

T.C  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FENİLKETONÜRİDE ÖĞRENME VE BELLEK MEKANİZMASININ DİŞİ VE  
ERKEK SIÇANLARDA cAMP/PKA/CREB/BDNF YOLAĞI ÜZERİNDEN  
İNCELENMESİ

Çiğdem ÇİÇEK

Biyokimya Programı  
DOKTORA TEZİ

ANKARA  
2020

## TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince, tezin ortaya çıkmasında ve her aşamasında son derece önemli katkıları olan, bilgi ve tecrübeleri ile beni aydınlatan, eğitimim süresince beni cesaretlendiren ve desteğini esirgemeyen saygıdeğer danışmanım Prof.Dr. Ebru Bodur'a

Tez çalışmamın ilk gününden son anına kadar desteğini hep yanımda hissettiğim, bilimsel duruşu ile örnek aldığım, yaşadığımız sorunlara karşı etkili ve hızlı çözüm üreten değerli hocam Prof. Dr. Emine Eren Koçak'a

Bilim insanı kimliği, disiplini ve çalışkanlığı ile örnek aldığım, tez araştırman ve tüm konularda hiçbir zaman desteğini esirgemeyen sevgili hocam Dr. Öğr. Üyesi Pelin Telkoparan Akıllılar'a

Doktora eğitimim sırasında araştırma projelerinde çalıştığım Johannes Gutenberg Üniversitesinden Prof. Dr. Beat Lutz ve Dr. Julia Leschick'e, Groningen Üniversitesinden Prof.Dr. Eddy Van der Zee'ye

Doktora eğitimim boyunca desteklerini hep hissettiğim ve onlardan çok şey öğrendiğim Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda görev yapan tüm değerli hocalarıma;

Tez deneylerim sırasında, hep yanımda olan dostluğuyla iyi ki tanımışım dediğim değerli arkadaşım Arş. Gör. Müslüm Gök'e, doktora eğitimine birlikte başladığım, ders dönemi ve tez dönemi boyunca tüm süreci paylaştığım kıymetli arkadaşım Arş.Gör.Dr. Ahmet Yalçınkaya'ya,

Yüksek İhtisas Üniversitesinde yollarımızın kesiştiği değerli arkadaşlarım Dr. Öğr. Üyesi Nurnehir Baltacı, Dr. Kağan Ağan, Öğr.Gör. Veysel Baskın'a

Hayata başladığım günden beri beni her konuda destekleyen canım annem Bengül'e, babam Şaban'a, abim Çağatay'a ve Didem'e,

Hayatımın tüm alanında yanımda hissettiğim sevgili eşim Ahmet'e

En içten duygularım ile teşekkür ederim.

## ÖZET

**ÇİÇEK Ç., Fenilketonüride Öğrenme Bellek Mekanizmasının Dişi Ve Erkek Sıçanlarda cAMP/PKA/CREB/BDNF Yolağı Üzerinden İncelenmesi. Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Programı Doktora Tezi, Ankara, 2020.**

Fenilketonüri, fenilalanin hidroksilaz enzim eksikliği ile karakterize nadir görülen bir kalıtsal metabolik hastalıktır. Bu enzimin yokluğu kan fenilalanin seviyesini yükselterek, beyinde fenilalanin birikmesine ve geri dönüşümsüz nörolojik hasar oluşması ile öğrenme ve belleği olumsuz yönde etkilemektedir. Hipokampus, öğrenme ve bellek gibi beyin fonksiyonlarında önemli roller oynar. cAMP /PKA /CREB/BDNF yolağının yapılan çalışmalar ile uzun süreli öğrenme ve bellek ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bu tez kapsamında fenilketonüride bozulan öğrenme bellek mekanizmasının dişi ve erkek sıçanlarda cAMP/PKA/CREB/BDNF yolağı ile ilişkisi incelendi. Fenilketonüri modeli oluşturmak için fenilalanin hidroksilaz enzim inhibitörü 4-Cl-fenilalanin ve fenilalanin subkutan enjeksiyon ile 6 günlük sıçan yavrularına uygulandı. Lokomotor aktivite, yeni nesne tanıma ve pasif sakınma testleri yapıldı. Hipokampal dokuda cAMP /PKA /CREB /pCREB/BDNF metabolit miktarları, protein ifadeleri ve RT-qPCR ile PKA, CREB, BDNF, AChE ve BChE'in mRNA ifadeleri analiz edildi. Cinsiyete göre analizlerde erkek PKU sıçanların dişi PKU sıçanlara göre lokomotor aktivitesinin azaldığı bulundu. PKU grubu erkek sıçanlar AChE, BChE, CREB ve BDNF mRNA seviyeleri, dişi PKU sıçanlarda CREB ve BDNF seviyelerinin azaldığı belirlendi. PKU erkek sıçanların PKA aktivitesi azalırken, dişi PKU sıçanların arttığı bulundu. pCREB/CREB oranı ise PKU dişilerde azaldığı tespit edildi. Sonuç olarak PKU modelinde BDNF yolağı ve kolinerjik sistem elemanlarının seviyelerinin cinsiyete göre farklılık gösterebileceği saptandı.

**Anahtar Kelimeler:** Fenilketonüri, BDNF sinyal yolağı, CREB, Nörotrofik Faktör, Öğrenme ve Bellek

Destekleyen Kurumlar: Tubitak 2214-A Doktora Sırası Araştırma Burs Programı, HÜBAP (Proje no: TDK-2018-16969)

## ABSTRACT

**ÇİÇEK Ç., Analysis of Learning Memory Mechanism in Phenylketonuria with the CAMP / PKA / CREB / BDNF Pathway in Female and Male Rats, Hacettepe University Graduate School of Health Sciences Biochemistry Program Doctor of Philosophy Thesis, Ankara, 2020.** Phenylketonuria is a rare hereditary metabolic disease characterized by deficiency of phenylalanine hydroxylase. The absence of enzyme causes blood phenylalanine levels to rise. If patients are not treated, irreversible neurological damage can occur due to the accumulation of phenylalanine in the brain and, learning memory may be adversely affected. The hippocampus plays important roles in brain functions, including learning and memory. The cAMP/PKA/ CREB/BDNF pathway is associated with long-term learning and memory. In this thesis, the learning memory mechanism in phenylketonuria was examined through the cAMP/PKA/CREB/BDNF pathway in female and male rats. Phenylalanine hydroxylase enzyme inhibitor 4-Cl-phenylalanine and phenylalanine were applied to 6 day old rats by subcutaneous injection to establish rat phenylketonuria model. Locomotor activity, new object recognition and passive avoidance tests were performed to measure learning memory functions. Hippocampal metabolite concentrations, protein expressions of cAMP/PKA/CREB/pCREB/BDNF and mRNA expressions of PKA, CREB, BDNF, AChE and BChE were analyzed. Male rats displayed reduced locomotor activity compared to females. RT-qPCR results exhibited decreased AChE, BChE, CREB and BDNF mRNA levels in males along with CREB and BDNF levels in females. In protein analysis PKA activity was decreased in male rats whereas it increased in female rats. While the pCREB/CREB ratio was statistically increased in female PKU rats in male rats an increase trend was found. Our results display that in PKU model BDNF pathway and the levels of cholinergic system elements may differ by gender.

**Keywords:** Phenylketonuria, BDNF signaling pathway, CREB, Neurotrophic Factor, Learning and Memory

Supported by Tubitak 2214-A Fellowships and Grant Programmes, HÜBAP (Proje no: TDK-2018-16969)



## İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	III
YAYINLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	III
ETİK BEYAN	V
TEŞEKKÜR	VI
ÖZET	VII
İÇİNDEKİLER	IX
SİMGELER VE KISALTMALAR	XIII
ŞEKİLLER	XV
TABLolar	XVII
<b>1. GİRİŞ</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİ</b>	<b>3</b>
2.1 Fenilalanin	3
2.2 Fenilalanin hidroksilaz (PAH)	4
2.3 Fenilketonüri	5
2.4. Fenilketonürinin Patofizyolojisi	9
2.5. PKU'da Mevcut Tedaviler	9
2.5.1. Düşük Fenilalanin Diyeti	10
2.5.2. Düşük Fenilalanin Diyetine Yardımcı Tedavi Olarak Sapropterin Dihidroklorür	11
2.5.3. Fenilalanin Amonyak Liyaz (PAL)	12
2.6. Nörotrofik Faktörler	12
2.7. BDNF	13

2.8. Nörodejeneratif hastalıklarda BDNF'nin rolü	15
2.9. BDNF seviyesinin cinsiyete göre değişimi	16
2.10. cAMP/PKA/CREB/BDNF yolağı	18
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM</b>	<b>20</b>
3.1. Sarf Malzemeler ve Cihazlar	20
3.2. Fenilketonüri modeli oluşturulması	22
3.3. Yeni kontrol grubu	24
3.4. Lokomotor Aktivite testi	25
3.5. Yeni nesne tanıma testi	26
3.6. Pasif Sakınma Testi	28
3.7. Deney şeması	30
3.8. Biyokimyasal Analizler İçin Örnek Hazırlanışı	30
3.8.1 Serum Fenilalanin seviyeleri	30
3.8.2. Sakrifikasyon ile hayvanlardan örnek eldesi	31
3.9. Gerçek zamanlı Kantitatif PCR ile Gen Ekspresyon Analizleri	31
3.9.1. RNA izolasyonu	31
3.9.2. cDNA (komplementer- tamamlayıcı DNA) Sentezi	32
3.9.3. Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real-Time PCR)	33
3.10. Hipokampus homojenizasyonu	35
3.10.1. Protein tayini	35
3.10.2. Hippokampal BDNF, pCREB, CREB, cAMP, PKA seviyesinin ELISA temelli yöntemler ile belirlenmesi	35
3.11. Verilerin analizi	37
<b>4. BULGULAR</b>	<b>38</b>

4.1. Deneysel PKU modelinin plazma fenilalanin miktarı saptanarak doğrulanması	38
4.2. Lokomotor Aktivite testi sonuçları	39
4.3. Yeni nesne tanıma testi	40
4.4. Pasif sakınma testi	42
4.5. Toplam vücut ağırlık değişiklikleri	43
4.6. Hipokampüste PKA, CREB ve BDNF mRNA Transkripsiyon Düzeyleri	46
4.6.1. Hipokampus Protein Kinaz A m-RNA ifadesinin Real Time PCR ile analizi	46
4.6.2. Hipokampus CREB m-RNA ifadesinin Real Time PCR ile analizi	46
4.6.3. Hipokampus BDNF m-RNA ifadesinin Real Time PCR ile analizi	47
4.7. Hipokampüste AChE ve BChE mRNA Transkripsiyon Düzeyleri	48
4.8. Hipokampüste protein seviyesinin BCA yöntemi ile kantitatif analizi	50
4.9. Hipokampüste PKA yolağı protein bileşenlerinin ELISA yöntemi ile kantitatif analizi	51
4.9.1. Hipokampus cAMP miktarının ELISA yöntemi ile belirlenmesi	52
4.9.2. Hipokampus PKA aktivitesinin ELISA yöntemi ile belirlenmesi	53
4.9.3. Hipokampus Total CREB miktarının ELISA yöntemi ile belirlenmesi	54
4.9.4. Hipokampus FosfoCREB miktarının ELISA yöntemi ile belirlenmesi	55
4.9.5. Hipokampus BDNF miktarının ELISA yöntemi ile belirlenmesi	58
<b>5. TARTIŞMA</b>	<b>61</b>
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER</b>	<b>71</b>
6.1. Sonuçlar	71
6.2. Öneriler	72
<b>7. KAYNAKLAR</b>	<b>73</b>
<b>8. EKLER</b>	

**EK-1:** Tez çalışması ile ilgili etik kurul izni

**Ek-2:** Dijital makbuz

## **9. ÖZGEÇMİŞ**

## SİMGELER ve KISALTMALAR

<b>AChE</b>	Asetilkolinesteraz
<b>AD</b>	Alzheimer Hastalığı
<b>BChE</b>	Bütirikolinesteraz
<b>BDNF</b>	Beyin Kökenli Nörotrofik Faktör (Brain Derived Neurotrophic Factor)
<b>BH4</b>	Tetrahidrobiyopterin
<b>cAMP</b>	Siklik adenosin 3', 5' monofosfat
<b>CDNF</b>	Serebral Dopamin Nörotrofik Faktör
<b>MSS</b>	Merkezi Sinir Sisteminde
<b>CREB</b>	cAMP Yanıt Eleman Bağlayıcı Protein
<b>ELISA</b>	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
<b>ERE</b>	Östrojen Reseptörüne Cevap Veren Element
<b>GDNF</b>	Glia Kökenli Nörotrofik Faktör
<b>GusB</b>	$\beta$ -glukuronidaz
<b>HPE</b>	Hiperfenilalaninemi
<b>IEM</b>	Kalıtsal Metabolik Hastalıklar (Inborn errors of metabolism)
<b>LNA</b>	Büyük Nötral Amino Asit
<b>LOD / LOQ</b>	Tespit / Ölçüm Limiti
<b>LTP</b>	Uzun Süreli Potensiyasyon
<b>NGF</b>	Sinir Büyüme Faktörü
<b>NT-3</b>	Nörotrofin-3
<b>NT-4</b>	Nörotrofin-4
<b>PAH</b>	Fenilalanin Hidroksilaz
<b>PAL</b>	Fenilalanin Amonyak Liyaz
<b>PCP</b>	4-Cl-Fenilalanin
<b>PCR</b>	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>pCREB</b>	cAMP Yanıt Eleman Bağlayıcı Forforile Protein
<b>Phe</b>	Fenilalanin
<b>PI3K</b>	Fosfoinositid 3-Kinaz

<b>PKA</b>	Protein Kinaz A
<b>PKU</b>	Fenilketonüri
<b>RT-qPCR</b>	Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>TrkB</b>	Tropomiyozin Reseptör Kinaz B
<b>Tyr</b>	Tirozin

## ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. Fenilalanin-Tirozin dönüşümü.	4
2.2. Fenilalanin metabolizması.	5
2.3. Fenilalanini düşürmek için uygulanan tedavi yöntemleri.	10
2.4. BDNF sinyal yolağını uyaran farklı yollar.	14
2.5. Beyinin farklı bölgelerinde ki BDNF seviyelerinin şematik gösterimi.	15
3.1. Deney grupları.	23
3.2. Yenidoğan sıçanlarda oluşturulan deneysel PKU modeli.	24
3.3. Yenidoğan sıçanlarda oluşturulan deneysel PKU modeli (2).	24
3.4. Lokomotor aktivite testi kurulumunun şematik gösterimi.	25
3.5. Yeni nesne tanıma testi (1).	27
3.6. Yeni nesne tanıma testi (2).	27
3.7. Pasif sakınma testi 1. gün.	28
3.8. Pasif sakınma testi 1. gün.	29
3.9. Kan ve doku örnekleri ile yapılan analizler.	30
3.10. RT-qPCR döngü şeması.	34
3.11. ELISA metodu.	37
4.1. Plazma Phe seviyeleri.	38
4.2. HPE grubun plazma Phe seviyeleri.	39
4.3. Lokomotor aktivite testinde kat edilen mesafe.	40
4.4. Yeni nesne tanıma testi sıçanlara ayırıcılık indeksi (1 saat sonra).	40
4.5. Yeni nesne tanıma testi ayırıcılık indeksi (24 saat sonra).	41
4.6. Kontrol grubu sıçanların bazal analizi.	42
4.7. Pasif sakınma testi dişi ve erkek sıçanlarda geçiş gecikmesi (6 saat).	42
4.8. Pasif sakınma testi dişi ve erkek sıçanlarda geçiş gecikmesi (24 saat).	43
4.9. PKU ve kontrol grubu toplam vücut ağırlığı değişimleri.	44
4.10. HPE ve kontrol grubu toplam vücut ağırlığı değişimleri.	44
4.11. PKU ve kontrol grubu hipokampus ağırlıkları değişimi.	45
4.12. HPE ve kontrol grubu hipokampus ağırlıkları değişimi.	45
4.13. Hipokampal PKA m-RNA ekspresyonunu.	46
4.14. Hipokampal CREB mRNA ekspresyonunu.	47

<b>4.15.</b>	Hipokampal BDNF mRNA ekspresyonunu.	48
<b>4.16.</b>	Hipokampal AChE mRNA ekspresyonunu.	49
<b>4.17.</b>	Hipokampal BChE mRNA ekspresyonunu.	50
<b>4.18.</b>	Hipokampal protein miktarları (PKU).	51
<b>4.19.</b>	Hipokampal protein miktarların (HPE).	51
<b>4.20.</b>	Hipokampal cAMP miktarları (PKU).	52
<b>4.21.</b>	Hipokampal cAMP miktarlarını (HPE).	52
<b>4.22.</b>	Hipokampal PKA aktivitesi (PKU).	53
<b>4.23.</b>	Hipokampal PKA aktivitesi (HPE).	54
<b>4.24.</b>	Hipokampal CREB miktarları (PKU).	55
<b>4.25.</b>	Hipokampus CREB miktarı (HPE).	55
<b>4.26.</b>	Hipokampal pCREB miktarları (PKU).	56
<b>4.27.</b>	Hipokampal pCREB miktarları (HPE).	56
<b>4.28.</b>	Hipokampal pCREB/CREB oranı (PKU).	57
<b>4.29.</b>	Hipokampal pCREB/CREB oranı (HPE).	58
<b>4.30.</b>	Hipokampal BDNF miktarları (PKU).	58
<b>4.31.</b>	Hipokampal BDNF miktarları (HPE).	59
<b>5.1.</b>	Cinsiyete bağlı PKA yolak elemanlarının değişimi.	69



**TABLULAR**

<b>Tablo</b>		<b>Sayfa</b>
<b>2.1.</b>	PKU'nun Dünyadaki görülme sıklığı.	7
<b>3.1.</b>	Biyokimyasal analizler için kullanılan ELISA kitleri.	20
<b>3.2.</b>	RNA izolasyonu için kullanılan malzeme listesi.	21
<b>3.3.</b>	RT-qPCR için tasarlanan primer listesi.	21
<b>3.4.</b>	Deneyler sırasında kullanılan cihazlar.	22
<b>3.5.</b>	Yeni nesne tanıma testi.	27
<b>3.6.</b>	Pasif sakınma testi.	29
<b>3.7.</b>	cDNA sentezi için kullanılan çözeltiler (Karışım 1).	33
<b>3.8.</b>	cDNA sentezi için kullanılan çözeltiler (Karışım 2).	33
<b>4.1.</b>	Sonuçların özet tablosu.	60

## 1. GİRİŞ

Fenilketonüri (PKU), fenilalanin'i (Phe) tirozine dönüştüren karaciğer enzimi fenilalanin hidroksilazın (PAH) eksikliği ile oluşan nadir görülen kalıtsal bir metabolik hastalıktır. Bu enzimin yokluğu kan Phe seviyelerinin yükselmesine neden olur. Eğer tedavi edilmezse, beyinde Phe ve metabolitlerinin birikmesi nedeniyle geri dönüşümsüz nörolojik hasar oluşabilir (1, 2). Doğal protein kısıtlaması olan düşük Phe diyeti ve sentetik Phe içermeyen/düşük Phe protein ikamesi ile takviye, PKU'da standart tedavidir. Ancak güncel olarak, tetrahidrobiopterin (BH<sub>4</sub>) kullanımı gibi ilave tedaviler veya büyük nötral amino asitler (LNAA) ile tedavisi uygulanabilmektedir. Kan Phe seviyelerini güvenli bir aralıkta tutmak ve optimal nörolojik gelişimi elde etmek için, tercihen yaşamın ilk iki haftasında, yenidoğan taraması ile tespit edildikten sonra diyet tedavisi başlanmalıdır (3).

Hipokampus, öğrenme ve bellekte dahil olmak üzere beyin fonksiyonlarında önemli roller oynar (4). Siklik adenosin 3', 5' monofosfat (cAMP)-bağımlı protein kinaz A (PKA), uzamsal ve uzamsal olmayan uzun süreli belleğin birleştirilmesinde öneme sahiptir. PKA'nın ayrılmış katalitik alt birimleri, cAMP düzenleyici alt birimlerine bağlandığında serin 133 aminoasit üzerinden cAMP yanıt eleman bağlayıcı proteine (CREB) fosfat bağlanır ve fosfor CREB oluşur (pCREB). pCREB, beyin kökenli nörotrofik faktör (BDNF) gibi uzun süreli bellek ile ilişkili genlerin (5) transkripsiyonunu düzenler eder. Bu nedenle, PKA sinyalleri hipokampusa bağlı bellek için önemlidir. BDNF beyinde nöronların büyümesi, hayatta kalması ve farklılaşmasında görev alan önemli bir nörotrofik faktördür (6). Birçok nörodejenatif ve psikolojik hastalıklarda BDNF seviyelerinin hastalıkla ilişkili olarak azaldığı farklı çalışmalarda gösterilmiştir (7). Yapılan çalışmalar BDNF sinyal yolağında öğrenme ve bellek oluşumunda önemli bir rol oynadığı rapor edilmiştir (8, 9).

Bu tez kapsamında PAH enzim inhibitörü 4-Cl-Fenilalanin ve Phe kullanılarak oluşturulan PKU sıçan modelinde cAMP/PKA/CREB/BDNF yolağı bileşenleri ve kolinerjik yolak bileşenlerinden asetilkolinesteraz (AChE) ve butirilkolinesteraz (BChE) ifadesindeki değişiklikler cinsiyet farkına göre incelenmiştir. Bu hastalığın PKU model

oluşturularak sıçan yavrularında çalışılması hastalığın patofizyolojisinin araştırılması ve yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi açısından önem taşımaktadır.

