bir farklılık yoktur. Platforma olan ortalama uzaklığı diğer iki gruba kıyasla anlamlı olarak yüksek olan YFG'dir, UFG ve rYFG arasında anlamlı bir farklılık yoktur. p=0,052, * p < 0,05; *** p < 0,001.

PCR Analizi

qrt-PCR analiziyle MAPT, PER2, BMAL ve CRY genleri bağımlı mRNA seviyesi analiz edilmiştir. MAPT, YFG'de rYFG'ye kıyasla anlamlı ölçüde daha yüksek bulunmuştur (p=0,0482), diğer grupların arasında anlamlı bir fark yoktur. PER2, UFG'de rYFG'ye kıyasla anlamlı ölçüde daha yüksek bulunmuştur (p=0,0084), diğer grupların arasında anlamlı bir fark yoktur. BMAL ve CRY'de grupların arasında anlamlı bir fark yoktur (Şekil 6).

Western-Blot Analizi

Öğrenme bellek proteinlerinden total GSK3, Akt, CREB ve Tau proteinleri Western-blot analiziyle ölçülmüştür, gruplar arasında anlamlı fark bulunamamıştır (p < 0,05), (Şekil 6).



Şekil 6. A) PCR analizinde MAPT, PER2, BMAL ve CRY genleri. B) Western-blot analizinde total GSK3, CREB ve tau protein seviyeleri

*Veriler ortalama±standart hata şeklinde tanımlandı. İstatistiksel anlamlılık p<0,05'tir. YFG: Yapay Fotoperiyot Grubu, UFG: Uzatılmış Fotoperiyot Grubu, rYFG: Restore edilmiş Yapay Fotoperiyot Grubu. Gruplar arasında MAPT, BMAL ve CRY1'de anlamlı bir fark bulunamamıştır. PER2 geni UFG'de rYFG'ye kıyasla anlamlı ölçüde daha yüksek bulunmuştur (p=0,0084). Gruplar arasında protein anlatımında anlamlı bir fark bulunamamıştır.

TARTIŞMA

Sıçanların yüzme hızının her gün ve her denemede anlamlı derecede değişme göstermesi nedeni ile; Morris su tankı denemesinde ölçümü yapılan kaçma süresi parametresi öğrenme performansı için ölçülen yüzme mesafesi, yüzme süresi, kaçış mesafesi ve platforma olan ortalama uzaklık parametrelerini etkilememiş

olacaktı fakat çalışmada yüzme hızlarının her gün ve her denemede anlamlı biçimde azalmış olması motor fonksiyonunun bozulmasının öğrenmeyi etkileyen bir parametre olduğu sonucunu doğurabilir.

Çalışma kapsamında gestasyonel dönemden itibaren A/K döngüsü birbirinden farklı 3 grup sıçan sırasıyla önce Morris Su Tankı davranış testine tabii tutulup uzamsal öğrenme (yüzme mesafesi, kaçış süresi, yüzme hızı ve platforma olan ortalama uzaklık parametreleri) ve uzamsal bellek performansı (yüzme hızı, hedef kadranda geçirilen süre ve platforma olan ortalama uzaklık parametreleri) değerlendirmeleri yapıldı, ardından alınan hipokampus dokularına PCR (MAPT, PER, BMAL, CRY1 analizleri) ve Western-blot analizleri (Total GSK3, Total Akt, Total CREB, Total Tau ölçümleri) yapıldı.

Literatür taramasında gestasyonel dönemden itibaren aydınlık karanlık siklusu değişikliklerinin yavruda öğrenme belleğe etkisine dayalı çalışmalara rastlanmıştır, konuyla alakalı daha fazla araştırma yapılmasına ihtiyaç vardır.