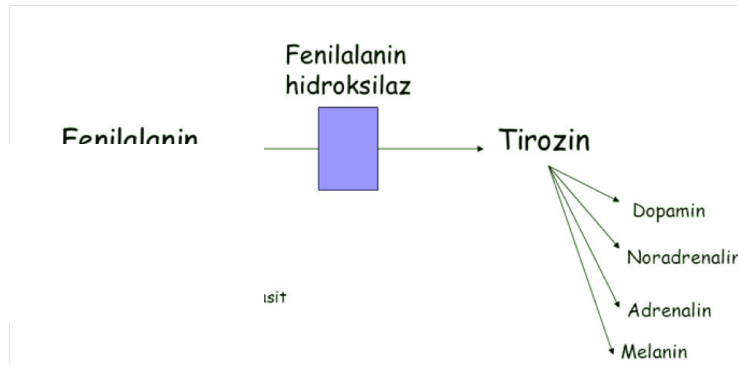
## 2. GENEL BİLGİ

Kalıtsal metabolik hastalıklar (IEM) nadir genetik bozukluk grubunu içerir; genellikle mutant genlerin neden olduğu anormal proteinlerle sonuçlanan ve metabolik yolağı yavaşlatarak/durdurarak hastalık tablosu oluştururlar. Bilinen tüm IEM'ler, otozomal resesif geçişli veya X bağılı resesif bir şekilde kalıtsaldır. Kusurlu bir genden ifade edilen protein, enzim aktivitesinde kısmi bir bağımlılığa veya fonksiyon kaybına neden olabilir. Dahası, çoğu IEM'deki sorunlar, birikmiş maddelerin toksik etkilerinden, bunların normal işlevlere müdahalelerinden veya temel bileşiklerin sentezlenmesindeki azalmadan kaynaklanırlar (10) .

Geleneksel olarak, kalıtsal metabolik hastalıklar 4 kategoriye ayrılmıştır: Amino asit metabolizması bozuklukları, karbonhidrat metabolizması, lizozomal depo hastalıkları ve organik asit metabolizması bozuklukları (11). Bu hastalıkların sınıflandırılması, birkaç kalıtsal metabolizma bozukluğunun keşfedilmesine dayanan 10'dan fazla kategoriye içerecek şekilde genişletilmiştir. Bu yeni kategoriler arasında en yaygın hastalıklar protein metabolizması bozukluklarıdır. Dikkat çekici bir şekilde, Fenilketonüri, bilinen amino asit metabolizması bozukluklarının arasında en önemlisi olarak değerlendirilmektedir (10).

### 2.1 Fenilalanin

Fenilalanin (Phe) ( $C_9H_{11}NO_2$ ), polar olmayan bir yan zincire sahip esansiyel bir  $\alpha$ -amino asittir. Diğer tüm polar olmayan amino asitler gibi Phe, hidrofobik etkileşimleri kolaylaştıran elektriksel olarak nötr bir yapıdadır. Şekil 1.1'de gösterildiği gibi Phe, hücrel süreçlerde önemli bir diğer amino asit olan Tirozin (Tyr)'in öncüsüdür.



**Şekil 2.1.** Fenilalanin-Tirozin dönüşümü

Fenilalanin 'nin aksine Tyr,  $C_9H_{11}NO_3$  molekül formülüne sahip, esansiyel olmayan bir  $\alpha$ -amino asittir. Tyr, çeşitli işlevleri nedeniyle kritik bir amino asittir. Örneğin, Tyr artıkları genellikle yan zincir hidroksil grubunda fosforile edilir ve bu da hedef proteinin aktivitesini değiştirir. Böylece, Tyr fosforilasyonu enzimatik aktiviteyi ve sinyal iletimini düzenleyen önemli bir adımı oluşturur. Dahası, Tyr'in normal metabolizması, tartışılan diğer bileşiklere dönüşmesine neden olur.

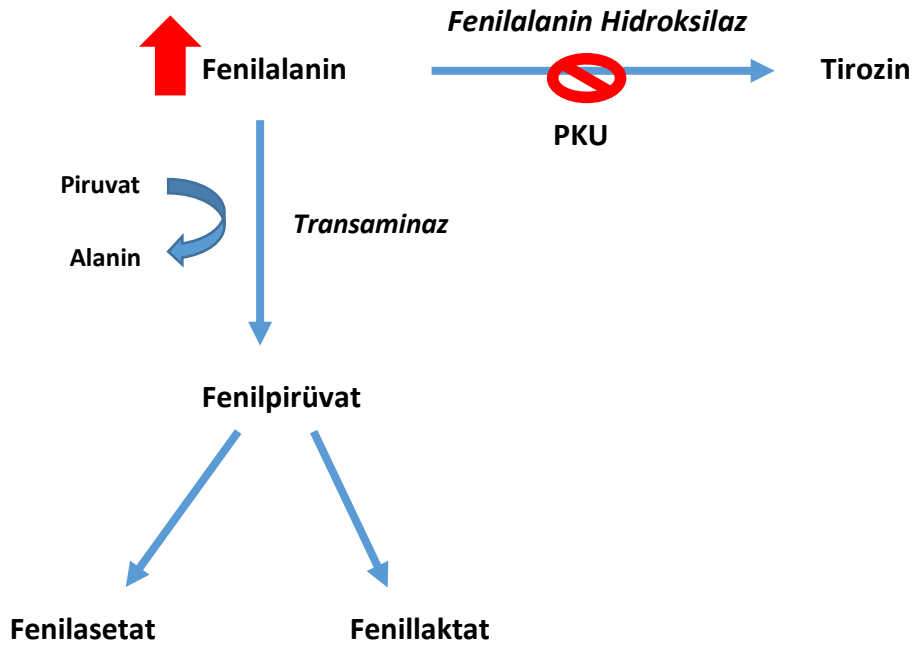
## 2.2 Fenilalanin hidroksilaz (PAH)

Fenilalanin hidroksilasyonu, Tyr üreten fenilalanin hidroksilaz tarafından katalize edilir (12). Fenilalanin hidroksilaz, pterin bağımlı amino asit hidroksilazlar adı verilen bir monooksijenaz enzim sınıfına aittir; bu sınıfın 3 üyesi vardır (fenilalanin hidroksilaz, triptofan hidroksilaz ve tirozin hidroksilaz). Kataliz için tetrahidrobiopterin 4'ü (bir pteridin kofaktörü olan BH4) kullanılır (13).

Ökaryotik PAH'ın homotetramerik ve homodimerik formlarının pH'ya bağlı bir dengede var olduğu gösterilmiştir. Her iki form da katalitik olarak aktiftir, farklı kinetiklere sahiptir ve farklı düzenlenmelere uğrarlar (14, 15). Bununla birlikte, 51.9 kDa PAH monomer proteini, 3 bölge içerir: Toplam amino asit kalıntısının (117 kalıntı) yaklaşık % 26'sını temsil eden  $NH_2$ -terminal düzenleyici bölge; tüm molekülün % 69'unu temsil eden bir katalitik bölge (310 kalıntı); ve oligomerleşmeden sorumlu 25 kalıntı (<% 6) içeren bir  $COOH$ -terminal bölgesi içerir (15, 16).

### 2.3 Fenilketonüri

Fenilketonüri, otozomal resesif geçişli hepatik fenilalanin hidroksilaz enziminde bozukluk ile ortaya çıkan ve genellikle yaşamın erken safhalarında teşhis edilen fenilalanin metabolizması hastalığıdır. Fenilalanin hidroksilaz veya dihidrobiopterin redüktaz enzimlerinde oluşan mutasyondan dolayı fenilalaninin tirozin'e dönüşümü gerçekleşemez. Tirozin, sadece protein sentezine katılmayıp aynı zamanda birçok nörotransmitterin sentezinde de öncül bileşik olarak görev almaktadır (2). Şekil 2.2'de görüldüğü üzere PAH enziminin mutasyonu ile Phe-Tyr dönüşümü gerçekleşmektedir.



Şekil 2.2.Fenilalanin metobolizması

Bickel ve arkadaşlarının 1951'de PKU hastalığında diyet gerekliliğini savunmasından bu yana, PKU'nun diyet uygulamalarında kayda değer bir ilerleme olmuştur (17). Tedavinin ilk yıllarında, protein gereksinimleri tam olarak anlaşılammış ve yeterli besleyici bileşime sahip olmayan düşük proteinli diyetler negatif sonuçlara yol açmıştır (18). Tedavinin temel amacı, beynin artan kan Phe

seviyelerinin zararlı etkilerinden korunması olduğundan, erken tedavi protokolleri özellikle bebeklik döneminde ve erken çocukluk döneminde çok kısıtlayıcı diyetler önermiştir (19, 20). 1960'larda ve 1970'lerde, birçok PKU merkezi, beyin gelişiminin esasen tamamlandığına inanılan çocuklarda diyet tedavisini durdurmuştur (21). Sonradan sıkı veya gevşetilmiş bir diyete devam etme yaşı kademeli olarak uzatılmış ve 1990'ların başında İngilterede, Avrupa PKU Kılavuzları tarafından tavsiye edilen diyet tedavisinin yaşam boyu idamesi önerilmiştir (3, 22) .

Çocukluk boyunca yüksek fenilalanin seviyesi beyin gelişiminde birçok probleme yol açar. Bu bireyler yaşam süreleri boyunca fenilalanin içermeyen diyetle beslenerek, plazma fenilalanin seviyelerini güvenli aralıkta tutmak zorundadırlar (23-27). Her yeni doğanda PKU varlığını tespit etmek için tarama testleri yapılmakta ve ardından fenilalanin seviyelerine bakılmaktadır. Normal kan fenilalanin seviyesi ortalama 1 mg/dL iken PKU'lu bireylerde ortalama 6–80 mg/dL arasında değişmektedir (28). Eğer PKU'da erken tedaviye başlanmazsa, yüksek fenilalanin seviyesinden dolayı zeka geriliği gözlenmektedir (29). PKU sıklığının ülkeden ülkeye farklı olduğu yenidoğan tarama programları ile gösterilmiştir. PKU sıklığının etnik gruplara göre değiştiği, beyaz ve yerli Amerikalılarda yüksek, siyahlarda, Asyalılarda ve İspanyollarda ise daha düşük olduğu gösterilmiştir (30). PKU prevalansının Avrupa'da 1/3000-1/30000 arasında değiştiği başka bir çalışma ile gösterilmiştir (31). Ulusal Çocuk Sağlığı ve Gelişim Birliği'ne göre, Birleşik Krallıklarda PKU sıklığı yaklaşık 1/15000'dir. Dünyada en yüksek prevalans, Türkiye'de olup 1/2600 olarak bildirilmiştir (32-34). Ülkemizde ve diğer bazı ülkelerde PKU görülme sıklığı Tablo 2.1'de gösterilmiştir (31).

**Tablo 2.1.** PKU'nun Dünyadaki görülme sıklığı (32)

Ülke	Canlı doğumlarda PAH yetersizliği
Türkiye	1/2600
İrlanda	1/4500
Beyaz ırk, Doğu Asya	1/10000
Japonya	1/143000
Finlandiya, Aşkenazi Yahudileri	1/200000
Afrika	1/100000

Fenilketonüri taraması uzun yıllardır Amerikalı hekim ve bakteriyolog olan Robert Guthrie tarafından geliştirilen ve onun adıyla anılan Guthrie bakteriyel inhibisyon testi ile yapılmaktadır (35).  $\beta$ -2-tiyenilalanin içeren agaroz jel plağına *Bacillus subtilis* bakterisinin ekimi yapıldıktan sonra, üzerine tıpkı antibiyogram uygulamasında olduğu gibi yeni doğan kanı emdirilmiş pulcuklar yerleştirilir. Bir gün beklendikten sonra değerlendirme yapılır. Normal koşullarda, bu ortamda  $\beta$ -2-tiyenilalanin'in inhibe edici etkisi sebebiyle *Bacillus subtilis* üremesi olmaması beklenir. Ancak bebeğin kanında fenilalanin bulunması halinde, bu inhibisyon ortadan kalkarak, bebeğe ait kağıt pulcuk çevresinde üreme gerçekleşir. Üreme zonunun çapı bebeğin kanında bulunan fenilalanin konsantrasyonu ile orantılı olduğundan, bebeğin kanında bulunan fenilalanin konsantrasyonu yaklaşık olarak tahmin edilebilir. Test 3-4 mg/dL fenilalanin konsantrasyonunu belirleyecek şekilde standardize edilmiştir. Sağlıklı yeni doğanlarda bu konsantrasyon 2 mg/dL'nin altında olduğundan, test klinik olarak anlam taşıyabilecek derecede yüksek kan konsantrasyonuna sahip bebekleri belirleyebilecek duyarlılığa sahiptir.

Günümüzde Guthrie testinin kullanımı gittikçe azalmaktadır. Bunun yerine metabolik hastalıkların çok daha kapsamlı bir şekilde taranmasına imkân veren, kütle



spektrometresi ile “yeni doğanda metabolik tarama” testi tercih ve tavsiye edilmektedir. Bu gelişmelere rağmen ülkemizde PKU tarama programı oldukça geç yürütülmeye başlanmıştır.

Türkiye'de ağır zeka geriliği olan 10000 çocukta yapılan bir çalışmada PKU sıklığını % 5 gibi yüksek bir oranda saptanmış, ve PKU için yenidoğan tarama programının gerekliliği anlaşılmıştır. TÜBİTAK desteği ile 20 ilde yürütülen pilot projede Guthrie testi ile yenidoğanda PKU sıklığının 1/4500 olduğu belirlenmiştir. Pilot çalışmadan alınan sonuçlar ışığında ülke genelinde yenidoğan taramasının acilen başlatılmasının gerekliliği rapor edilmiştir (36). PKU, zeka geriliğinin temel nedeni olarak tanımlanmaktadır (37). Nörolojik semptomlar gelişmeden önce, güvenilir ve etkin bir tedavi için, yenidoğan taraması ile tanı konması 21. y.y'daki temel unsur olarak önerilmektedir. En iyi sonuç için, yenidoğanın tıbbi beslenme tedavisine teşhisten hemen sonra başlaması gerekmektedir (38).

PKU'lu yeni doğanda büyük nötral amino asit azalır ve bilişsel fonksiyonlar, yazım, adlandırma, sözel ve görsel bellek ve öğrenmede bozukluklar gözlenir (39, 40). Çocukluk/ergenlik döneminde ise beyin hacminde azalma, beyaz cevher anormaliği, azalan eritrosit membran, düşük asetilkolinesteraz aktivitesi, düşük antioksidan seviyesi, negatif duygu durumu, davranış öğrenme bozukluğu gibi durumlar gözlenmektedir (41).

Fenilketanüride erken tedavi edilmiş yetişkin hastalarla yapılan testler sonucunda çalışma, işleme ve yürütme işlevlerinde hız bozuklukları olduğunu bildirmiştir, ancak sınırlı sayıda bilişsel işlev incelenmiştir (42). Kapsamlı nöropsikolojik değerlendirmelerin olmaması, yetişkin PKU araştırmalarındaki zayıflıklardan biridir.

Yapılan çalışmalarda, özellikle işlem hızı ve yürütücü işlevler için bozukluklar bildirmiştir, ancak bilişsel alanlarda kapsamlı bir değerlendirme eksikliği vardır (24). Ayrıca, literatürde daha önce bildirilen gruplardan daha iyi metabolik kontrole sahip olan PKU'lu erken tedavi gören yetişkinlerde sonuçların belirlenmesi önemlidir. Özellikle işleme hızını ve karmaşık yürütücü işlevleri ele alan görevlerde grup bozuklukları rapor edilmiştir. Genel öğrenme bozukluğuna işaret etmeyen, sözel

öğrenme, sözel bellek ve ortografik işlemde faydalanan görevlerde iyi performans alındığı yapılan çalışma ile gösterilmiştir (40).

#### **2.4. Fenilketonürinin Patofizyolojisi**

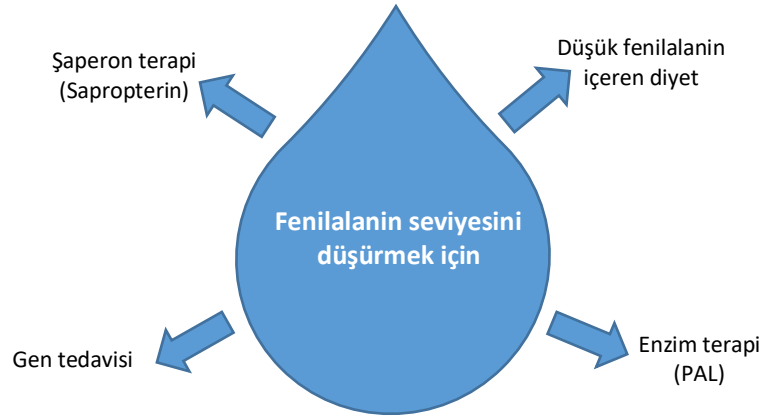
Fenilketonürinin patofizyolojisi, hastalığın keşfedilmesinden bu yana birçok tartışmaya konu olmuştur. Fenilketonların (hastalarda biriken Phe metabolitleri) veya fenilalaninin beyindeki olası toksik etkileri ilk dikkat çeken konu olmuştur. Zeka düzeyinin (IQ) tedaviye başlama yaşı ve tedavi sırasındaki kan Phe düzeyleri (43) ile daha anlamlı olarak ilişkisi olduğu tespit edilmiştir. İdrar fenilketon seviyesi ile klinik tablo arasında ise zayıf ilişkili olduğu bulunmuştur (44). Bu bulgular, kan Phe seviyesinin 600 µmol / L'nin altına düşürülmesinin ve bu seviyede korunmasının zeka geriliğini azaltacağı sonucunu desteklemiştir.

Beyinde artan fenilalanin konsantrasyonlarına ek olarak diğer büyük nötr amino asitlerin, özellikle metiyonin ve tirozinin konsantrasyonlarında bir azalma gözlenmektedir. Bu durum nörotransmitter; dopamin eksikliğinin ve demiyelinizasyona neden olur (39).

Yüksek kan Phe seviyelerinin neden olduğu zihinsel engelliliğin patofizyolojisi tam olarak aydınlatılamamıştır. Merkezi sinir sistemi hasarı mekanizmasından bağımsız olarak, yayınlanan büyük miktarda verilerin meta analizi, kan Phe'nin 120 µmol / L ile 360 µmol / L arasında tutulmasının optimal klinik sonuç ile ilişkili olduğunu ortaya koymuştur. Sonuç olarak, kan Phe seviyesinin bu aralıkta tutulması tüm tedavi yöntemlerinin temel amacı olmaya devam etmektedir (45).

#### **2.5. PKU'da Mevcut Tedaviler**

Bugüne kadar, Phe seviyesini düşürmek ve tedavi aralığında tutmak için dört farklı tedavi bulunmaktadır. Düşük Phe diyet tedavisi hariç diğer üçü henüz geliştirilme aşamasındadır (Şekil 2.3.). Halen, düşük Phe diyeti veya bu tedaviye ek olarak ikili bir kombinasyonu (düşük Phe diyeti ve şaperon tedavisi/düşük Phe diyeti ve enzim ikame tedavisi), hastanın kan Phe seviyesini kontrol etmek için kullanılmaktadır.



**Şekil 2.3.** Fenilalanini düşürmek için uygulanan tedavi yöntemleri (46).

### 2.5.1. Düşük Fenilalanin Diyeti

Diyetin amacı, hastanın sağlıklı olması için yeterli doğal protein sağlamak ve kan Phe düzeyini tedavi aralığında tutmaktır. Fenilketonüri hastada Phe içermeyen fakat diğer amino asitleri içeren proteinli diyet ile normal biçimde büyüyüp gelişmesini sağlamak amaçlanır. Fenilketonüri diyetinde kullanılan en eski ve halen en yaygın besin/gıda formlarından biri içecek şeklinde alınan, genellikle diğer besinlerle dengelenmiş bir fenilalanin içermeyen amino asit karışımlarıdır. Daha fazla diyet çeşidine izin veren düşük proteinli yiyecekler de mevcuttur, bu diyet seçenekleri hasta açlığını gidermek ve normal büyümeye izin vermek için kullanılır. Fenilketonüri hastalarda diyet Phe toleransı yaşa göre değişir: bir bebek (0-6 aylık) Phe kg / gün başına 20-70 mg protein, çocukta (> 5 yaş) Phe / kg / gün 0,4-1,4 g doğal proteini tolere edebilir (47). Fenilketonüri tipik bir yetişkin ise günde 7–24 g doğal proteine eşdeğer olan 350 - 1200 mg Phe'i tolere edebilir (48) Kan Phe seviyesinin yükselmesinden önce tolere edilen bu az miktardaki doğal protein, standart bir diyetin protein içeriğinden önemli ölçüde farklıdır. Hastadan diyete bağlı kalması istenmektedir. Diyetin zihinsel engelliliği ve maternal PKU sendromunu önlemede etkinliği kanıtlanmıştır. Ancak PKU'lu bireylerin çoğu, ergenlik ve yetişkinlikte yavaş yavaş düşük Phe diyetini sürdürmez hale gelir. Bu durum da Phe seviyelerinde artışa yol açar (49) ve takiben bir dizi nöropsikiyatrik problem ile depresyon ve anksiyete

sürece dahil olur. Büyük nötr amino asitlerin diyetle eklenmesi, kan beyin bariyerinden Phe taşınımını kompetitif bir şekilde inhibe ederek beyindeki Phe seviyelerini azaltmaktadır. Ama bu yöntem sadece kısa vadeli bir etki oluşturmaktadır (50).

### **2.5.2. Düşük Fenilalanin Diyetine Yardımcı Tedavi Olarak Sapropterin Dihidroklorür**

2007 yılına kadar, klasik PKU tedavisinde tek etkili yöntem, düşük fenilalanin diyeti idi. Bu durum ABD'de 2007 yılında sapropterin dihidroklorür kullanımının FDA onayı alması ile önemli ölçüde değişti. Sapropterin, fenilalanin hidroksilazın doğal koenzimi olan tetrahidrobiopterinin sentetik bir şeklidir. Kullanımı birçok ülkede onaylanmış durumdadır. 1970'lerden beri PAH kofaktörü BH<sub>4</sub>'ün oluşumundaki bir kusur nedeniyle yüksek Phe seviyelerine sahip nadir hastalar tanımlanmıştır (51, 52). Bu hastalarda biopterin koenziminin (sapropterin) sentetik formülasyonu ile tedavi, Phe seviyelerini normal düzeye indirmeyi başarmıştır.

Sapropterinin ilk klinik denemesi ile etkinliği gösterilmiştir. 10 mg / kg / gün sapropterin kullanımından 8 gün sonra PKU hastalarının % 20 kadarında kan Phe seviyesinde % 30 azalma gözlenmiştir (53). Farklı bir çalışmada, hastaların % 56'sında, 20 mg / kg / gün sapropterin kullanımından 8 gün sonra Phe seviyesinde % 30 azalma olduğu gözlenmiştir. Ancak Sapropterine Phe seviyelerinin azalması ile yanıt veren hastalarda bile, düşük Phe diyeti halen gerekmektedir. Phe toleransları daha doğal protein içeren yiyecekler yemelerine izin verecek şekilde geliştirilmiştir (54).

Daha hafif PKU formlarında, yani kısmi enzim aktivitesi olan hastalarda, stabilize edilebilecek mutant enzime sahip oldukları için sapropterin tedavisine cevap verme olasılığı daha yüksek bulunmuştur. Bu nedenle, sapropterine yanıt veren hastaların yüzdesi, popülasyona ve spesifik PAH gen mutasyonlarının tamamlayıcısına bağlı olarak değişecektir.

### 2.5.3. Fenilalanin Amonyak Liyaz (PAL)

Fenilalanin amonyak liyaz (PAL) 'in fenilalanini (transsinamik asit ve amonyağa) metabolize etme yetisinin ve PKU tedavisinde potansiyel faydasının tanınması ilk olarak 1980'de bildirilmiştir (55, 56). PAL, eksik enzimin (PAH) bazı fonksiyonlarının yerini alabilen başka bir enzim ile yerine konduğu yeni bir enzim replasman tedavisi kategorisini temsil eder. PAL, PAH'ın replasman tedavisinde kullanımında karşılaşılan işlevsel engellerin çoğunun üstesinden gelmek için bir çözüm olmuştur. PAH, *in vitro* olarak ifadesi ve saflaştırılması zor olan ve işlev için biopterin koenzimi varlığını gerektiren çok kararsız bir enzimdir. PAL, daha kararlı olduğu ve aktivite için bir koenzim gerektirmediği için ilaç geliştirilmesine çok daha uygundur. Oral olarak verilen bir PAL geliştirmeye yönelik ilk çabaların ardından, PKU fare modelinde periton içi PAL enjeksiyonunun fenilalanin seviyesini doza duyarlı bir şekilde azalttığı ve etkinin 24 saat sürdüğü gösterilmiştir (56).

İnsan kullanımı için enzim, konakçı immün tepkisinden ve proteaz direncinden korumak için polietilen glikol (PEGilasyon) ilave edilerek modifiye edilmiştir. Derialtı enjeksiyon plazma ve beyin Phe seviyelerinde önemli bir azalmaya yol açmıştır (57). PEG ile PAL formuna PEG-PAL ve nihayetinde pegvaliyaz adı verilmiştir. Pegvaliyazın güvenilirliği ve etkinliği dört Faz 2 klinik çalışmasında ve iki Faz 3 çalışmasında PRISM-1 ve -2 olarak değerlendirilmiştir (58-60).

### 2.6. Nörotrofik Faktörler

Nörotrofik faktörler, nöral ve nöral olmayan dokularda çeşitli işlevlere sahip olup periferel ve merkezi sinir sisteminin gelişmesine, hayatta kalmasına ve korunmasına aracılık eden temel salgı proteinlerini içerir (61). Bu pleiotropik moleküller, aksonal büyüme, dendrit gelişimi ve sinaptik plastisite ile spesifik hedef hücrelerle uygun temasların kurulması dahil olmak üzere yetişkinlik döneminde de nöronal gelişim ve plastisitede kritik rol oynarlar (62, 63)

Nörotrofinler başlangıçta pronörotrofinler olarak salgılanır ve proteolitik hidroliz ile aktif forma geçerler (64). Günümüzde nörotrofik faktörler üç ana ailede

gruplandırılabilir: nörotrofinler, glia kökenli nörotrofik faktör (GDNF) ailesi ligandlar (GFL'ler) ve sitokinler (65-67). Ayrıca serebral dopamin nörotrofik faktör (CDNF) ve mezensefalik astrosit kaynaklı nörotrofik faktör (MANF) gibi geleneksel olmayan nörotrofik faktörler de bulunmaktadır (68).

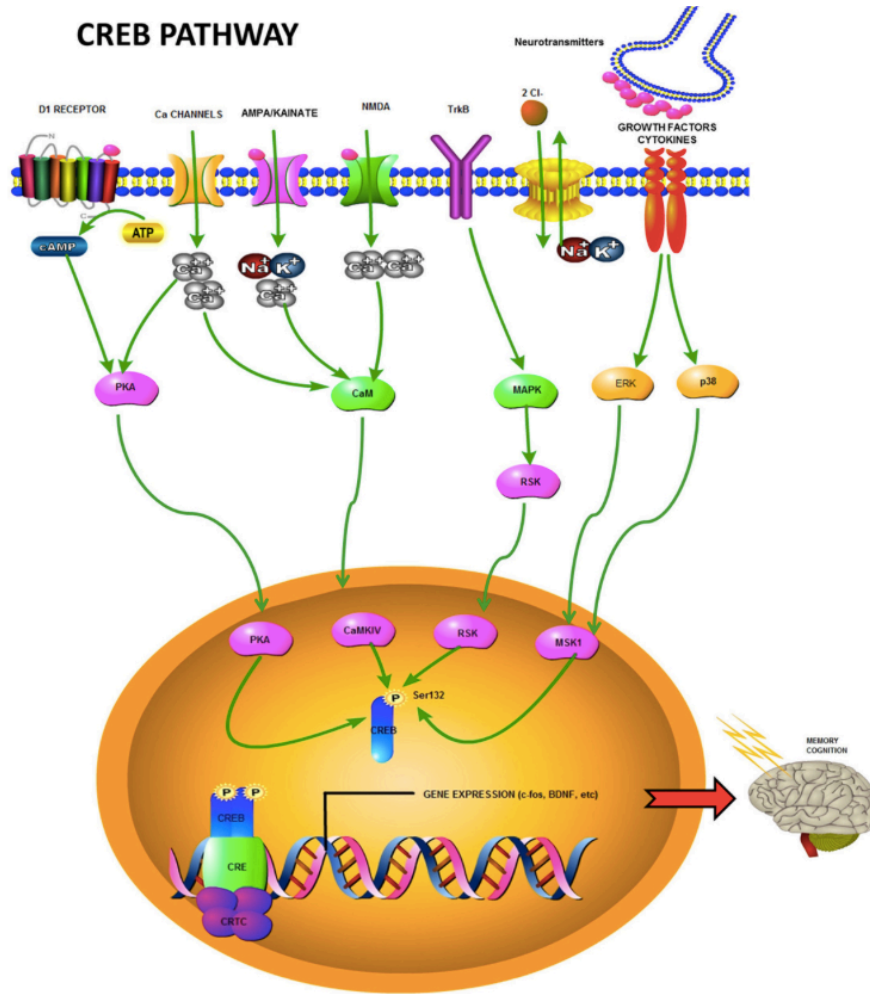
Sinir büyüme faktörü (NGF), periferik sinir sisteminin hayatta kalması ve gelişmesi için gerekli bir protein olup, nörotrofin ailesinin ilk keşfedilmiş üyesi olmuştur (69). Memelilerde, bu aile yapısal olarak ilişkili dört nörotrofinden oluşur: Sinir büyüme faktörü (NGF), beyin kaynaklı nörotrofik faktör, nörotrofin-3 (NT-3) ve nörotrofin-4 (NT-4) (70).

BDNF ekspresyonu, CREB'i içeren çeşitli sinyal yolları ile düzenlenir (71-73). Çekirdekteki bir düzenleyici faktör olan CREB, sinir sistemindeki çoklu hücre içi sinyal yollarının önemli bir üyesidir (74, 75). Hipokampusta CREB sinyalleri, psikotik ve bilişsel davranışların bozulmasında rol oynamaktadır. CREB aktivasyonu için PKA gereklidir. BDNF, beyin disfonksiyonunda en yaygın nörotropik faktör olan CREB'nin temel hedef genlerinden biridir.

## **2.7. Beyin Kaynaklı Nörotrofik Faktör**

Nörotrofin ailesinin bir üyesi olan beyin kökenli nörotrofik faktör, nöronların gelişiminde, büyümesinde ve hayatta kalmasında anahtar proteindir (9, 76). Beyin kaynaklı nörotrofik faktör, hücre çoğalması ve hücre farklılaşması için önemlidir ve merkezi sinir sisteminde (MSS) nöronal ve sinaptik fonksiyon için anahtar düzenleyici konumundadır (77). Ayrıca BDNF, nöronal gelişim, uzun süreli potansiyasyon (LTP), öğrenme ve bellek gibi nöral plastisitenin çeşitli yönlerinde önemli bir rol oynamaktadır (78). Farelerde BDNF geninin mutasyonu veya silinmesi öğrenme, bellek ve LTP'de bir azalmaya sebep olurken, BDNF'in yeniden ifade edilmesi, LTP'yi eski haline getirmiştir (79). BDNF, spesifik hücre yüzey reseptörleri olan tropomiyozin reseptör kinaz B (TrkB) ve p75 nörotrofin reseptörünün aktivasyonu yoluyla işlevini yerine getirir (80). TrkB aktivasyonunun, BDNF'in sağ kalımı teşvik eden fonksiyonları için gerekli olduğu gösterilmiştir (81). BDNF nöronlarda (82) fosfoinositid 3-kinaz (PI3K) / protein kinaz B (AKT) sinyal yolunu aktive eder. Bu yol merkezi sinir

sisteminde yaygın olarak ifade edilir ve hücre sağkalımı, proliferasyonu ve farklılaşmasına aracılık eder. Aynı zamanda öğrenme ve bellek oluşumunda yer alır (83, 84). Hipokampustaki BDNF / TrkB / PI3-K / Akt sinyal yolunun başlatılması, belleği oluşumu için çok önemlidir (85). Şekil 2.4'te görüldüğü gibi BDNF sentezini uyaran birçok yolak mevcuttur.

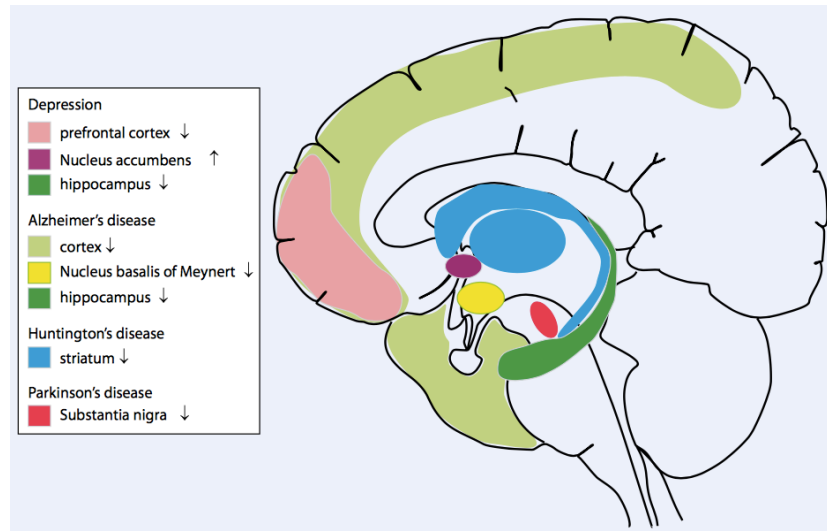


**Şekil 2.4.** BDNF sinyal yolağını uyaran farklı yolaklar ve cAMP/PKA/CREB/BDNF yolağı (86).

Bir protein ailesi olarak, nörotrofik faktörler veya “büyüme faktörleri” doğrudan nöronal ve sinaptik büyümede rol oynar. Özellikle BDNF proteini, kısa vadede bilişsel performans ve uzun vadede beyin morfolojisi konusunda öneme sahiptir (87-89).

## 2.8. Nörodejeneratif Hastalıklarda Beyin Kaynaklı Nörotrofik'ün Rolü

Beyin kaynaklı nörotrofik faktör birçok beyin bölgesindeki sinaptik plastisiteyi düzenler. Plastisitenin ise öğrenme ve bellek için hücresel korelasyonu temsil ettiği düşünülür. Bu yüzden BDNF'nin demansda rol oynadığı düşünülmektedir. Alzheimer hastalarında ölüm ardı BDNF seviyelerinin azaldığı tespit edilmiştir (90, 91) (Şekil 2.5). Bu durumun demans sırasında azalmış beyin aktivitesinin nedeni mi yoksa sonucu mu olduğu kesinleşmemiştir. Beyinde demans ve BDNF içeriği arasında bir korelasyon göstermek için, hastaların kan BDNF düzeyleri ile demans takibinin eş zamanlı olması gerekir. BDNF'nin kan-beyin bariyerini geçebileceğine dair göstergeler vardır (92) ve plazmadaki BDNF'nin yaklaşık % 75'inin beyinden kaynaklandığı gösterilmiştir (93, 94). Her ne kadar T- ve B lenfositleri ve monositler BDNF sentezleyip salgılasalar da, kan BDNF içeriği üzerindeki etkileri azdır (95).



**Şekil 2.5.** Beynin farklı bölgelerinde ki BDNF seviyelerinin şematik gösterimi (7)

Öğrenme ve belleği etkileyen bozukluklarla birlikte kan BDNF seviyesi de değişime uğrar. Bu bağlamda, kan serumundaki BDNF konsantrasyonunun, şizofreni hastalarında düşük olduğu gösterilmiştir (96).



Bu noktada, ileri çalışmalar da kanda düşük BDNF seviyeleri ile Alzheimer hastalığının şiddeti arasında bir korelasyon olduğunu göstermektedir (97). Ek olarak, BDNF seviyelerinin bipolar bozukluklar için prognostik ilişki gösterdiği gösterilmiştir. Avrupa'da popülasyonun yaklaşık %30'u BDNF için heterozigottur. Populasyonun % 5'i ise BDNF geninin tek nükleotid polimorfizmi için homozigottur (98). Bu polimorfizm ile bellek fonksiyonunun azalması, demans, depresyon ve şizofreni ortaya çıkması arasında pozitif bir ilişki olduğunu gösteren bir dizi çalışma yapılmıştır. Ancak, bu noktada böyle bir korelasyon için net bir kanıt yoktur.

Normal beyin fonksiyonlarına katkısına ek olarak, BDNF çeşitli nörolojik hastalıklarda da rol oynamaktadır. Kan akışında veya beyin sıvısında düşük BDNF konsantrasyonu, Alzheimer, Parkinson ve Huntington hastalıklarının prognozu ile ilişkilendirilmiştir (99).

### **2.9. Beyin Kaynaklı Nörotrofik Faktör Seviyesinin Cinsiyete Göre Değişimi**

Merkezi sinir sistemi, kadınlarda erkek memelilere kıyasla aktivite ve gelişme yönünden farklılık göstermektedir (100-102). Bu durum uzun zamandır bilinmesine rağmen, farklılıklara neden olan mekanizma hala net değildir (103). Yine de cinsiyet varyasyonlarının bazıları, çoğunlukla erkek memelilerde testislerde ve kadın memelilerde yumurtalıklarda üretilen farklı gonadal steroidlerin (erkeklerde androjenler ve kadınlarda östrojenler) farklı konsantrasyonlarda olması ile açıklanabilir. Kadın memelilerde üç doğal östrojen, östron, 17  $\beta$ -östradiol ve östriol ve erkek memelilerde testosteron vardır. Bu hormonlar, farklılıkları şekillendirmek üzere beyinde çeşitli mekanizmalar yoluyla etki ederler ve işlevleri kısmen nörotrofinler gibi diğer faktörler/hormonlarla etkileşime dayanır. BDNF'nin terapötik etkisi, uygulama zamanı ve yeri, yaşı ve cinsiyetler dahil olmak üzere birçok faktörden etkilenebilir. Örneğin, Li ve ark. (104), BDNF enjeksiyonunun, erkek sıçanlarda asetik aside bağlı ağrı tepkisini azaltabildiğini göstermiştir. Buna karşılık, dişi fareler kullanıldığında BDNF'nin ağrı azaltıcı etkisi ortadan kalkmıştır. Bu nedenle, araştırma modelinde farklı cinsiyette kobay kullanıldığında, çıkarılan sonuç tamamen farklı olabilir. Bu konuda sınırlı araştırmalar yapıldığı için cinsiyet farklılıklarının BDNF'nin

fizyolojik veya terapötik aktivitesini nasıl etkilediğinin altında yatan mekanizma hala belirsizdir.

Dişiler, menstural döngü, hamilelik ve menapoz sırasında dalgalanan yüksek ve düşük düzeyde dolaşımdaki östrojen seviyelerine sahiptir. BDNF geninin kodlama ekzonunda bir östrojen reseptörüne cevap veren element (ERE) tanımlanmıştır. Bu, BDNF'nin östrojen reseptörlerinin doğrudan transkripsiyonel bir hedefi olduğunu düşündürmektedir (105). Yapılan çalışmalar, dişi sıçanlarda östrojenin seviyesinin azalmasının, kortekste ve hipokampustaki BDNF mRNA seviyelerini önemli ölçüde azaldığını göstermektedir, bu da östrojen takviyesi ile kısmen düzeltilebilir (105-107). Bu koşullar için hipokampal BDNF protein seviyelerinde de benzer değişiklikler tespit edilmiştir (108). Ek olarak, hipokampal BDNF mRNA ve protein seviyesi, dişi sıçanlarda dolaşımdaki östrojen seviyeleriyle ilişkili olan döngü aşamasına bağlı değişimler gösterir (109). BDNF ve östrojen reseptörleri bazı nöronlarda birlikte ifadelendiğinde edildiğinden östrojen, BDNF ekspresyonunu düzenlemek için doğrudan reseptörleri yoluyla etki edebilir (110).

Buna karşılık, erkekler ayrı beyin bölgelerinde aromataz ile lokal olarak östrojene dönüştürülebilir, böylece BDNF ekspresyonunu östrojen bağımlı bir şekilde düzenleyen testostereona sahiptir (111). Östrojen reseptörleri ve aromataz ekspresyonu cinsel olarak dimorfiktir (112), BDNF sinyalinin östrojenle düzenlenmesinin cinsiyete özgü olduğunu göstermektedir. Daha önemlisi, testosteron, östrojen üretiminden bağımsız olarak BDNF sinyalini etkilemek için doğrudan androjen reseptörü yoluyla etki edebilir. Örneğin, yetişkin erkek sıçanlarda testosteronun tükenmesi, BDNF immünoreaktivitesini artırır ve dişilerde östrojen tükenmesi ile gözlenen BDNF ifadesinin azalmasıyla keskin bir tezat oluşturur (107). Gonadal hormonlara ek olarak, cinsiyetin BDNF sinyal yolunu etkilediği olası birçok başka mekanizma vardır. Örneğin, BDNF ekspresyonu stres hormonları tarafından düzenlenir ve hipotalamus-hipofiz-adrenal eksen ve stres hormonu yolundaki iyi bilinen cinsiyet farklılıkları, cinsiyete özgü davranışlar da kesinlikle BDNF sinyalini etkiler. Bu nedenle, BDNF sinyalini tartışırken, cinsiyetin daima dahil olan bir faktör olması gerektiğini söylenebilir (113).

Erkekler ve kadınlar arasında benzer işlevleri yapan nöral sinyaller, bir cinsiyette BDNF'nin daha yüksek ekspresyon veya sinyal kapasitesine ya da genetik veya çevresel bozulmaların zararlı etkilerine karşı koruyucu etkiler sağlayabilir. Alternatif olarak, yüksek BDNF sinyallemesine dayanan nöral sinyaller, normalde yaşlanma ile ortaya çıkan BDNF seviyesindeki düşüşe daha duyarlı olabilir. Her iki durumda da, BDNF ekspresyonu ve beyin fonksiyonları cinsiyet ve yaş, genetik çeşitlilik ve çevresel etkiler gibi diğer faktörler arasındaki çok yönlü etkileşimler tarafından yönetilir. Bu tür etkileşimler, erkekler arasında daha yaygın olan Parkinson hastalığı ve kadınlarda daha yaygın olan duygu durum bozuklukları gibi nöropsikiyatrik hastalıkların bir cinsiyette daha fazla görülmesine katkıda bulunabilir (114-116).

Örneğin, kadınlar AD'de orantısız şekilde daha fazla etkilenmektedir. Kadın AD hastalarında hastalık ilerlemesi de daha hızlıdır ve tedaviye daha az yanıt vardır (117). BDNF sinyallemesinde yaşa bağlı azalma; AD hastalarında şiddetli olduğu gösterilmiştir. Tersine, BDNF ekspresyonu yüksek olan bireyler bilişsel gerileme ve demans gelişimine karşı korunur.

## **2.10. cAMP/PKA/CREB/BDNF yolağı**

1968'de keşfedilen protein kinaz A, cAMP bağımlı protein kinaz olarak bilinir ve dokuda eksprese edilir ve merkezi sinir sisteminde hücre içi sinyal iletimine aracılık eder. Çok sayıda çalışma, PKA'nın nöronal farklılaşma, hayatta kalma, işlev ve plastisitenin yanı sıra uzun süreli öğrenme ve bellek mekanizmaları üzerinde önemli etkileri olduğunu göstermektedir (118, 119). Yapılan hayvan modeli çalışmalarında PKA inhibitörlerinin uzun süreli belleği bozduğu ve PKA'nın uzun süreli belleğin oluşması için kritik öneme sahip olduğu bildirilmiştir (120, 121).

cAMP yanıt elemanı bağlayıcı protein, PKA tarafından Ser133 aminoasidi üzerinde fosforile olur ve bir sonraki sinyal basamağını oluşturur (122). "Bellek anahtarı" olarak bilinen CREB (123), protein kinazlar tarafından fosforilasyondan sonra aktive olan birçok genin promotör bölgelerine bağlanan bir transkripsiyon faktörüdür. CREB hipokampal nörogenesis, nöronal sağkalım ve farklılaşma ve

nöroproteksiyonda kritik roller oynamaktadır (124-126). CREB'in fosforilasyonu (pCREB) / aktivasyonu, uzun dönem bellek konsolidasyonu için önemlidir (127, 128). Ek olarak, pCREB kaskadının aktive olmasının hayvan modellerinde davranışsal görevlerin öğrenilmesini ve belleğin olumlu yönde değiştirdiği gösterilmiştir (120, 129).

Yapılan çalışmalar ile fenilalaninin ve metabolitlerinin toksik etkisinden dolayı beyinde öğrenme ve bellek mekanizmasının bozulduğu bildirilmiş, fakat bu mekanizmanın nasıl olduğu henüz aydınlatılamamıştır (41). Son zamanlarda yapılan çalışmalar ile cAMP/PKA/CREB, hipokampüste BDNF sinyal yolağının öğrenme bellek mekanizması ve bilişsel fonksiyon bozukluklarının patogenezi ile yakından ilişkili olduğu bildirilmiştir (130-132).