Öğrenmeyi ölçmede kullanılan yüzme mesafesi ve kaçış süresi, yüzme hızından etkilenen parametrelerdir. Daha hızlı yüzen sıçanların platformu daha hızlı bulması ve daha fazla mesafe kat etmesi beklenir ve öğrenme performansı diğer gruplara kıyasla yanıltıcı olabilir. Bu çalışmada bütün sıçanların 4 ardıl gün süren denemelerde platformun yerini bulurken motor performanslarını azalttıklarını, gruplar arasında yüzme hızı bakımından YFG sıçanların, UFG sıçanlara göre anlamlı seviyede daha hızlı yüzdükleri bulunmuştur. Yüzme hızlarının her grup için her gün ve her denemede anlamlı biçimde azalmış olması, motor fonksiyonunun bozulmasının öğrenmeyi etkileyen bir parametre olduğu sonucunu doğurabileceğinden çalışmada yüzme hızından bağımsız platforma olan ortalama uzaklık esas alınmıştır. rYFG'nin, diğer gruplara göre platforma anlamlı ölçüde daha yakın yüzmesi, bu

grubun öğrenme performansının daha iyi olduğu sonucunu verir. Zhang et al. kronik sirkadiyen bozulma ve ardından uzun bir sirkadiyen iyileşme dönemi sonrasında öğrenme ve hafıza değişikliklerini incelemek adına, kontrol grubu (12A/12K), sirkadiyen bozulma grubu (6A/6K) ve 12 saatlik aydınlık karanlık döngüsü 3 günde bir ters çevrilen grup yetişkin erkek hipertansif sıçanlarda 18 hafta bu döngüyü devam ettirmiş ve ardından 32 hafta sirkadiyen iyileşme dönemine (12A/12K) tabii tuttıkları sıçanlara morris su tankı testi yapmış ve sirkadiyen bozulma grubunun daha uzun kaçış gecikmesi ve yüzme mesafesi gösterdiğini bulmuştur, bu bulgular bizim çalışmamıza paralellik göstermemektedir (Zhang et al., 2020). Yapılan çalışmalarda sirkadiyen ritim bozukluğu uygulanan ve kontrol grubuyla kıyaslanan hayvanlarda öğrenme/bellek performansı gruplar arasında farklı bulunmuştur (Tucker et al., 2017, Wang et al., 2019, Wang et al., 2020,) fakat bizim çalışmamızda bu araştırma sonuçlarından farklı olarak yapay fotoperiyot grubu ile uzatılmış fotoperiyot grubu arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. YFG ve UFG arasında öğrenme-bellek performansında anlamlı bir fark bulunmamasının sebebi; A/K siklusu değişikliğinin gestasyonel dönemden başlayarak değiştirilmesiyle, beklenen farklılıkların hipokampüsten başka beyin bölgeleri tarafından kompanse edilmiş olması olabilir. A/K siklusunun gestasyonel dönemden itibaren incelenmesi ve prefrontalkorteks, striatum, serebellum gibi çeşitli beyin bölgelerinin analizinin araştırılmasına ihtiyaç vardır.

Probe denemesinde yüzme hızı farklarının gruplar arasında anlamlı çıkmaması, bu parametrenin hedef kadranda geçirilen süre ve platforma olan ortalama uzaklık parametrelerini etkilemediğini ve belleğin motor fonksiyon performansından bağımsız değerlendirilebileceğini ortaya koyar.

Bellek performansı için yapılan probe denemesinde yüzme hızı farklarının gruplar arasında anlamlı çıkmaması, bu parametrenin hedef kadranda geçirilen