Planlanan çalışmada PKU'da bozulan öğrenme bellek mekanizmasının dişi ve erkek gruplarda cAMP/PKA/CREB/BDNF yolağı kullanarak aydınlatılması amaçlanmıştır. Fenilketonürde sıçan modeli oluşturularak, biyokimyasal yönden cAMP/PKA/CREB/BDNF yolağı incelenmesinin yanı sıra hipokampus PKA, CREB, BDNF, asetilkolinesteraz (AChE) ve bütirikolinesteraz (BChE) mRNA ekresyonları araştırıldı. Fenilketonürde PKA sinyal yolağını bileşenlerinin protein ve mRNA ifadenme düzeylerinin cinsiyete göre nasıl etkilediğinde gösterildi (32)

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada PKU oluşturulan yenidoğan sıçanlarda öğrenme bellek mekanizmasının cAMP/PKA/CREB/BDNF yolağı üzerinden araştırılması hedeflendi. Sıçanlarda PKU modeli oluşturmak için fenilalanin hidrosilaz enziminin inhibitörü ile beraber yüksek derişimde fenilalanin kullanıldı. Sıçanlarda deneysel PKU oluşumunu sağlayacak uygulamaların ardından lokomotor aktivite testi, öğrenme belleğı ölçmek için yeni nesne tanıma ve pasif sakınma testi gerçekleştirildi. Tüm bu testlerin ardından sıçanlar sakrifiye edilerek dokuları çıkarıldı ve moleküler analizlerde kullanıldı.

#### 3.1. Sarf Malzemeleri ve Cihazlar

Deneysel fenilketonüri modeli oluşturmak için PAH inhibitörü olarak 4-Cl-Fenilalanin (PCP) (Sigma katalog no: C8655) ve fenilalanin (Sigma katalog no: P2126) kullanılmıştır. Sinyal iletim yolakları analizleri için kullanılan ELISA kitleri Tablo 3.1.'de özetlenmiştir. cDNA sentezi için cDNA kiti (Thermo katalog no: K1622) kullanılmıştır. Hipokampus dokusundan RNA izolasyonu için kullanılan malzemeler Tablo 3.2'de belirtilmiştir. Sıçanlar için tasarlanan gerçek zamanlı polimer zincir reaksiyonu (RT-qPCR) primerleri Tablo 3.3'te özetlenmiştir. Kullanılan cihazların listesi ise Tablo 3.4.'te özetlenmiştir.

**Tablo 3.1.** Biyokimyasal analizler için kullanılan ELISA kitleri

Kitler	Kullanım amacı	Üretici Firma/Katalog numarsı
cAMP	Hipokampusten cAMP seviyesini belirlemek için	YL Biont (YLA0551RA)
PKA	Hipokampusten PKA seviyesini belirlemek için	Thermo Fisher (EIAPKA)
CREP	Hipokampusten CREP seviyesini belirlemek için	Cell Signaling (7390C)
pCREB	Hipokampusten pCREB seviyesini belirlemek için	YL Biont (YLA1374RA)
BDNF	Hipokampusten BDNF seviyesini belirlemek için	R&D systems (DBNT100)
BCA Protein Tayini	Hipokampusten protein seviyesini belirlemek için	Thermo Fisher (23227)

**Tablo 3.2.** RNA izolasyonu için kullanılan malzeme listesi

Malzemeler	Üretici Firma/Katalog numarası
TRIsure reaktifi	Bioline (Bio38033)
• Kloroform	Sigma (288306)
• İzopopanol	Sigma (650447)
•%75 etil alkol	Sigma (100974)
Dietil pirokarbonat ile muamele edilmiş su (DEPC)	Thermo Fisher (750024)
4-Cl-Fenilalanin	Thermo Fisher (c8655)

**Tablo 3.3.** RT-qPCR için tasarlanan primer listesi

Actin	5'-GAGACCTTCAACACCCCAGCC-3'	Forward
Actin	5'-TCGGGGCATCGGAACCGCTCA-3'	Reverse
BDNF	5'-AGCTGAGCGTGTGTGACAGTAT-3'	Forward
BDNF	5'-CCGAACATACGATTGGGTAGTT-3'	Reverse
CREB	5'-CCCAGGGAGGAGCAATACAG-3'	Forward
CREB	5'-GGGAGGACGCCATAACAAC-3'	Reverse
PKA	5'-GCTGGCTTTGATTTACGG-3'	Forward
PKA	5'-GATGT CGCTTGAGGATA-3'	Reverse
AChE	5'-ACACCGTGCCTCCACATTGA-3'	Forward
AChE	5'-TGGAACCTCGGCCTTCCACTG-3'	Reverse
BChE	5'-AGGTGACCAGACACCGGAAG-3'	Forward
BChE	5' -TGCTCCAGCGATGGAATCCT-3'	Reverse
Gus $\beta$ ( $\beta$ -glukuronidaz)	5' -CTCGAACAATCGGTTGCAGG-3'	Forward
Gus $\beta$ ( $\beta$ -glukuronidaz)	5' -GCTTGGTGATGTCAGCCTCA-3'	Reverse

**Tablo 3.4.** Deneyler Sırasında Kullanılan cihazlar

Cihaz Adı	Üretici Firma
Hassas Terazi	Shimadzu-AUX220
V orteks	Nüve-NM110
Distile Su Cihazı	Mp Minipure Basic
Elektrikli battaniye	Kent Scientific
Mikro Plaka Okuyucu	Molecular Devices
Analitik terazisi	Mettler Toledo
pH metre	Consort
Pipetler ve pipet uçları	Gilson
Soğutuculu yüksek hızlı santrifüj	Eppendorf 5417R ve Hanil Supra 21K
Homojenizatör	Ultra-Turrax® (S8N-5g, IKA-Werke GmbH)
RT-qPCR	Qiagen (Bio-Rad cfx96 touch)

### 3.2. Fenilketonüri modeli oluşturulması

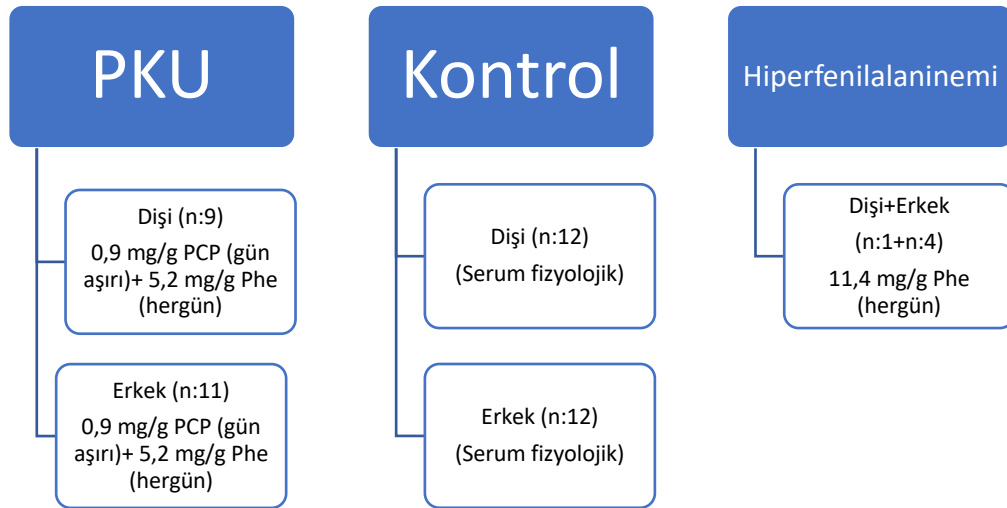
Çalışmamızda, 6 günlük,  $5\pm 2$  gram ağırlıklarında 22 adet dişi ve 27 adet erkek Sprague-Dawley cinsi sıçan kullanıldı. Gebe sıçanlar KOBAY deney hayvanları laboratuvarından temin edilmiş olup doğumdan bir hafta önce deneyin yapılacağı Hacettepe Üniversitesi Nörolojik Bilimler ve Psikiyatri Enstitüsü laboratuvarına getirilerek hayvan odasında yeni ortamlarına alışmaları için beklendi. Gebe sıçanlar 12saat aydınlık/12 saat karanlık döngüsünde tutuldular. Doğum öncesi, sonrası ve deney sırasında su ve yem tüketimi serbest bırakıldı. Uygulamalar aşağıda belirtilen hayvan sayısı ve protokoller çerçevesinde yapıldı. Deney Hayvanları etik kurulu onayı alındıktan sonra deneysel çalışmalar başladı (Etik Kurul Onay: 2018/02-01).

Bu çalışmada deneysel fenilketonüri oluşturmak için fenilalanin ile beraber fenilalanin hidrosilaz enzim inhibitörü olarak 4-Cl-Fenilalanin kullanıldı (133). Çalışma

sırasında bu bileşiklerin stok çözeltileri hazırlanıp farelere enjeksiyon yapmak için kullanıldı.

Stok çözeltilerin hazırlanışı:

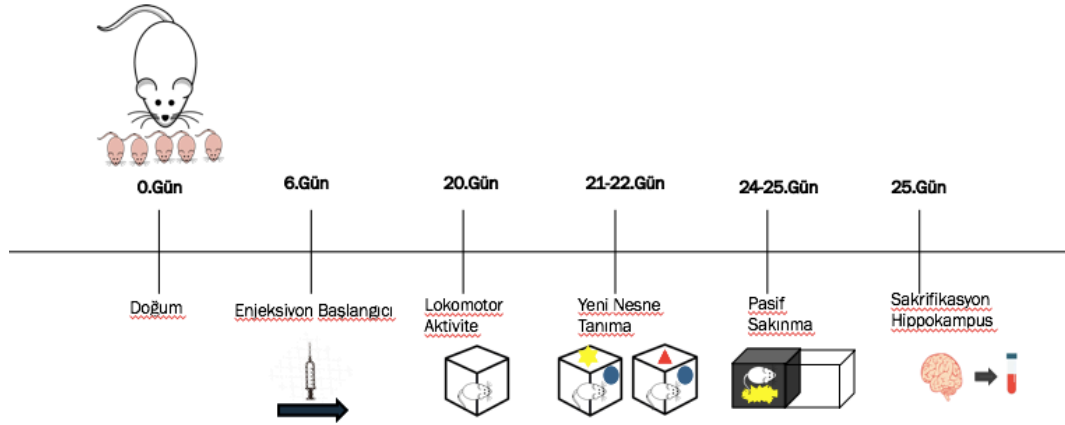
4-Cl-Fenilalanin ve Phe stok çözeltileri, derişimleri sırasıyla 26  $\mu\text{mol/ml}$  ve 152  $\mu\text{mol/ml}$  olacak şekilde % 0,9'luk pH 7.2 serum fizyolojikte ısıtılarak hazırlandı. Sıçan yavrularına PCP 0,9 mg/g, Phe 5.2 mg/g subkutan enjeksiyon ile uygulandı (134, 135). Tüm kimyasallar %0.9'luk pH 7.2 serum fizyolojikte çözüldü. Gruplar şekil 3.1 'de açıklandığı gibi hazırlandı.



**Şekil 3.1.** Deney grupları

Sıçan gruplarına çalışma için gereken karışımlar sabah saat 07:00-09:00 arasında subkutan enjeksiyon ile 20 gün boyunca uygulandı. 20 günlük sıçanlara davranış testleri 2 grup halinde yapıldı ve testler boyunca da enjeksiyona ara verilmedi





**Şekil 3.2.** Yenidoğan sıçanlarda oluşturulan deneysel PKU modeli ve çalışma akışının şematik gösterimi.

	0.gün -5. gün	6.gün -24.gün	25.gün
PKU Grubu	Standart beslenme (Anne sütü)	PCP 0,9 mg/g (gün aşırı) enjeksiyon + Phe 5,2 mg/g (hergün) enjeksiyon	Sakrifikasyon Hipokampus çıkarma ve kan alma
HPE Grubu	Standart beslenme (Anne sütü)	Phe 11,4 mg/g (hergün) enjeksiyon	Sakrifikasyon Hipokampus çıkarma ve kan alma
Kontrol Grubu	Standart beslenme (Anne sütü)	Serum fizyolojik enjeksiyonu	Sakrifikasyon Hipokampus çıkarma ve kan alma

**Şekil 3.3.** Yenidoğan sıçanlarda oluşturulan deneysel PKU modeli ve çalışma sırasında hayvanlara gerçekleştirilen uygulamaların detaylı gösterimi

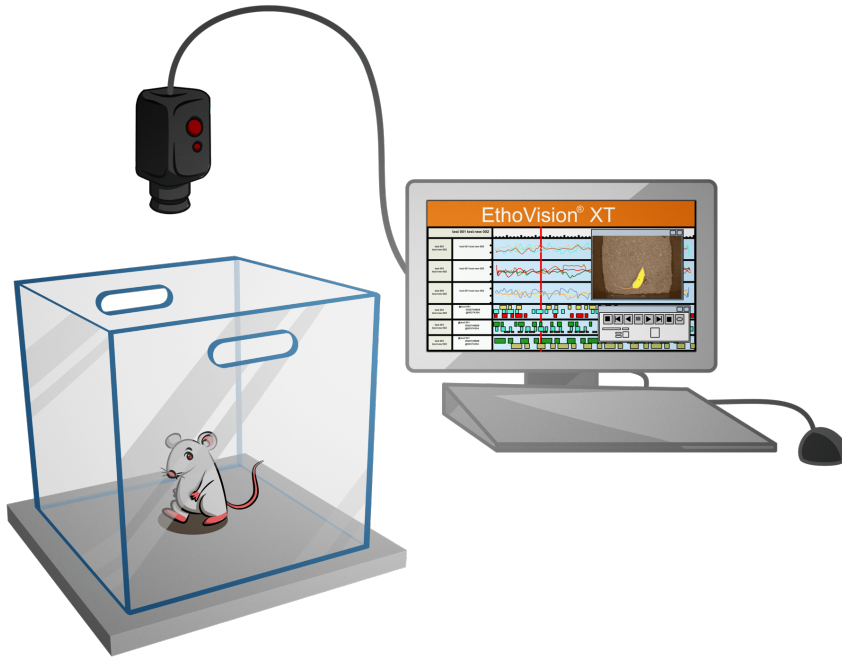
### 3.3. Yeni kontrol grubu

Davranış testlerinden alınan sonuçlar doğrultusunda anneden ayrılma stresinin sonuçları negatif yönde etkileyebileceği (136) ve kontrol grubunun yapılan testlerde beklenildiği gibi öğrenmemiş olduğunu tespit ettik. Bu nedenle yeni bir kontrol grubu eklendi. Yeni kontrol grubu ile tüm davranış testleri aynı şekilde tekrarlandı fakat tüm işlemler boyunca yavru anneden ayrılmadı. Bu nedenle yeni bir grup oluşturularak davranış deneyleri tekrarlandı. Enjeksiyon ve davranış testleri yeni kontrol grubunda yavru anneden ayrılmadan gerçekleştirildi.

Öğrenme ve belleği değerlendirmek için davranış testleri kaydedildi. Bu kayıt sistemi için ise; Ethovision XT 8.0 sistemi kullanıldı.

### 3.4. Lokomotor Aktivite testi

Lokomotor Aktivite testi, hayvanların motor fonksiyonu ile ilişkilendirilebilen lokomotor ve davranışsal aktivite seviyelerini kapsamlı bir şekilde değerlendirmek için kullanılır. Test ayrıca kaygı benzeri davranışları değerlendirmek için yaygın olarak kullanılmaktadır (137). Bu çalışmada da lokomotor aktivite testi hayvanların teker teker içine yerleştirildiği özel kafesler içinde gerçekleştirildi. Bu kafeslerin boyutları 40cm\*40cm\*40cm idi ve kafes içinde gerçekleştirilen lokomotor aktiviteler 10 dakika süreyle kayıt altına alındı. Deney hayvanının kafesin içinde gerçekleştirmiş olduğu yatay yöndeki hareketleri bir bilgisayar programı aracılığıyla otomatik olarak hesaplanıp kaydedildi (138). Davranış testleri tüm deney gruplarında enjeksiyon uygulamasından sonra yapıldı. Testler deney gruplarında Şekil 3.3.'te belirtildiği gibi gerçekleştirildi.



**Şekil 3.4.** Lokomotor aktivite testi kurulumunun şematik gösterimi (139)

### 3.5. Yeni nesne tanıma testi

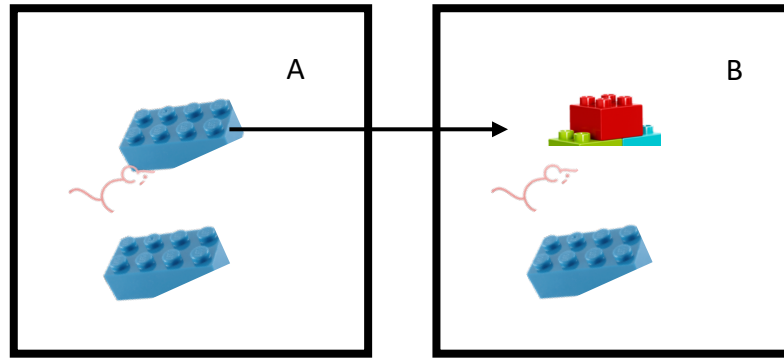
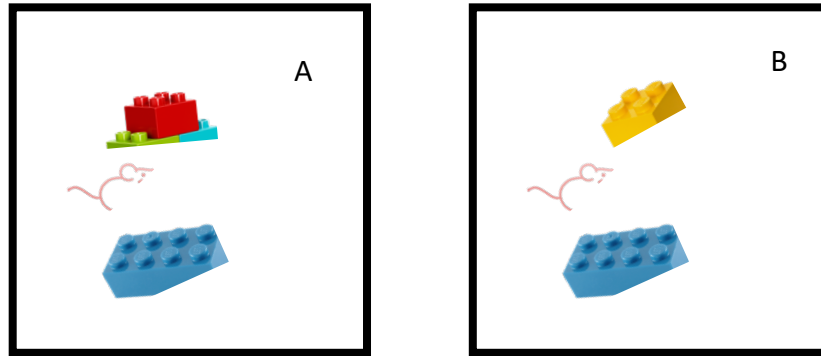
Fare ve sıçanlara uygulanan bir bellek testidir. Bu testte, kemirgenlerin buldukları ortamda genellikle yeni nesnelere tercih etme özelliklerinden faydalanılmaktadır (140). Bu deney için 40x40x40 cm boyutlarında kenarları koyu renk ve üstü açık bir düzeneğe kullanılmıştır. Eğitim fazında düzeneğin arka sağ ve sol köşelerine birbirinin tamamen aynısı olan iki nesne (lego oyuncak) konulmuştur (Şekil 3.5 A). Ardından sıçan sırtı nesnelere dönük biçimde düzeneğin köşesine yerleştirilmiş ve hayvanın burada 10 dakika zaman geçirmesi sağlanmıştır. Bu süre zarfında sıçanın hareketleri ve nesnelere etkileşimi videoya kaydedilmiştir.

Test fazı, eğitim fazından bir saat sonra gerçekleştirilmiştir. Bir saat sonra nesnelere bir tanesi değiştirilerek sıçan 5 dakika süreyle tekrar düzeneğe yerleştirilmiştir (Şekil 3.5. B). Bu sürede yine video kaydı yapılarak sıçanın yeni nesneyi incelemek için harcadığı zamanın nesnelere ile geçirdiği toplam süreye oranı hesaplanmıştır. Normal durumda sıçanın yeni nesneyi incelemek için daha fazla zaman geçirmesi beklenmekteyken, bellek bozukluğu olması durumunda yeni nesneye ilgi azalmakta ve bu nesne ile geçirilen zaman da kısalmaktadır. Ayrıcılık indeksi yeni nesne ilgilenme zamanının toplam nesnelere ile ilgilenme zamanına bölümü ile hesaplanmıştır.

Literatürde bu teste 24 saat sonra yapılan ikinci bir faz eklenerek uzun süreli belleğin değerlendirilmesi hedeflenmiştir. Bu ikinci fazda, ertesi gün nesnelere birisi tekrar değiştirilmiştir. Bu yepyeni bir başka nesne ile sıçanlar yine 5 dakika (Şekil 3.6 B) süreyle düzeneğe yerleştirilmiş ve video kaydı ile yeni nesne ile zaman geçirme süresi belirlenmiştir. Video kayıtlarının incelenmesi sonucu PKU ve kontrol grubu hayvanlarına ait verileri elde edilmiş, değerler analiz edilerek karşılaştırılmıştır.

**Tablo 3.5.** Yeni nesne tanıma testi

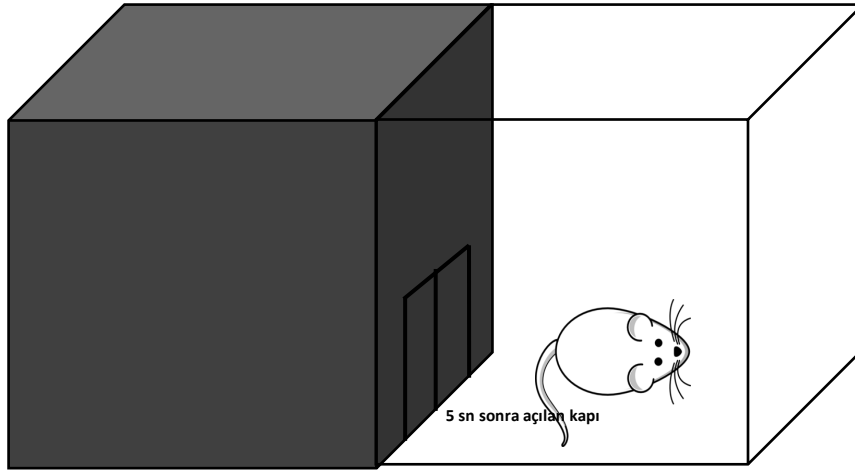
Yeni nesne tanıma testi		
1.gün	1.gün (1 saat sonra)	2.gün (24 saat sonra)
Birbirinin aynı 2 nesne 10 dk kare kutuda kayıt	Son testten 1 saat sonra 1 eski nesne ve 1 yeni nesne konularak 5 dk kayıt	1 eski nesne ve 1 diğer yepyeni nesne konularak 5 dk kayıt

**Şekil 3.5.** Yeni nesne tanıma testi; 10 dk süreyle iki aynı nesne ile temas A) 1 saat sonra ikinci bir nesne ile 5 dk temas**Şekil 3.6.** Yeni nesne tanıma testi; bir eski bir yeni nesne ile 5dk temas A) 24 saat sonra bir eski bir yep yeni nesne ile 5dk temas B)

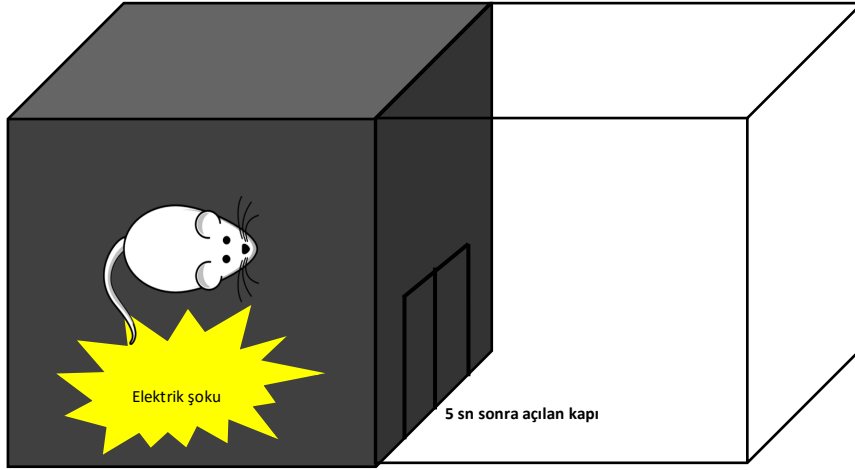
### 3.6. Pasif Sakınma Testi

Pasif sakınma testinde hayvanlar ufak bir kapı aralığı ile birbirinden ayrılmış karanlık ve aydınlık bölümleri olan bir kutuya aydınlık bölüm tarafından bırakılır (Şekil 3.7). Aradaki kapı başlangıçta kapalı tutulur. Hayvan aydınlık bölüme konulduktan 5 saniye sonra kapı otomatik olarak açılır. Hayvana aydınlık taraftan karanlık tarafa geçtiğinde kapı kapanır ve 2 sn süreli 0,9 miliamper şiddetinde elektrik şoku uygulanır (Şekil 3.8). Hayvan şoku aldığı karanlık bölüme 15 sn daha tutulur ve böylece elektrik şoku aldığı ortamı öğrenmesi sağlanır. 15 saniyenin ardından hayvan kafesine geri konulur. Karanlık bölüme hiç geçmeyen hayvanlar 5 dakikanın ardından kafesine alınır. Bu aşama öğrenme aşamasıdır, bunu takiben kısa ve uzun süreli belleğin değerlendirilmesi için deney 6 ve 24 saat sonra elektrik verilmeksizin test tekrarlanır.

Hayvanın karanlık bölüme geçip geçmediği ve geçtiyse kaç saniye sonra geçtiği (gecikmesi) kaydedilir. Hayvanın karanlık bölüme geçmesi öğrenme veya bellekte sorun olduğu şeklinde yorumlanmaktadır.



**Şekil 3.7.** Pasif sakınma testi 1. gün (Aydınlık alana hayvan bırakılır)



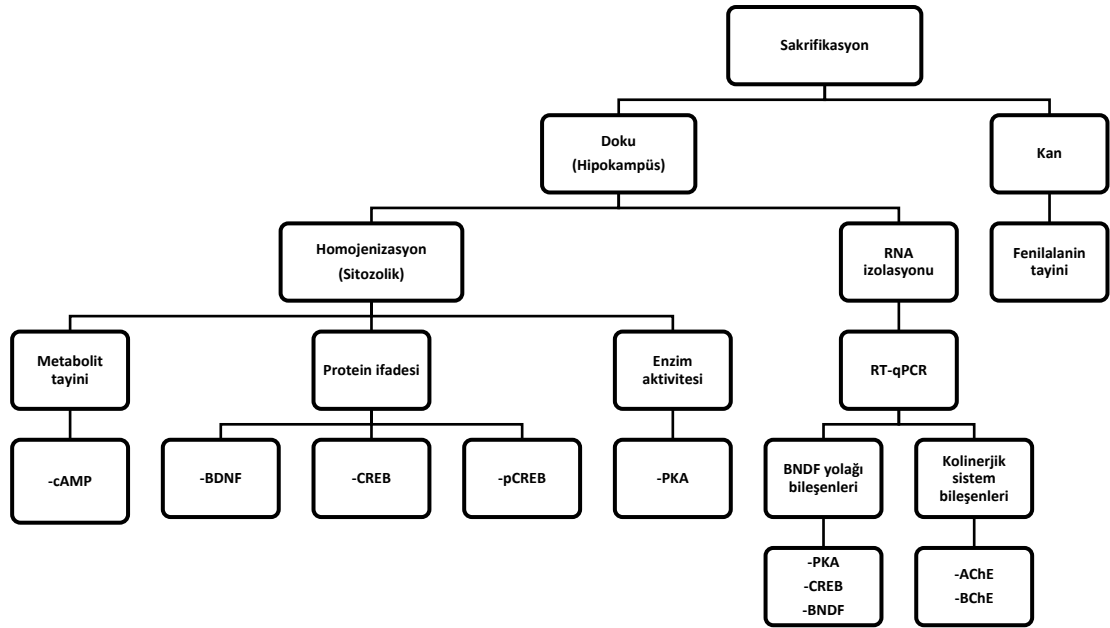
**Şekil 3.8.** Pasif sakınma testi 1. gün (Karanlık alana hayvan geçer ve elektrik şoku uygulanır)

**Tablo 3.6.** Pasif sakınma testi

Pasif Sakınma		
1.gün	1.gün (6 saat sonra)	2.gün (24 saat sonra)
<p>Sıçan aydınlık bölme konulur, 5 sn sonra kapı açılır ve karanlık bölme geçer.</p> <p>Karanlık bölmede 2sn 0,9 mA elektrik şoku uygulanır.</p> <p>15 sn sonrasında kafesine alınır.</p> <p>(karanlık bölme geçmeyen sıçanlar 5dk sonra kafesine alınırlar)</p>	<p>Sıçan aydınlık bölme konulur, 5 sn sonra kapı açılır.</p> <p>Karanlık bölme kaç saniyede geçtiği belirlenir</p> <p>(karanlık bölme geçmeyen sıçanlar 5dk sonra kafesine alınır)</p>	<p>Sıçan aydınlık bölme konulur, 5 sn sonra kapı açılır.</p> <p>Karanlık bölme kaç saniyede geçtiği belirlenir.</p> <p>(karanlık bölme geçmeyen sıçanlar 5dk sonra kafesine alınır)</p>

### 3.7. Deney şeması

Sakrifikasyondan sonra elde edilen kan ve doku örnekleri ile yapılan analizler Şekil 3.9 da özetlenmiştir.



Şekil 3.9. Kan ve doku örnekleri ile yapılan analizler

### 3.8. Biyokimyasal Analizler İçin Örnek Hazırlanışı

#### 3.8.1 Serum Fenilalanin seviyeleri

Fenilketonüri ve hiperfenilalaninemi modelini doğrulamak için, sıçanlar sakrifiye edildikten sonra kandan 3000 rpm'de 5 dk EDTA içeren tüplere alınıp santrifüjlendi. Plazma kısımları tüplere ayrıldıktan HPLC cihazı (Shimadzu DGU-20 A<sub>3</sub>) ile fenilalanin seviyeleri ölçüldü.

### 3.8.2. Sakrifikasyon ile hayvanlardan örnek eldesi

Davranış testleri tamamlandıktan sonra sıçanlara Ketamin/Ksilazin (90/10 mg/kg) subkutan enjeksiyon ile verilerek anestezi edildi. Sakrifikasyon giyotin makas ile yapıldı. EDTA içeren biyokimya tüplerine tüm hayvanların kanları toplanarak santrifüj edildi ve plazma kısımları daha sonra kullanılmak üzere -80°C'de saklandı. Beyin hızlıca çıkarılarak hipokampus dokuları alındı. Bir sıçandan çıkan hippocampusun yarısı protein analizleri için ayrıldı. Diğer yarısı da RNA geciktirici çözelti içerisinde RT-qPCR için ayrıldı. Örnekler etiketlenip analiz edilene dek -80°C'ta saklandı.

### 3.9. Gerçek zamanlı Kantitatif PCR ile Gen Ekspresyon Analizleri

#### 3.9.1. RNA izolasyonu

Doku ya da hücrelerin parçalama çözeltisinde parçalanıp, fenol yardımıyla total RNA'nın ekstrakte edilmesi prensibine dayanan protokol, ilk kez Chomczynski ve Sacchi tarafından 1987'de tanımlanmıştır (141). Sonraki yıllarda bu protokol, süspansiyon ya da tek tabakada çoğaltılmış kültür hücrelerinden, dokulardan ve bitkilerden yapılacak izolasyonlarda kullanılmak üzere kısaltılmış ya da modifiye edilmiştir. Fenol ve guanadinium izotiyosiyanatın monofazik bir çözeltisi olan Trizol, doku ve/veya hücrelerden RNA izolasyonunda kullanılmakta, biyolojik materyali çözünür hale getirmekte ve proteinleri denatüre etmektedir. Solubilizasyon sonrası eklenen kloroform faz seperasyonu sağlayarak sulu fazdan RNA ekstrakte edilebilmektedir.

İzolasyon basamakları;

#### 1. Homojenizasyon:

Moleküler analizlerde kullanılacak RNA eldesi için, RNA geciktirici içerisinde muhafaza edilen 5 adet kontrol dişi, 4 adet kontrol erkek, 4 adet PKU dişi ve erkekten elde edilen hipokampus örnekleri steril ependorflar (nükleaz içermeyen eppendorf) içerisine alınıp 500 µl guanidin izotiyosiyanat (Trizol® Reagent, Invitrogen/Life Technologies, Cat. No. 155961) eklenerek Ultra-Turrax® (S8N-5g, IKA-Werke GmbH) cihazı ile buz üzerinde 10 saniye homojenize edilip buzda 3 dk bekletildi.



## 2. Faz ayrımı:

Homojenizasyondan sonra 100µl kloroform eklendi ve 15 saniye boyunca elle iyice çalkalandı. Örnekler oda sıcaklığında 3-5 dakika inkübe edildikten sonra 4 °C'de 15 dakika 12,000 x g'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üç faz elde edildi ve RNA içeren üst faz (sulu faz) başka bir tüpe dikkatlice alındı.

## 3. RNA çöktürmesi:

RNA'nın çökmesi için tüplere 250 µl soğuk izopropil alkol ilave edildi. Tüpler oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edilerek + 4 ° C'de 20 dakika 12,000 x g'de santrifüj edildi.

## 4. Yıkama:

Santrifüj sonrası süpernatant atıldı, pelletler bir kez 500 µl %75 etanol ile yıkandı. Ardından 4 ° C'de 5 dakika 7500 x g'de santrifüjlendi.

## 5. RNA çözünürlüğü:

Santrifüj sonrası süpernatant atıldı ve tüplere, RNAaz içermeyen 10 µl su eklenerek RNA'ların çözünmesi sağlandı. RNA içeren tüpler buza aktarıldı ve NanoDrop2000'de RNA konsantrasyonunu ölçüldü.

$A_{260}/A_{280}$  oranı  $\geq 1,7$  olan örneklerde RNA saflığı yüksek kabul edilip cDNA (komplementer DNA) sentezinde kullanıldı.

### 3.9.2. cDNA (komplementer- tamamlayıcı DNA) Sentezi

İzole edilen total RNA'dan ticari cDNA sentez kiti kullanılarak cDNA sentezi gerçekleştirildi (Thermo katalog no: K1622). Steril RNAz içermeyen 0,5 ml eppendorf tüplere 10 µg/ml total RNA, 1 µl oligo (dT)18 primer konulup nükleaz içermeyen su ile hacim toplamda 12 µl'ye tamamlandı. Karışım 3–5 saniye 13,000g'de santrifüj edilip termal cyler cihazda 65°C'de 5 dakika reaksiyona bırakıldı. Süre sonunda karışım buz içerisinde soğutulup, santrifüj edildi ve tüpün dibinde toplanması sağlandı. Tüpün üzerine 5x reaksiyon tampon çözeltisi, ribolock ribonükleaz inhibitörü (20 U/µl) ve 10 µl dNTP karışımı konulup karıştırıldı. Ardından 10 saniye santrifüj edilerek ve termal cyler cihazında 25°C'de 5 dakika tutuldu. Tüplere 1 µl revertAid m-multi-v reverse transkriptaz ilave edildi. Termal cyler cihazında 42°C'de 60 dakika süre ile RNA'lar cDNA'ya dönüştürüldü. cDNA sentezinin tamamlanması için tüpler 70°C'de 5

15 dakika inkübe edildikten sonra PCR metodu için kullanımına hazır hale getirildi ve örnekler kullanılıncaya kadar -20 °C’de muhafaza edildi.

cDNA sentezi için kullanılan karışım çözeltileri aşağıdaki Tablo 3.7 ve Tablo 3.8.'de gösterilmiştir.

**Tablo 3.7.** cDNA sentezi için kullanılan çözeltiler (Karışım 1)

cDNA Protokolü	1. örnek için (µl)	32 örnek için (µl)
Kalıp RNA (10 µg/ml)	10 µl	32 µl
Oligo (dT)18 primer	1 µl	32 µl
Nükleaz içermeyen su	10 µl	320 µl
Toplam hacim (ul)	12 µl	352 µl

**Tablo 3.8.** cDNA sentezi için kullanılan çözeltiler (Karışım 2)

cDNA	1 µl	
5X reaksiyon tamponu	4 µl	128 µl
RiboLock RNase Inhibitor (20 U/µL)	1 µl	32 µl
10 mM dNTP Mix	2 µl	64 µl
RevertAid M-MuLV RT (200 U/µL)	1 µl	32 µl
	8 µl	-

### 3.9.3. Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real-Time qPCR)

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) yöntemi, genetik materyaller (DNA ve RNA) üzerinde seçilmiş bir bölgenin, in vitro şartlar altında ilgili gen bölgelerine spesifik oligonükleotid primerler ve Taq polimeraz enzimi kullanılarak bir otomatik termal cyler cihazında çoğaltılması yöntemidir. PCR reaksiyonu temel olarak üç basamaktan oluşur. Birinci reaksiyon denatürasyon (DNA çift zincirinin açılması), ikincisi primerlerin spesifik oldukları gen bölgesine yapışması (annealing) ve üçüncüsü ise zincir uzaması (extention)’dır. Spesifik olmayan yapışmaları engellemek için döngü sayısı genellikle 30–40 olacak şekilde sınırlandırılır. Gerçek zamanlı PCR (kantitatif PCR) sisteminde normal PCR yönteminden farklı olarak floresan bir boya kullanılır.

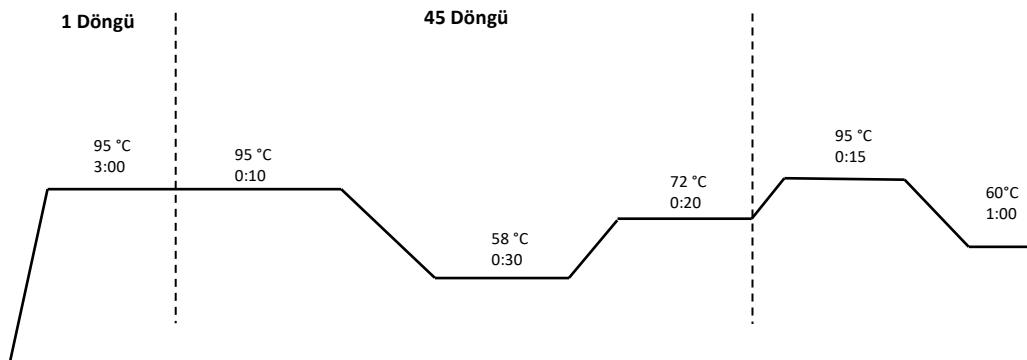
Syber Green (Fermentas, Germany) boyası çift iplikçikli DNA parçasına bağlanarak elektrik uyarısı ile birlikte floresan ışımaya yapar. Bu ışımaya sistemin lazer dedektörü tarafından alınarak bilgisayar ortamında grafik formatına çevrilir. Ölçülen floresans şiddeti PCR ürününün miktarı ile doğru orantılıdır.

BDNF, PKA ve CREB, AKtin, AChE, BChE ve Gus  $\beta$  için kullanılan spesifik primer dizileri National Center for Biotechnology Information (NCBI) web sitesinin primer tasarlama bölümü kullanılarak tasarlandı. Bu dizilerin çalışmada kullanılması için reaksiyonda 100 ng olacak şekilde sentezlettiler.

Bu genlerin ekspresyon seviyeleri Real Time-qPCR sistemi kullanılarak tespit edildi. Amplifikasyon işleminden sonra elde edilen amplifikasyon eğrilerine ait kopya eşiği (Ct) değerleri karşılaştırılarak, hedef genlerin mRNA transkripsiyon düzeylerinin göreceli değişimleri  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  metodu ile hesaplandı (142). Daha sonra gruplar arasındaki farklar  $\Delta\Delta Ct$  değişimler cinsinden verildi.

$\Delta\Delta Ct = (Ct \text{ hedef gen} - Ct \text{ house keeping gen}) \text{ denek grubu} - (Ct \text{ hedef gen} - Ct \text{ house keeping gen}) \text{ kontrol grubu}$

PCR analizi için ortamın final hacmi 20  $\mu\text{L}$  olacak şekilde, 0.2  $\mu\text{M}$  primer, 10  $\mu\text{L}$  SYBR green, 1  $\mu\text{L}$  cDNA ve 8,6  $\mu\text{L}$  nükleaz yoksun su ortamında gerçekleştirildi. PCR döngüsü 95 ° C'de 3 dakika süreyle ilk denatürasyon adımından sonra 95° C'de 10 sn, 58° C'de 30 sn ve 72 ° C'de 20 sn ile 45 döngü gerçekleştirildi.



**Şekil 3.10.** RT-qPCR döngü şeması

PCR reaksiyonu için kantitasyonu sağlamak amacı ile bir iç kontrol geni eklenerek analizler sayısal hale getirildi. Çalışmada bu amaçla aktin geni ve GusB genleri kontrol (house-keeping gen) olarak kullanıldı.

Her örnek için kontrol gen olarak kabul edilen Aktin geni ve Gus  $\beta$  geni (house-keeping gen) düzeltme için kullanılarak transkripsiyon seviyesi istenilen genlerdeki transkripsiyon seviyeleri hesaplanarak kaydedildi. Syber Green çift iplikcikli DNA'ya bağlanmasıyla indüklenen floresans şiddeti ölçüldü.

### **3.10. Hipokampus homojenizasyonu**

Hipokampusler homojenizasyon öncesi tartıldı. Doku homojenizasyonu için yapılacak biyokimyasal analizlere uygun tampon hazırlandı.

Tampon içeriği;

Doku homojenizasyonu: Dokular % 10 (w/v) ağırlık/hacim olacak şekilde içinde nihai olarak proteaz inhibitörü bulunduran 2 mM EDTA, % 0,5 Triton X-100 içeren 50 mM Tris pH 7,4 tamponu ile buz üzerinde 3 x 10 saniye Ultra-Turrax<sup>®</sup> (S8N-5g, IKA-Werke GmbH) cihazı ile homojenize edildi. Tüm işlemler protein yıkımını önlemek için buz üzerinde yapıldı. Kullanılan çözeltiler de buz üzerinde tutuldu. Homojenatlar +4°C sıcaklıkta 13.000g'de 15 dakika santrifüjlendi. Santrifüj sonrası üstte kalan sıvı (süpernatant) alınarak protein incelemelerinde kullanılmaya dek -80°C'ta tutuldu.

#### **3.10.1. Protein tayini**

BCA deneyi (143), bisikoninik asit (BCA) kullanılarak protein alkalın çözeltilerinde Biuret kompleksi tarafından  $Cu^{2+}$  'dan  $Cu^+$  oluşumunu ölçer. (144). Homojenize edilen hipokampus örneklerinin protein tayini BCA kiti ile gerçekleştirilmiştir.

#### **3.10.2. Hippokampal BDNF, pCREB, CREB, cAMP, PKA seviyesinin ELISA temelli yöntemler ile belirlenmesi**

ELISA, sofistike veya pahalı ekipmana gerek olmadan bir analitin saptanması ve kantitatif veya kalitatif analizi için kullanılan hassas ve spesifik bir analitik biyokimya yöntemidir (145-147). Analit, spesifik bir protein ya da birden fazla proteinin (bir biyomoleküler kompleks) karışımı olabilir.

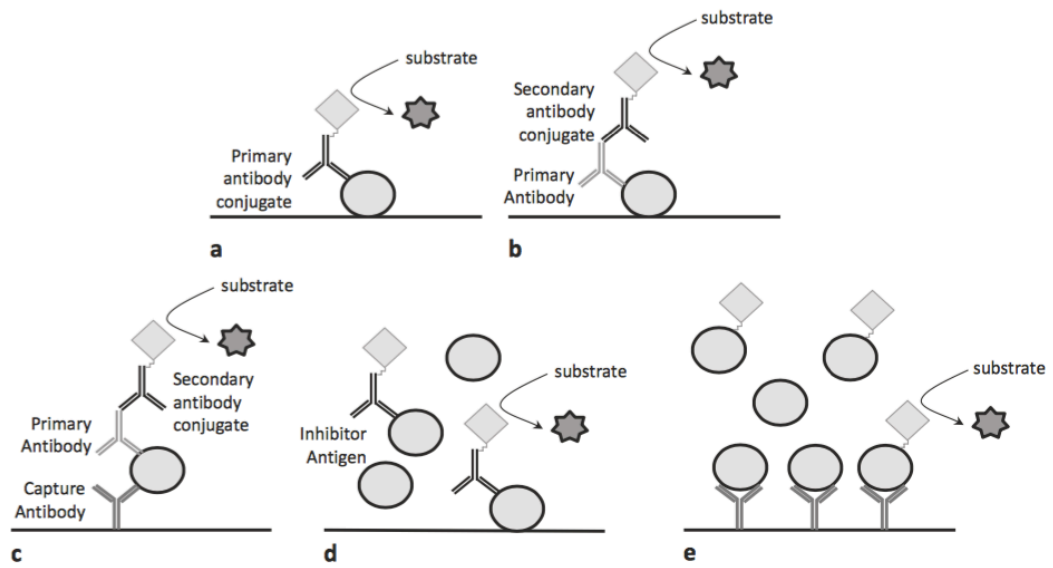
Bir metodoloji olarak ELISA, monoklonal veya poliklonal antijene özgü antikorların kullanımına dayanan bir yöntemdir (Radyoimmünoanaliz tekniklerinin geliştirilmesi bir dönüm noktası olmuştur. Bu teknikle, tespit antikorları, radyoaktiviteyi ölçerek bir proteini ölçmenin dolaylı bir yolunu sağlayan radyoizotoplar ile etiketlenebilir). Alternatif olarak dolaylı kantifikasyon, uygun substrat kullanımı ile üretilen sinyalin, biyolojik enzimlere kimyasal olarak bağlı antikorlarla ölçülmesi suretiyle gerçekleştirilebilir. Benzer şekilde, flüoresan etiket teknolojisi (bir etiket veya prob olarak da bilinen bir lüminesans biçimi), flüoresan kuantum verimlerini ölçerek proteinin dolaylı olarak ölçülmesini sağlar. Genel olarak, ELISA düşük nanogram skalasına kadar tespit / ölçüm limiti (LOD / LOQ) ile iyi bir hassasiyete sahiptir (148, 149).