süre ve platforma olan ortalama uzaklık parametrelerini etkilemediğini ve belleğin motor fonksiyon performansından bağımsız değerlendirilebileceğini ortaya koymaktadır. Hedef kadranda geçirilen sürenin rYFG grubunda anlamlı ölçüde yüksek bulunuşu ve platforma olan ortalama uzaklığın anlamlı olarak en yüksek YFG'de, en düşük rYFG'de bulunuşu; rYFG'nin bellek performansının diğer gruplara göre daha iyi olduğu, sirkadiyen iyileşme döneminin öğrenme ve belleği arttıracığı sonucunu çıkarmaktadır. Çalışmamızdaki PER2 geninin UFG ve YPG'ye göre rYFG'de daha az eksprese edildiği bulgusu, PER2 miktarının öğrenme bellek performansıyla zıt bir ilişkisi olduğunu düşündürmektedir. PER2 gen mutasyonunun bilişsel işlevi bozduğu görüşünü ayrıntılı analiz etmek için Kim et aladaşları, PER2 nakavt ve kontrol grubu farelerde Barnes Labirenti ve Y Labirenti testleriyle uzamsal bellek performansı değerlendirmiş, PER2 nakavt farelerde bellek performansının bozulduğunu bulmuştur (Kim et al., 2022). Mulder et aladaşları, öğrenmenin sadece CRY genine bağlı olup olmadığını test etmek için, PER1/PER2 çift mutant fareler ve kontrol grubu fareleri Y Labirent testiyle değerlendirmiş, mutant ve kontrol grubu fareler arasında kısa süreli uzamsal bellekte bir fark bulamamış, 2 aylık testsiz periyot sonrası ise denemelerin ardından grupların benzer uzun süreli hafıza gösterdiklerini bulmuştur (Mulder et al., 2013). Çeşitli çalışmaların farklı sonuçlar vermesi, PER2 gen ekspresyonunun öğrenme-bellek ilişkisiyle alakalı daha çok çalışma yapılması ihtiyacını doğurmaktadır. Öğrenme ve bellek proteinlerinden total GSK3, CREB ve Tau analizleri sonucunda gruplar arasında anlamlı fark bulunamamıştır, Total Akt analizi ise yapılamamıştır, çalışmanın Morris Su Tankı davranış testi ve PCR analiz sonuçlarındaki gruplar arası farklılıkların, öğrenme ve bellek proteinlerinden bağımsız gerçekleştiği düşünülmüştür ve bu şekilde değerlendirilmiştir.

SONUÇ

Çalışmada; gestasyonel dönemde A/K döngüsünün aydınlık fazının uzatılıp yavruda bu döngünün devam ettirilmesi, gestasyonel dönem sonrası 2. ayda öğrenme ve bellek performansını etkilemediği ancak, aydınlık faz uzamasının yavruda düzeltildiğinde bunun PER2 gen ekspresyonundaki azalmayla birlikte bellek performansını iyileştirdiği gösterilmiştir. Annelik döneminden itibaren maruz bırakılan döngü değişikliği yavruda aynı şekilde devam ettiğinde bir tür adaptasyon sonucu öğrenme bellek performansı etkilenmemiş olup, sirkadiyen döngü bozukluğu yavruda iyileştirildiği zaman PER2 genindeki ekspresyonu azaltığımız için döngü restorasyonu öğrenme ve bellek performansının artmasına neden olmuş olabilir.

KAYNAKLAR

- Bolsius, Y. G., Zurbriggen, M. D., Kim, J. K., Kas, M. J., Meerlo, P., Aton, S. J., & Havekes, R. (2021). The role of clock genes in sleep, stress and memory. *Biochemical Pharmacology*, 191, 114493. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2021.114493>
- Collop, N. A., Salas, R. E., Delayo, M., & Gamaldo, C. (2008). Normal sleep and circadian processes. *Critical care clinics*, 24(3), 449–v. <https://doi.org/10.1016/j.ccc.2008.02.002>
- Davies, J. A., Navaratnam, V., & Redfern, P. H. (1973). A 24-hour rhythm in passive-avoidance behaviour in rats. *Psychopharmacologia*, 32(2), 211–214. <https://doi.org/10.1007/BF00428692>
- Ebisawa, T., Uchiyama, M., Kajimura, N., Mishima, K., Kamei, Y., Katoh, M., Watanabe, T., Sekimoto, M., Shibui, K., Kim, K., Kudo, Y., Ozeki, Y., Sugishita, M., Toyoshima, R., Inoue, Y., Yamada, N., Nagase, T., Ozaki, N., Ohara, O., Ishida, N., ... Yamauchi, T. (2001). Association of structural polymorphisms in the human period3 gene with delayed sleep phase syndrome. *EMBO reports*, 2(4), 342–346. <https://doi.org/10.1093/embo-reports/kve070>
- Garcia, J. A., Zhang, D., Estill, S. J., Michnoff, C., Rutter, J., Reick, M., Scott, K., Diaz-Arrastia, R., & McKnight, S. L. (2000). Impaired cued and contextual memory in NPAS2-deficient mice. *Science (New York, N.Y.)*, 288(5474), 2226–2230. <https://doi.org/10.1126/science.288.5474.2226>
- Gritton, H. J., Kantorowski, A., Sarter, M., & Lee, T. M. (2012). Bidirectional interactions between circadian entrainment and cognitive performance. *Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 19(3), 126–141. <https://doi.org/10.1101/lm.023499.111>