İlgilenilen antijenin sabitlenebilmesi biçiminde değişen iki temel yöntem vardır. Doğrudan kaplama yaklaşımında antijen genellikle pH > 9 olan bir karbonat / bikarbonat tamponunda seyreltilir ve pasif adsorpsiyonla doğrudan bir mikrotitre plakasının kuyucuklarının iç yüzeyine tutturulur (Şekil 3.11. a, b). Kuyulara adsorbe edilen antijene özgü bir antikor olan Sandwich ELISA yaklaşımı olarak da bilinen yakalamada veya dolaylı kaplamada, antijen numunesi ile inkübasyondan sonra ilgili antijeni hareketsiz hale getirir (Şekil 3.11.c). Bu yaklaşım daha hassastır ve saptanacak antijen küçük miktarlarda olduğunda veya fizikokimyasal özellikleri kuyucuklara yeterli şekilde yapışmasına izin vermediğinde veya numuneler birden fazla protein içerdiğinde yaygın olarak kullanılır. Bu yaklaşımla, sadece ilgili antijen bu antijene spesifik antikora bağlanır.

Kompetitif ELISA olarak adlandırılan daha karmaşık bir ELISA biçimi vardır. Kompetitif ELISA'nın ayırt edici özelliği, referans / standart analitin bilinmeyen bir miktarda aynı analitin (bilinmeyen örnekten tanıtılarak) kombinasyonunun sınırlı sayıda antikor bağlanma bölgesine bağlanma için rekabet etmesidir. Kompetitif ELISA deneyi, analit veya katı faza emilen antikor ile gerçekleştirilebilir. Bu formatın ilk varyasyonunda (Şekil 3.11. d) ilave edilen numune analiti, sınırlı miktarda etiketli antikora bağlanmak için katı faz tarafından emilen referans / standart analit ile rekabet etmektedir. Bu formatın ikinci varyasyonunda (Şekil 3.11. e), çözeltideki

etiketli referans / standart analit, bilinmeyen numune analiti ile birleştirilir ve her ikisi de sınırlı miktarda katı faz tarafından emilen antikora bağlanmak için rekabet eder (150).

Homojenize edilen hipokampus örneklerinden cAMP, CREB, pCREB ve BDNF miktar tayinlerinde (protein ekspresyon analizi) ile Protein kinaz A enzim aktivitesi için ise aktive tayin yöntemi olarak farklı ELİSA yöntemleri kullanılmıştır.



**Şekil 3.11.** ELISA metodu; Direk ELISA a), İndirek ELİSA b), Sandviç ELİSA c), Kompetetif ELISA işaretli antikor ile d), Kompetetif ELISA işaretli antijen ile (150)

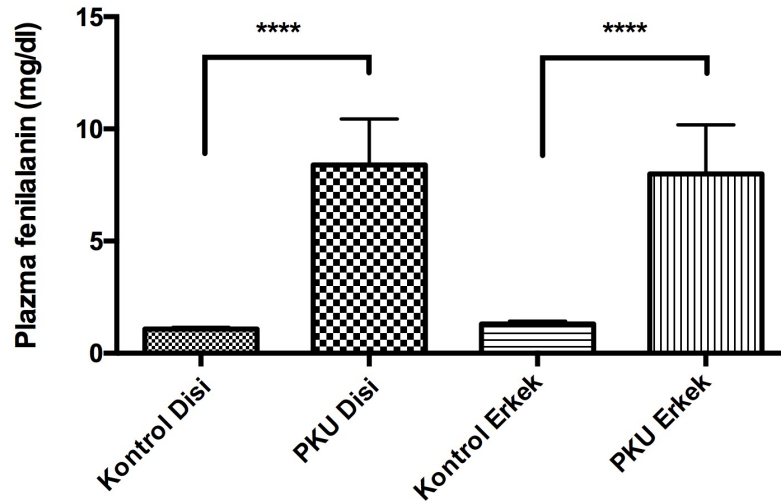
### 3.11. Verilerin analizi

Bulgular ortalama  $\pm$  SEM (standard error of mean) şeklinde rapor edilmiştir. Lokomotor aktivite, yeni nesne tanıma, pasif sakınma, biyokimyasal analizler ve RT-qPCR verilerinin istatistiksel değerlendirmesi için Mann-Whitney-U testi kullanılmıştır. İstatistik analiz ve grafik çizimlerinde Prism 7.0 kullanılmıştır. Prism 7.0 programı kullanılarak analizlerden önce verilerin normal dağılıma uygunlukları ve normalite testleri gerçekleştirilmiştir.

## 4. BULGULAR

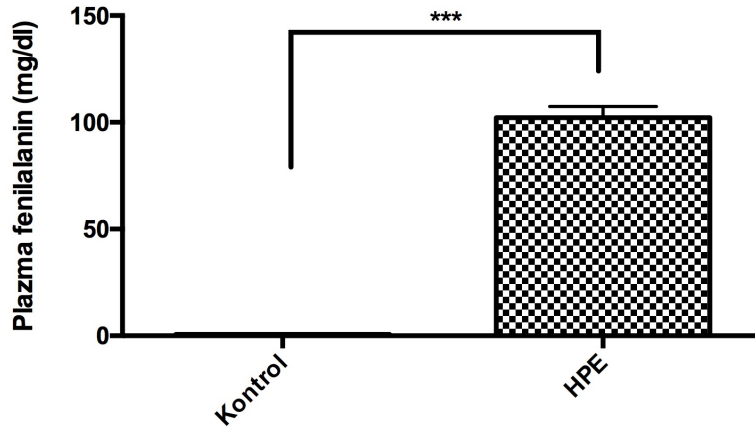
### 4.1. Deneysel PKU modelinin plazma fenilalanin miktarı saptanarak doğrulanması

Fenilketonüri, hiperfenilalaninemi ve kontrol grupları oluşturuldu, plazma Phe düzeyleri ölçüldü. Şekil 4.1., PKU ve kontrol grubu sıçanların Şekil 4.2.' de hiperfenilalanemi grubu sıçanların deneyin bitiminden sonraki plazma fenilalanin seviyelerini göstermektedir. PKU oluşturulan dişi ve erkek sıçanlar (\*\*\*\*p =0,0001), ile kontrol grubu erkek ve dişi sıçanların plazma fenilalanin seviyesi sırasıyla 7,73 ve 6,10 kat artış istatistiksel olarak bulunmuştur.



**Şekil 4.1.** Plazma Phe seviyeleri. Kontrol grubu dişi sıçanlar ile PKU grubu dişi sıçanlar karşılaştırıldığında (\*\*\*\* p =0,0001); Kontrol grubu erkek sıçanlar ile PKU grubu erkek sıçanlar karşılaştırıldığında (\*\*\*\* p =0,0001).

Hiperfenilalanemi grubu sıçanlar ile kontrol grubu arasında plazma Phe seviyesinde 140,5 kat artış istatistiksel olarak artmıştır (Şekil 4.2. \*\*\*p=0,002).

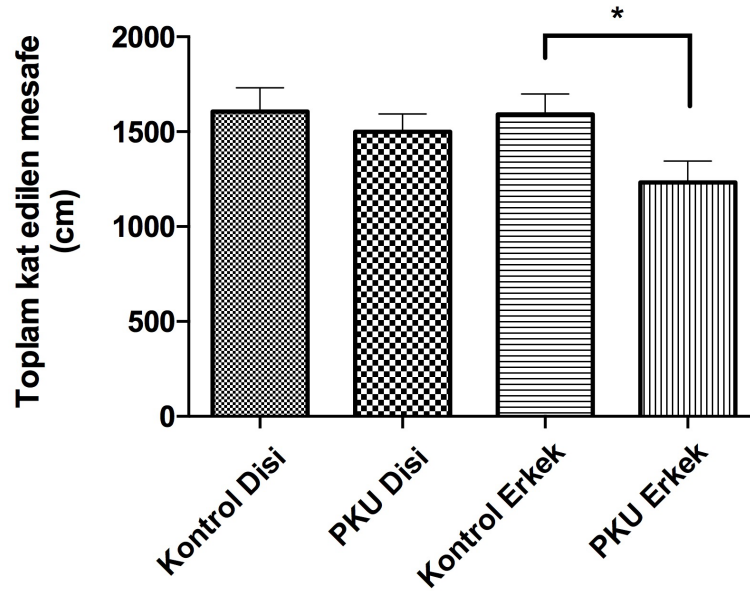


**Şekil 4.2.** HPE grubun plazma Phe seviyeleri. Kontrol grubu sıçanlar ile HPE grubu sıçanlar karşılaştırıldığında (\*\*\*)  $p=0,0002$ )

#### 4.2. Lokomotor Aktivite testi sonuçları

Fenilketonüride lokomotor aktivite testine sonuçlarına göre, 10 dakika içerisinde kontrol grubu dişilerin toplam kat ettikleri mesafe 1605,8 cm iken, PKU dişileri 1499.1 cm yol almışlardır. Aynı koşullar altında kontrol grubu erkeklerinin kat ettikleri toplam mesafe 1591,1 cm iken PKU erkeklerinde bu değer 1232,8 cm olarak bulunmuştur. Kontrol grubu ile PKU grubu dişi sıçanlar arasında 0,93 kat azalmıştır fakat istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. Kontrol grubu ile PKU grubu erkek sıçanlar arasında 0,77 kat azalmıştır ve istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur (Şekil 4.3.). Dişi sıçanlarda PKU vs kontrol grubu sıçanlar ile karşılaştırıldığında  $p=0,6334$ ; Erkek sıçanlarda PKU vs kontrol grubu sıçanlar ile karşılaştırıldığında  $*p=0,0156$ ).

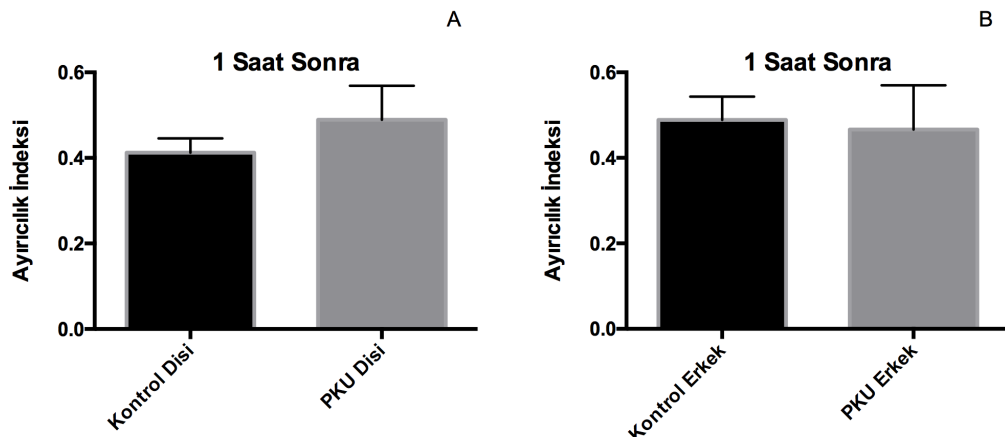




**Şekil 4.3.** Lokomotor aktivite testinde kat edilen mesafe; Dişi sıçanlarda PKU grubu ile kontrol grubu sıçanlar ile karşılaştırıldığında, ( $p=0,6334$ ); Erkek sıçanlarda PKU vs kontrol grubu sıçanlar ile karşılaştırıldığında (\*  $p=0,015$ ).

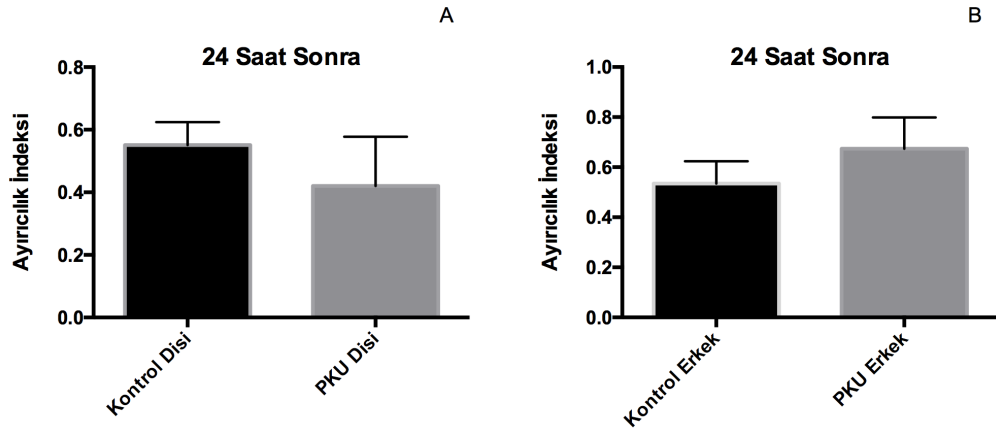
#### 4.3. Yeni nesne tanıma testi

Öğrenmeden bir saat sonra gerçekleştirilen test ile PKU erkek ve dişi sıçanların kontrol grubu erkek ve dişi sıçanlara göre yeni nesne ile geçirdikleri süre kaydedildi. Her iki grupta ayrıcalık indeksinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi (Şekil 4.4. PKU dişi  $p=0,2974$ , PKU erkek  $p=0,2429$ ).



**Şekil 4.4.** PKU dişi sıçan (A), PKU erkek sıçan (B) 1 saat sonra gerçekleştirilen yeni nesne tanıma testi erkek ve dişi sıçanlara ayrıcalık indeksi.

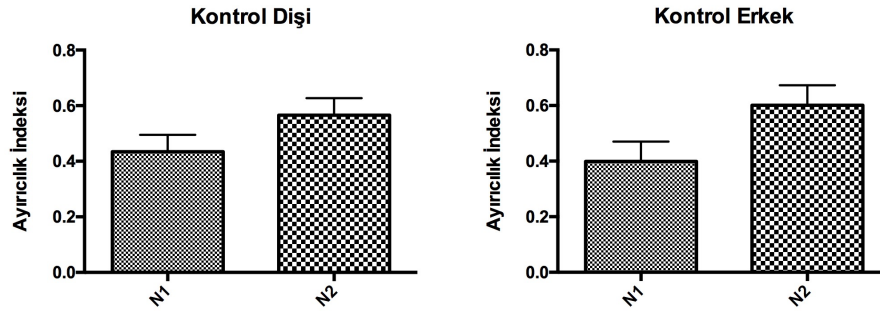
24 saat sonra yeni nesne tanıma testi tekrarlandı. Bu sefer nesnelere biri alınarak yerine bambaşka renk ve şekilde bir nesne yerleştirildi. Sıçan 5 dk boyunca tekrar nesnelere ile yüzleştirildi ve gözlemler kayıt edildi. 24 saat sonra gerçekleştirilen test sonucunda PKU erkek ve dişi sıçanların kontrol grubu erkek ve dişi sıçanlara göre yeni nesne ile geçirdikleri zamanda anlamlı bir azalma olmadığı sonucuna ulaşıldı (Şekil 4.5. PKU dişi  $p=0,1918$ , PKU erkek  $p=0,1634$ ).



**Şekil 4.5.** PKU dişi sıçan (A), PKU erkek sıçan (B) 1 saat sonra gerçekleştirilen yeni nesne tanıma testi erkek ve dişi sıçanlarda ayırcılık indeksi.

Yeni nesne testinde aldığımız sonuçlara göre PKU grubunun yeni nesne ile kontrol grubuna göre daha fazla ilgilendiği tespit edildi. Bu sonuçlar doğrultusunda yeni kontrol grubu eklenerek anneden ayrılma stresi elimine edildi. Yeni kontrol grubuna ait veriler ile PKU grubu verileri karşılaştırıldığında ise sonuç değişmedi. Bu çalışma sonucunda da PKU grubunun yeni nesne ile kontrollere benzer oranda ilgilendiği gözlenmiş oldu. Sıçanların sağ (N1 tarafı) ve sol (N2 tarafı) taraftan birine daha fazla yönelmiş olabileceği düşüncesiyle 1.gün kayıtları tekrar analiz edildi. Yeni analiz sonucu kontrol grubunun deney kutuna koyduğumuzda dişi sıçanların yeni nesnenin konulduğu tarafa %43 (N1), erkek sıçanların ise %40 (N1) yönelme eğiliminde olduğu saptandı (Şekil 4.6.).

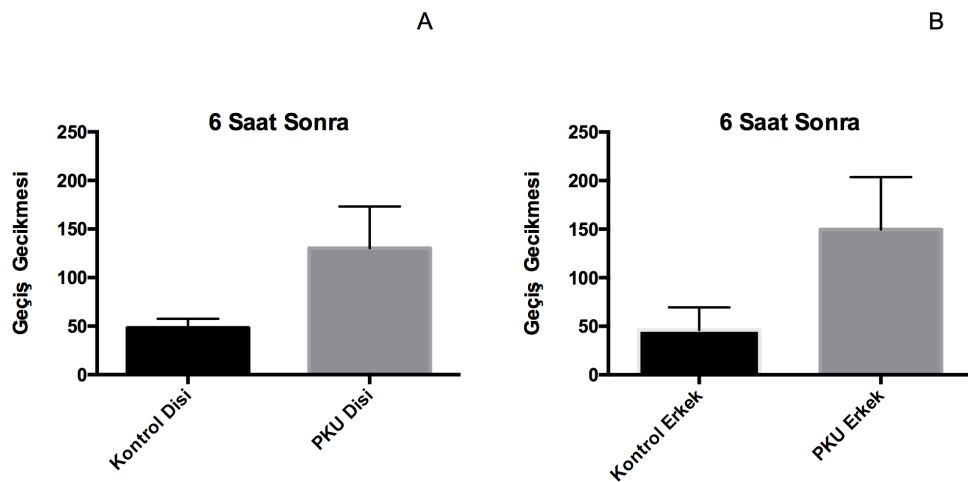
Yeni nesne tanıma sonuçlarını bu eğilimi göz önüne alarak sağ tarafa geçirdikleri süre ve sol tarafta geçirdikleri süre sırasıyla dişilerde 0,43 ve 0,57, erkeklerde 0,40 ve 0,60 kat sayıları ile tekrar çarpılarak tekrar hesaplandı. Yeni hesaplama ile ettiğimizde elde edilen sonuçlar kontrol grubu öğrenmesinde bozulma olmadığını gösterdi.



**Şekil 4.6.** Kontrol grubu sıçanların iki aynı nesne ile karşılaştıklarında hangi tarafı tercih ettikleri. (N1 yeni nesnenin koyulduğu taraf)

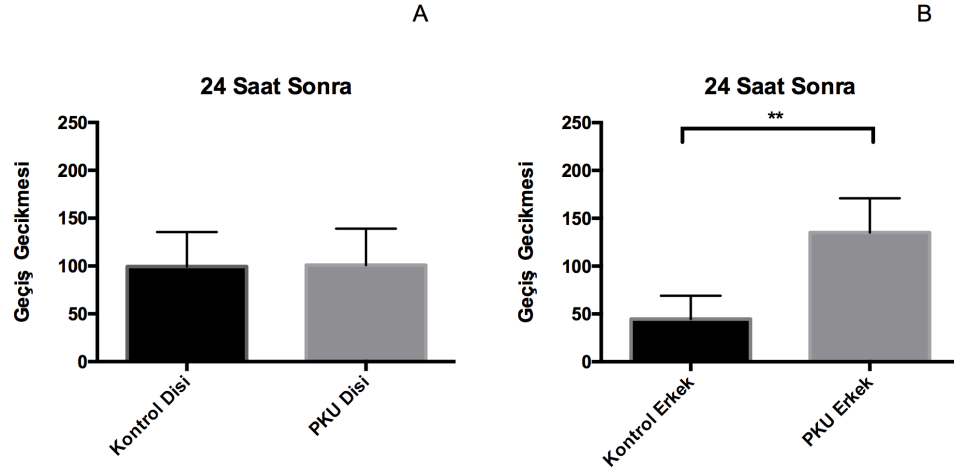
#### 4.4.Pasif sakınma testi

6 saat sonra gerçekleştirilen test ile PKU dişi ve erkek sıçanların, kontrol grubu dişi ve erkek sıçanlara göre geçiş gecikmelerinde azalma olmadığı sonucuna ulaşıldı (Şekil 4.7. 6 saat sonra PKU dişi  $p=0,1307$ , PKU erkek  $p=0,1463$ ).



**Şekil 4.7.** PKU dişi sıçan (A), PKU erkek sıçan (B) 6 saat sonra gerçekleştirilen pasif sakınma testi dişi ve erkek sıçanlarda geçiş gecikmesi.

24 saat sonra gerçekleştirilen test ile PKU dişi ve erkek sıçanların kontrol grubu dişi ve erkek sıçanlara göre geçiş gecikmelerinin daha fazla artma olduğu sonucuna ulaşıldı (Şekil 4.8. 24 saat sonra PKU dişi  $p=0,4261$ , PKU erkek  $p=0,0089$ ).

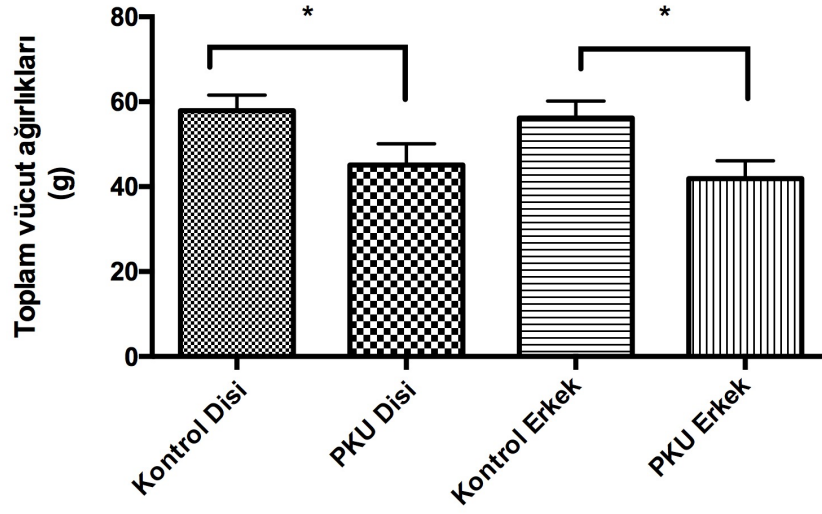


**Şekil 4.8.** PKU dişi sıçan (A), PKU erkek sıçan (B) 24 saat sonra gerçekleştirilen pasif sakınma testi dişi ve erkek sıçanlarda geçiş gecikmesi.