- Kim, M., Custodio, R. J., Lee, H. J., Sayson, L. V., Ortiz, D. M., Kim, B. N., Kim, H. J., & Cheong, J. H. (2022). Per2 Expression Regulates the Spatial Working Memory of Mice through DRD1-PKA-CREB Signaling. *Molecular neurobiology*, 59(7), 4292–4303. <https://doi.org/10.1007/s12035-022-02845-z>
- Morris, R. G., Garrud, P., Rawlins, J. N., & O'Keefe, J. (1982). Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature*, 297(5868), 681–683. <https://doi.org/10.1038/297681a0>
- Mulder, C., Van Der Zee, E. A., Hut, R. A., & Gerkema, M. P. (2013). Time-place learning and memory persist in mice lacking functional Per1 and Per2 clock genes. *Journal of biological rhythms*, 28(6), 367–379. <https://doi.org/10.1177/0748730413512958>
- Rawashdeh, O., Jilg, A., Jedlicka, P., Slawska, J., Thomas, L., Saade, A., Schwarzacher, S. W., & Stehle, J. H. (2014). PERIOD1 coordinates hippocampal rhythms and memory processing with daytime. *Hippocampus*, 24(6), 712–723. <https://doi.org/10.1002/hipo.22262>
- Sakai, T., Tamura, T., Kitamoto, T., & Kidokoro, Y. (2004). A clock gene, period, plays a key role in long-term memory formation in Drosophila. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(45), 16058–16063. <https://doi.org/10.1073/pnas.0401472101>
- Tucker, M. A., Morris, C. J., Morgan, A., Yang, J., Myers, S., Pierce, J. G., Stickgold, R., & Scheer, F. A. J. L. (2017). The Relative Impact of Sleep and Circadian Drive on Motor Skill Acquisition and Memory Consolidation. *Sleep*, 40(4), zsx036. <https://doi.org/10.1093/sleep/zsx036>
- Valentinuzzi, V. S., Kolker, D. E., Vitaterna, M. H., Ferrari, E. A. M., Takahashi, J. S., & Turek, F. W. (2001). Effect of circadian phase on context and cued fear conditioning in C57BL/6J mice. *Animal Learning and Behavior*, 29(2), 133–142. <https://doi.org/10.3758/BF03192822>
- Wang, L., Zhang, R., Hou, X., Wang, C., Guo, S., Ning, N., Sun, C., Yuan, Y., Li, L., Hölscher, C., & Wang, X. (2019). DA-JC1 improves learning and memory by antagonizing A β 31-35-induced circadian rhythm disorder. *Molecular brain*, 12(1), 14. <https://doi.org/10.1186/s13041-019-0432-9>
- Wang, Y., Zhang, Y., Wang, W., Liu, X., Chi, Y., Lei, J., Zhang, B., & Zhang, T. (2020). Effects of circadian rhythm disorder on the hippocampus of SHR and WKY rats. *Neurobiology of learning and memory*, 168, 107141. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2019.107141>
- Zhang, Y., Wang, W., Li, Y., Shen, J., & Zhang, T. (2020). Does circadian rhythm disruption during their early development have lasting effects on cognition of the elder rats?. *Neuroreport*, 31(7), 544–550. <https://doi.org/10.1097/WNR.0000000000001443>