Ancak her erkek grupta da PKU'lu sıçanların kontrol grubu sıçanlara göre geçiş gecikmesi daha geç oldu, bunun erkek sıçanlarda gözlenen lokomotor aktivitedeki azalmayla ilişkili olabileceği düşünüldü. Yani az hareket ettikleri için başlangıçta kondukları aydırlık bölmeden çıkmadılar.

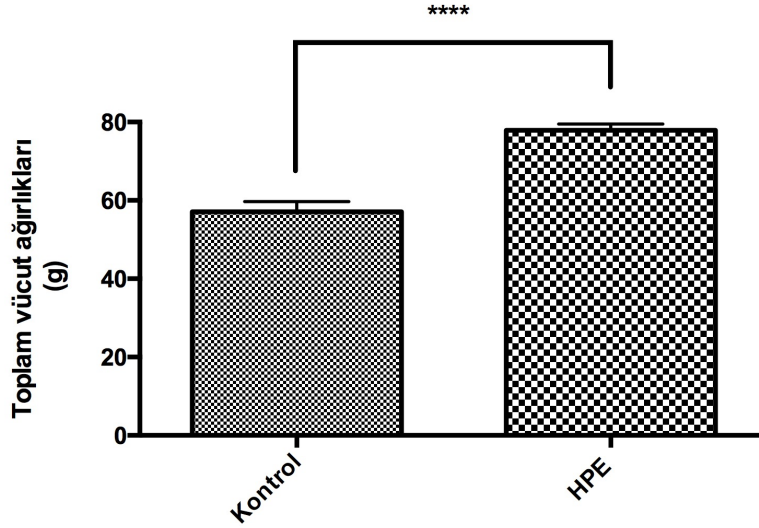
#### 4.5. Toplam vücut ağırlık değişiklikleri

PKU dişi ve erkek grup ile kontrol dişi ve erkek gruplarının toplam vücut ağırlıkları sakrifikasyon öncesi tartılarak belirlenmiştir. PKU'lu grup ve kontrol grubu karşılaştırıldığında dişi ve erkek grupta da sırasıyla 0,78 ve 0,75 kat istatistiksel olarak anlamlı bir kilo kaybı tespit edilmiştir (Şekil 4.9. PKU dişi, kontrol grubu dişi sıçan ile karşılaştırıldığında  $**p=0,0079$ ; PKU erkek, kontrol grubu erkek sıçan ile karşılaştırıldığında  $**p=0,0017$ ).



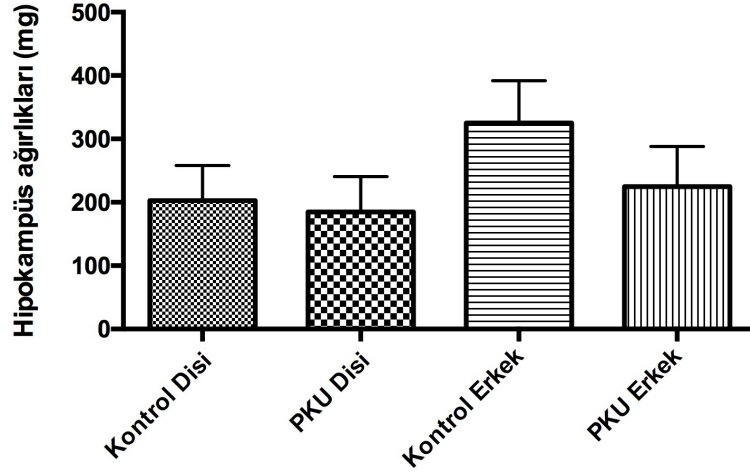
**Şekil 4.9.** PKU ve kontrol grubu toplam vücut ağırlığı değişimleri

Hiperfenilalanime ve kontrol grubu deney süresince tartılmış ve kilo artışları not edilmiştir. Şekil 4.10.'da görüldüğü gibi HPE grubunun kilo artışının kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek olduğu gösterilmiştir (Şekil 4.9. \*\*\*\*p=0,0001).



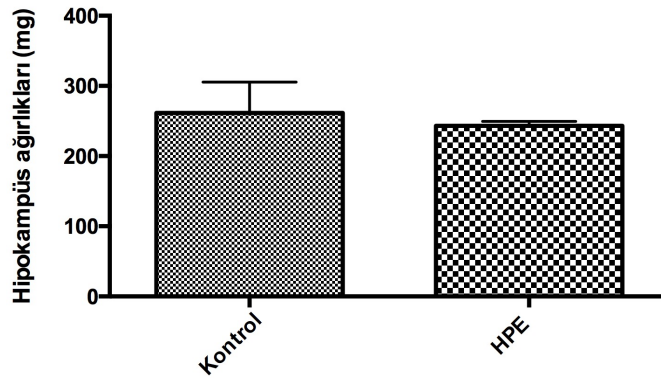
**Şekil 4.10.** HPE ve kontrol grubu toplam vücut ağırlığı değişimleri

PKU dişi ve erkek grup ile kontrol dişi ve erkek gruplarının hipokampus dokuları biyokimyasal analiz öncesi tartılarak karşılaştırılması yapılmıştır. Şekil 4.11 'de gösterildiği gibi PKU dişi ve erkek grupların kontrol grubuna göre kıyaslandığından hipokampus ağırlıklarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır.



**Şekil 4.11.** PKU ve kontrol grubu hipokampus ağırlıkları değişimi

HPE grup ile kontrol grubu hipokampus dokuları biyokimyasal analiz öncesi tartılarak karşılaştırılması yapılmıştır. Şekil 4.12 'de gösterildiği gibi HPE grubunun kontrol grubuna göre hipokampus ağırlıklarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır.



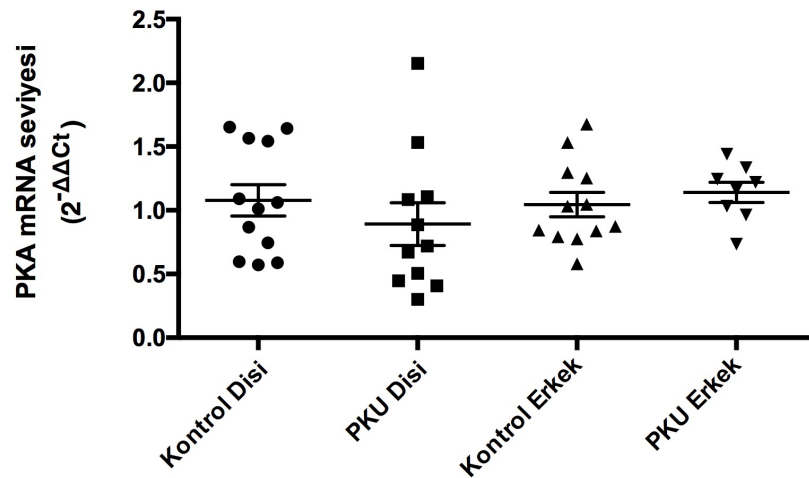
**Şekil 4.12.** HPE ve kontrol grubu hipokampus ağırlıkları değişimi

#### 4.6.Hipokampuste PKA, CREB ve BDNF mRNA Transkripsiyon Düzeyleri

Real time PCR 1  $\mu$ L cDNA kullanılarak gerçekleştirildi. Spesifik genlere ait RT-PCR sonuçları Aktin ekspresyonu kullanılarak normalize edildi ve mRNA miktarları olarak ifade edildi. Veriler ortalama  $\pm$  S.E.M. yöntemi ile hesaplandı.

##### 4.6.1. Hipokampus Protein Kinaz A mRNA ifadesinin Real Time PCR ile analizi

Hipokampal PKA ekspresyonu incelendiğinde, deneysel PKU grubu dişi ve erkek sıçanların kontrol grubu dişi ve erkek sıçanlara göre PKA mRNA ekspresyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir (Şekil 4.13. PKU dişi  $p=0,2318$  A); PKU erkek  $p=0,4845$ ). Her iki grupta da mRNA ifadeleri aynı seviyelerde saptanmıştır.

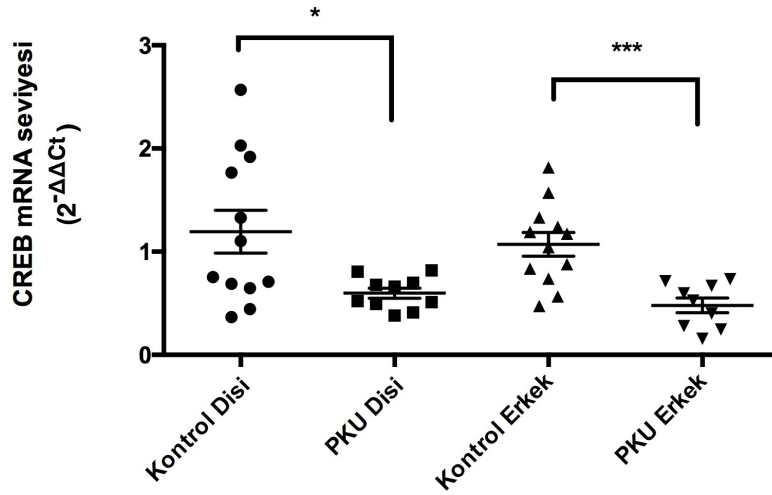


**Şekil 4.13.** Hipokampal PKA m-RNA ekspresyonunun kontrol ve deneysel PKU olan sıçanlar arasında cinsiyete göre karşılaştırılmaları. Değerler aktin ifadesine göre normalize edilmiştir. Dişi  $p=0,2318$ , erkek  $p=0,4845$ .

##### 4.6.2. Hipokampus CREB m-RNA ifadesinin Real Time PCR ile analizi

Hipokampal CREB mRNA ifadesi hem kontrol grubu hayvanlarda hem de deneysel PKU oluşturulan hayvanlarda RT-PCR yöntemi ile incelenmiş ve kontrol geni olarak aktin ifadesine göre elde edilen değerler normalize edilmiştir. PKU dişi ve

erkek sıçanların kontrol grubu dişi ve erkek sıçanlara göre CREB mRNA ekspresyonunda sırasıyla 0,50 ve 0,45 kat azalarak istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmiştir (Şekil 4.14. PKU dişi \*p=0,0499 A); PKU erkek \*\*\*p =0,0007). Bu molekülün ifadesi cinsiyetten bağımsız olarak PKU grubunda azalmış olarak bulunmuştur.

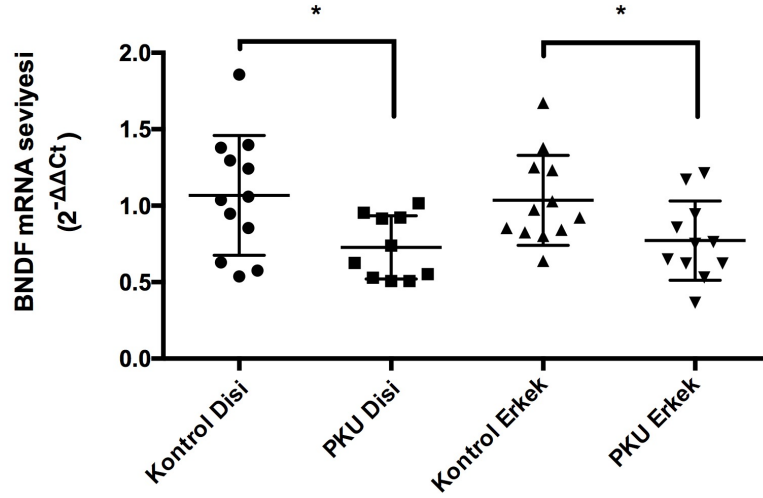


**Şekil 4.14.** Hipokampal CREB mRNA ekspresyonunun kontrol ve deneysel PKU oluşturulan sıçanlarda cinsiyete göre karşılaştırılmaları. Değerler aktin ifadesine göre normalize edilmiştir. Her iki cinsiyette de PKU grubunun daha düşük CREB ifadesine sahip olduğu gözlenmektedir. Dişi \*p=0,0499, PKU erkek \*\*\*p =0,0007.

#### 4.6.3. Hipokampus BDNF mRNA ifadesinin Real Time PCR ile analizi

Hipokampal BDNF mRNA ifadesi hem kontrol grubu hayvanlarda hem de deneysel PKU oluşturulan hayvanlarda RT-PCR yöntemi ile incelenmiş ve kontrol geni olarak aktin ifadesine göre elde edilen değerler normalize edilmiştir. Deneysel PKU grubu dişi ve erkek sıçanların kontrol grubu dişi ve erkek sıçanlara göre BDNF, mRNA ekspresyonu seviyeleri sırasıyla 0,68 ve 0,75 kat azalarak arasında istatistiksel anlamlı bir fark gözlenmemiştir (Şekil 4.15. PKU dişi \*p=0,0265 A); PKU erkek \*p =0,0260). Ancak bu molekülün ifadesi cinsiyetten bağımsız olarak PKU grubunda azalmış olarak bulunmuştur



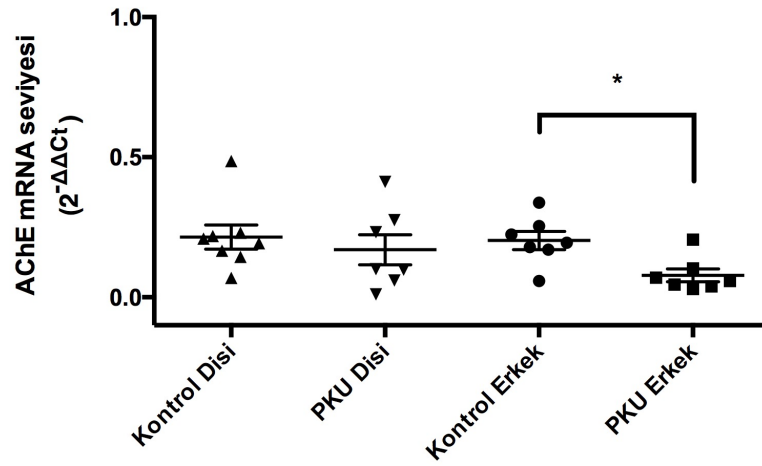


**Şekil 4.15.** Hipokampal BDNF mRNA ekspresyonunun kontrol ve deneysel PKU oluşturulan sıçanlarda cinsiyete göre karşılaştırılmaları. Değerler aktin ifadesine göre normalize edilmiştir. Her iki cinsiyette de PKU grubunun daha düşük CREB ifadesine sahip olduğu gözlenmektedir. Dişi \*p=0,0265, PKU erkek \*p =0,0260.

#### 4.7.Hipokampusta AChE ve BChE mRNA Transkripsiyon Düzeyleri

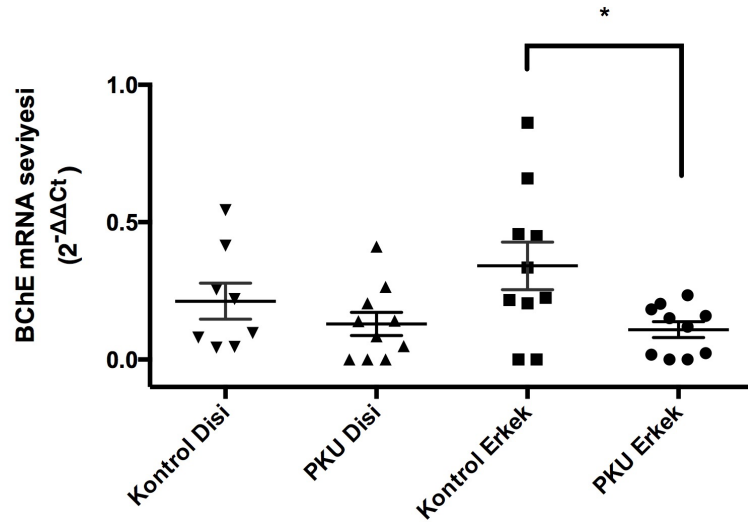
Asetilkolin hipokampusta öğrenme ve bellek gelişimini destekleyen önemli bir nörotransmitterdir (151). Bu nedenle hipokampustan izole edilen RNA'lardan elde edilen cDNA'lar ile asetilkolin hidrolizinden sorumlu kolinerjik sistem bileşenlerinden asetilkolinesteraz (AChE) ve butirikolinesteraz (BChE) mRNA ekspresyonu RT-PCR ile belirlendi. Sonuçlar kontrol geni olarak Gus β ekspresyonuna göre normalize edildi ve mRNA miktarları olarak ifade edildi. Veriler ortalama  $\pm$  S.E.M.  $\Delta\Delta$ Ct yöntemi ile hesaplandı.

Hipokampal asetilkolinesteraz mRNA ifadeleri incelendiğinde deneysel PKU grubu sıçanların erkek sıçanların kontrol grubu erkek sıçanlara göre AChE mRNA ekspresyonundan 0,79 kat azalarak istatistiksel anlamlı bir fark gözlenmiştir (Şekil 4.16. AChE mRNA seviyesi PKU dişi p=0,2965, PKU erkek p\* =0,0131,



**Şekil 4.16.** Hipokampal AChE mRNA ekspresyonunun kontrol ve deneysel PKU oluşturulan sıçanlarda cinsiyete göre karşılaştırılmaları. Değerler GUSB ifadesine göre normalize edilmiştir. AChE ifadesinin özellikle PKU erkek grubunda belirgin olarak daha düşük ifadeye sahip olduğu gözlenmektedir. Dişi  $p=0,2965$ , PKU erkek  $*p=0,0131$ .

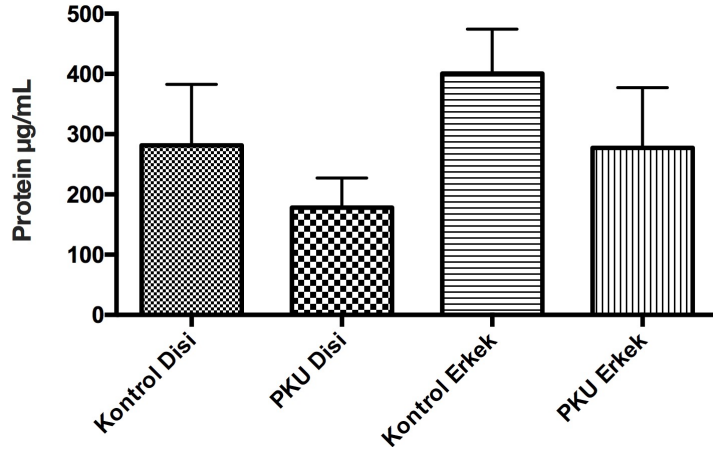
Hipokampal butirilkolinesteraz mRNA ifadeleri incelendiğinde deneysel PKU grubu sıçanların erkek sıçanların kontrol grubu erkek sıçanlara göre BChE mRNA ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmiştir. Özellikle PKU grubuna dahil olan erkek sıçanlarda BChE mRNA ifadesi 1,64 kat azalarak çarpıcı bir düşüş gözlemlenmektedir. Dişilerde ise BChE mRNA seviyeleri arasında gruplar arası anlamlı bir fark bulunamamıştır. (Şekil 4.17. BChE mRNA ekspresyon seviyesi PKU dişi  $p=0,1794$  A); PKU erkek  $*p=0,0134$ ) 0,75 kat azalarak



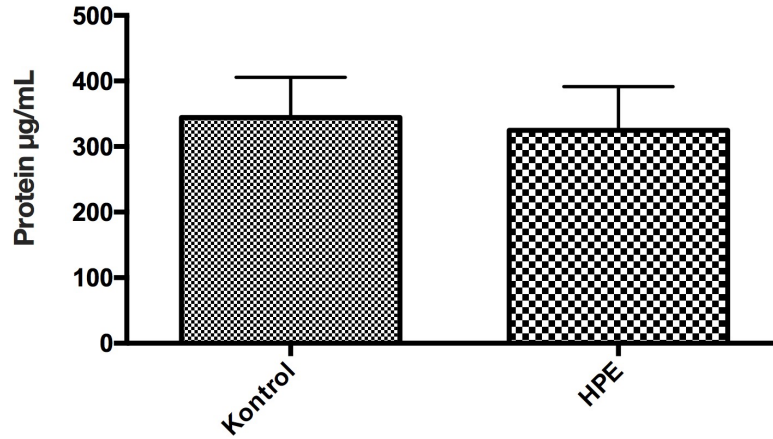
**Şekil 4.17.** Hipokampal BChE mRNA ekspresyonunun kontrol ve deneysel PKU oluşturulan sıçanlarda cinsiyete göre karşılaştırılmaları. Değerler GUSB ifadesine göre normalize edilmiştir. BChE ifadesinin özellikle PKU erkek grubunda belirgin olarak daha düşük ifadeye sahip olduğu gözlenmektedir. Dişi p=0,1794 PKU erkek \*p =0,0134

#### 4.8. Hipokampuste protein seviyesinin BCA yöntemi ile kantitatif analizi

Hipokampal protein miktarları hem kontrol grubu hayvanlarda hem de deneysel PKU oluşturulan hayvanlarda BCA yöntemi ile incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara hiçbir deneysel grup arasında protein miktarları açısından anlamlı bir fark gözlenmemiştir. PKU (Şekil 4.18.) ve HPE (Şekil 4.19.)



**Şekil 4.18.** Hipokampal protein miktarlarının kontrol ve deneysel PKU oluşturulan sıçanlarda cinsiyete göre karşılaştırılmaları. Değerler kantitatif BCA yöntemi ile tayin edilmiştir. Analiz sonucu protein seviyelerinde PKU grubunda bir azalma eğilimi olsa da istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı gözlemlenmiştir.



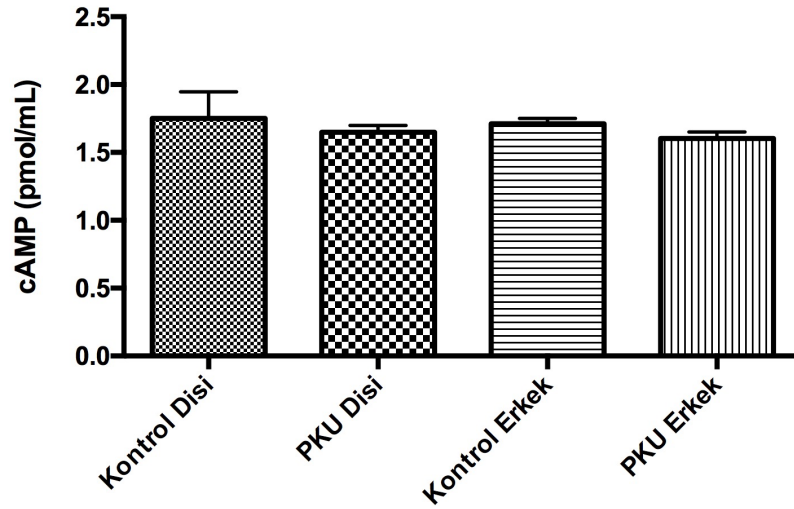
**Şekil 4.19.** Hipokampal protein miktarlarının kontrol ve deneysel hiperfenilalaninemi oluşturulan sıçanlarda cinsiyete göre karşılaştırılmaları. Değerler kantitatif BCA yöntemi ile tayin edilmiştir. Analiz sonucu tüm gruplarda sabit ve aynı miktarlarda protein olduğu ve cinsiyetin bu değerler üzerine bir etkisi olmadığı gözlemlenmiştir.

#### 4.9. Hipokampusta PKA yolu protein bileşenlerinin ELISA yöntemi ile kantitatif analizi

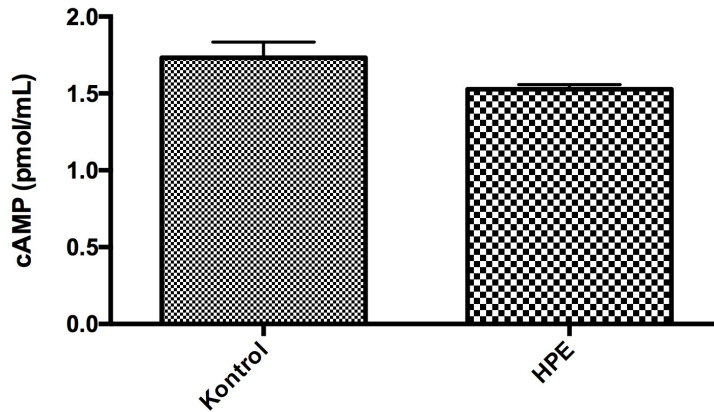
Real time PCR yöntemi ile mRNA ifadeleri belirlenen PKA, CREB, BDNF molekülleri ve bunlara ek olarak cAMP ve fosforile CREB molekülleri de ELISA yöntemi ile incelenerek sayısal değerler elde edildi.

#### 4.9.1. Hipokampus cAMP miktarının ELISA yöntemi ile belirlenmesi

Hipokampal cAMP miktarları hem kontrol grubu hayvanlarda hem de deneysel PKU oluşturulan hayvanlarda ELISA yöntemi ile incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre deney grupları arasında cAMP miktarları açısından anlamlı bir fark gözlenmemiştir. PKU (Şekil 4.20.) ve HPE (Şekil 4.21.).



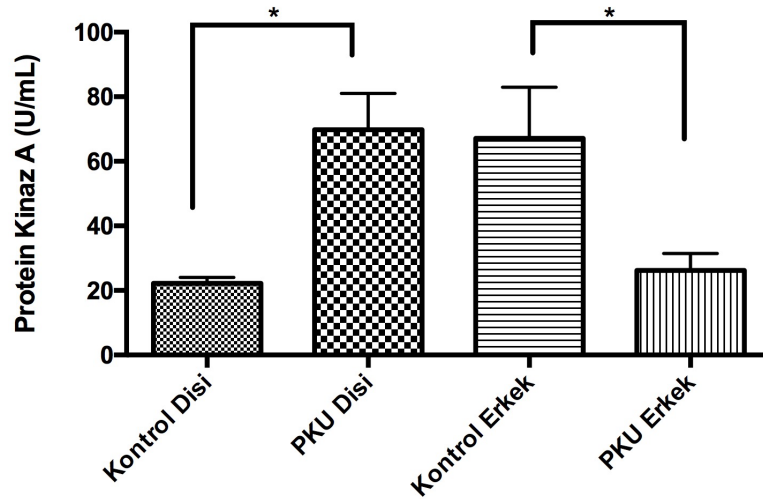
**Şekil 4.20.** Hipokampal cAMP miktarlarının kontrol ve deneysel PKU oluşturulan sıçanlarda cinsiyete göre karşılaştırılmaları. Değerler kantitatif ELISA yöntemi ile tayin edilmiştir. Analiz sonucu tüm gruplarda sabit ve aynı miktarlarda cAMP olduğu ve cinsiyetin bu değerler üzerine bir etkisi olmadığı gözlemlenmiştir.



**Şekil 4.21.** Hipokampal cAMP miktarlarının kontrol ve deneysel hiperfenilalaninemi oluşturulan sıçanlarda cinsiyete göre karşılaştırılmaları. Değerler kantitatif ELISA yöntemi ile tayin edilmiştir. Analiz sonucu cAMP seviyelerinde HPE grubunda azalma eğilimi olsa da istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı gözlemlenmiştir.

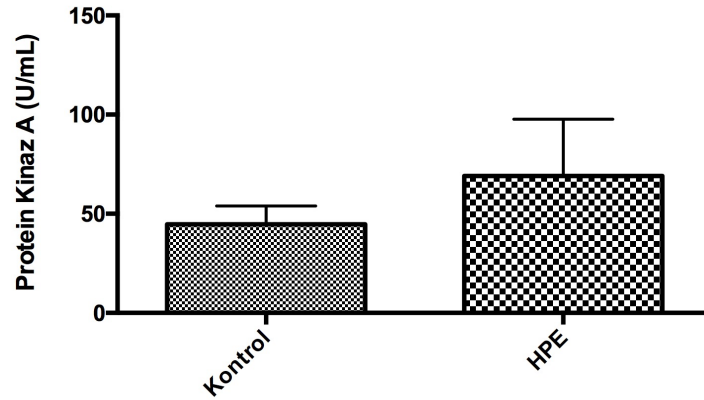
#### 4.9.2. Hipokampus PKA aktivitesinin ELISA yöntemi ile belirlenmesi

Hipokampal PKA aktiviteleri hem kontrol grubu hayvanlarda hem de deneysel PKU oluşturulan hayvanlarda ELISA yöntemi ile incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara deneysel gruplar arasında hem cinsiyet hem de PKU ile ilişkili bir değişiklik gözlenmemiştir. Dişi hayvanlarda PKU grubu PKA aktivitesinde kontrol grubuna göre 3,14 kat artarak istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmiştir. Erkek hayvan gruplarında ise PKA aktivitesi 0,39 kat azalarak tam tersi bir eğilim içindedir. Kontrol erkek grubunda yüksek miktarlarda bulunan PKA aktivitesi PKU erkek grubunda anlamlı ve belirgin olarak azalmıştır (Şekil 4.22.).



**Şekil 4.22.** Hipokampal PKA aktivitesinin kontrol ve deneysel hiperfenilalaninemi oluşturulan sıçanlarda cinsiyete göre karşılaştırılmaları. Değerler kantitatif ELISA yöntemi ile tayin edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre PKU dişi ve PKU erkek grubun kontrol dişi ve erkek gruplarına göre PKA aktivitesi istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. PKA dişi  $p=0,0311$ , PKA erkek  $p= 0,048$

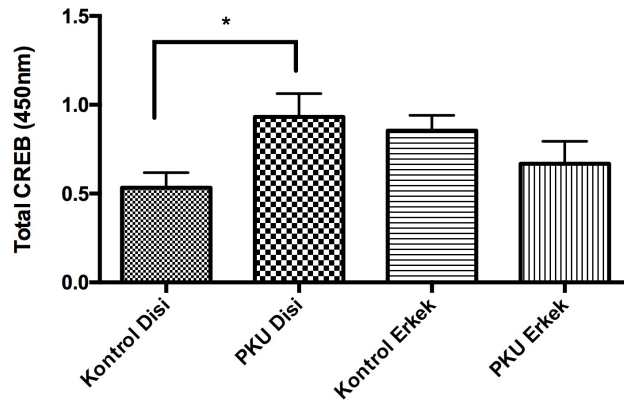
Hiperfenilalaninemi grubuna ait PKA aktivitesi değerleri incelendiğinde HPE grubunda PKA aktivitesinin kontrol grubuna kıyasla göreceli daha fazla olduğu gözlenirse de istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır (Şekil 4.23.).



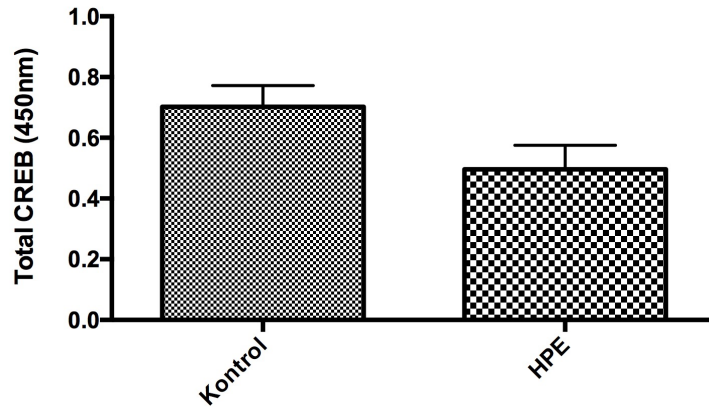
**Şekil 4.23.** Hipokampal PKA aktivitesinin kontrol ve deneysel hiperfenilalaninemi oluşturulan sıçanlarda kontrol grubuna göre karşılaştırılmaları. Değerler kantitatif ELISA yöntemi ile tayin edilmiştir. HPE grubunda kontrol grubuna göre artış eğilimi olsa bile istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamıştır.

#### 4.9.3. Hipokampus Total CREB miktarının ELISA yöntemi ile belirlenmesi

Hipokampal CREB miktarları hem kontrol grubu hayvanlarda hem de deneysel PKU oluşturulan hayvanlarda ELISA yöntemi ile incelenmiştir. Total CREB sandviç ELISA metodu ile tayin edildiğinde, PKU dişi grupta kontrol dişi gruba göre 1,75 kat artarak istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmiştir (Şekil 4.24. PKU dişi  $p^*=0,0174$ ; PKU erkek  $p =0,0757$ ). HPE (Şekil 4.25.) grubu verileri kontrol grubu ile karşılaştırdığında Total CREB seviyelerinde istatistiksel anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Ancak eğilimler incelendiğinde kontrol dişi grubuna karşı PKU dişi grubunda dişi grubunda bir artış eğilimi ve bu gruplara karşı gelen erkek gruplarında (kontrol erkek vs PKU erkek) ise Total CREB miktarlarında bir azalış eğilimi gözlenmiştir.



**Şekil 4.24.** Hipokampal CREB miktarlarının kontrol ve deneysel PKU oluşturulan sıçanlarda cinsiyete göre karşılaştırılmaları. Her iki cinsiyete ait grupta zıt bir eğilim izlenmektedir. Dişi PKU grubu kontrol dişi grubuna kıyasla belirgin olarak artmış bir total CREB seviyesi gözlenmekte olu bu artış istatistiksel olarak anlamlıdır. Erkek hayvanlarda ise kontrol grubunda yüksek olan total CREB seviye azalma eğilimi gösterse de bu eğilim istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşturmamaktadır. PKU dişi  $p^*=0,0174$ ; PKU erkek  $p =0,0757$ )

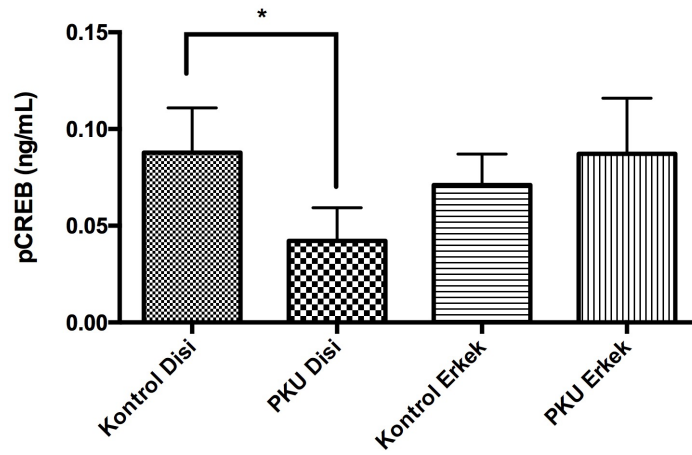


**Şekil 4.25.** Hipokampus dokusundan Total CREB analizi. HPE grubun kontrol grubuna göre Total CREB seviyesi

#### 4.9.4. Hipokampus FosfoCREB miktarının ELISA yöntemi ile belirlenmesi

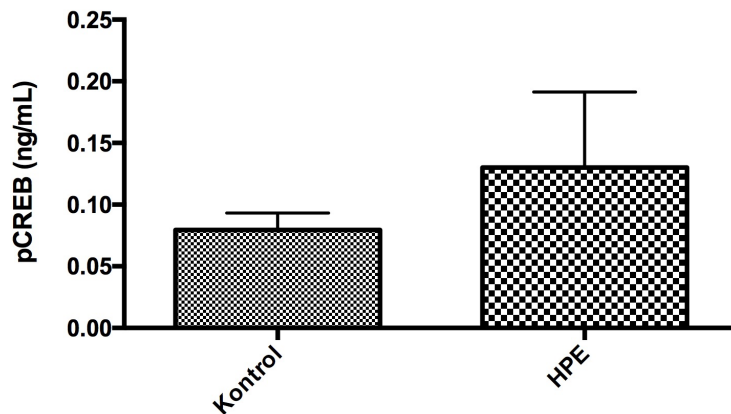
Hipokampal fosfoCREB miktarları hem kontrol grubu hayvanlarda hem de deneysel PKU oluşturulan hayvanlarda ELISA yöntemi ile incelenmiştir. Hipokampal pCREB miktarları ELISA metodu ile tayin edildiğinde, dişi PKU grubu CREB miktarlarının dişi kontrol grubuna göre 0,48 kat azaldığı ve bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlenmiştir. Erkek hayvan gruplarında ise PKU grubunda kontrole kıyasla bir artış olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı değildir (Şekil 4.25 PKU dişi  $*p=0,05$ ; PKU erkek  $p =0,4916$  ).





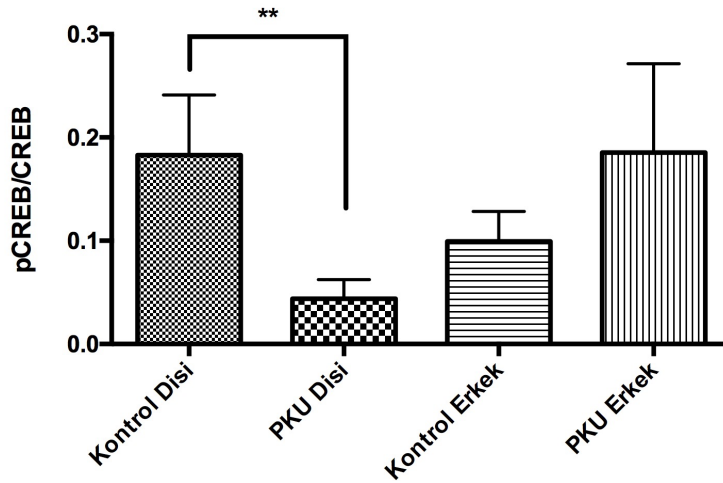
**Şekil 4.26.** Hipokampal pCREB miktarlarının kontrol ve deneysel PKU oluşturulan sıçanlarda cinsiyete göre karşılaştırılmaları. Her iki cinsiyete ait grupta zıt bir eğilim izlenmektedir. Dişi PKU grubu kontrol dişi grubuna kıyasla belirgin olarak azalmış bir pCREB seviyesi gözlenmekte olup bu azalma istatistiksel olarak anlamlıdır. Erkek hayvanlarda ise kontrol grubuna kıyasla PKU grubunda pCREB seviyesinde artma eğilimi gösterse de bu eğilim istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşturmamaktadır (PKU dişi  $p^*=0,05$ ; PKU erkek  $p=0,4916$ ).

Hiperfenilalaninemi grubuna ait pCREB verileri (Şekil 4.26.) kontrol grubu ile karşılaştırdığında bir artma eğilimi gözlenmesine rağmen gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır.



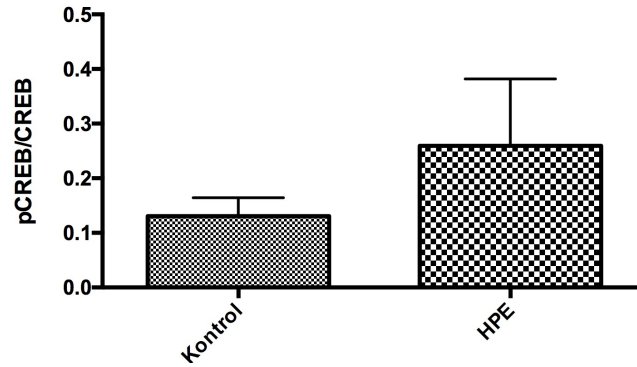
**Şekil 4.27.** Hipokampal pCREB miktarlarının kontrol ve deneysel Hiperfenilalaninemi oluşturulan sıçanlarda karşılaştırılması. HPE grubu pCREB miktarında artış eğilimi gözlenirse de istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

CREB proteininin aktif formu pCREB proteinidir. Bir sinyal yolağının aktivasyon durumu sadece yolak proteinlerinin total miktarları ile değil aynı zamanda aktif formlarının miktarları ve bu iki formun birbirine oranları ile de incelenmelidir. Bu amaçla hem total protein formu hem fosforile formlar hem de mümkün ise enzimatik aktivite ölçülmelidir. Bu nedenle pCREB ifadesi total CREB miktarlarına oranlanarak yolağın durumu incelenmiştir. Dişi PKU grubu kontrol dişi grubuna kıyasla belirgin olarak 0,24 kat azalış gözlenmekte olup bu artış istatistiksel olarak anlamlıdır. Erkek hayvanlarda ise kontrol grubunda pCREB/CREB seviyende artma eğilimi gösterse de bu eğilim istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşturmamaktadır (Şekil 4.28. PKU dişi  $**p=0,003$ ; PKU erkek  $p=0,9003$ ). Bulgular bize pCREB/CREB oranının dişi PKU grupta azaldığı ve bu yolağın baskılandığını, erkek PKU grubunda ise etkilenmediğini göstermektedir.



**Şekil 4.28.** Hipokampal pCREB/CREB miktarlarının kontrol ve deneysel PKU oluşturulan sıçanlarda cinsiyete göre karşılaştırılmaları. Dişi PKU grubu kontrol dişi grubuna kıyasla belirgin olarak azalış gözlenmekte olup bu artış istatistiksel olarak anlamlıdır. Erkek hayvanlarda ise kontrol grubunda pCREB/CREB seviyende artma eğilimi gösterse de bu eğilim istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşturmamaktadır (PKU dişi  $**p=0,003$ ; PKU erkek  $p=0,9003$ )

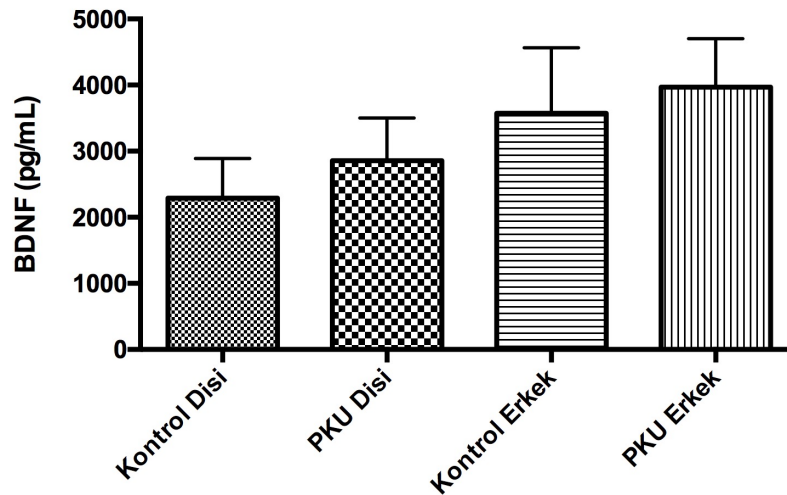
pCREB/CREB miktarlarının kontrol ve hiperfenilalaninemi grubu sıçanlarda göre karşılaştırıldığında, HPE grubu kontrol grubuna kıyasla belirgin olarak artış gözlenmekte olup bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Şekil 4.29.  $p=0,5471$ ).



**Şekil 4.29.** Hipokampal pCREB/CREB miktarlarının kontrol ve hiperfenilalaninemi oluşturulan sıçanlar göre karşılaştırılmaları. HPE grubu kontrol grubuna kıyasla belirgin olarak artış gözlenmekte olup bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir ( $p=0,5471$ ).

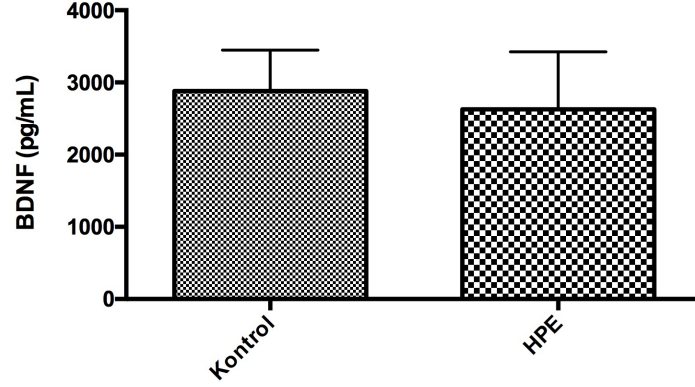
#### 4.9.5. Hipokampüs BDNF miktarının ELISA yöntemi ile belirlenmesi

Hipokampal BDNF miktarı hem kontrol grubu hayvanlarda hem de deneysel PKU oluşturulan hayvanlarda ELISA yöntemi ile incelenmiştir. Deneysel PKU grubu dişi ve erkek sıçanların kontrol grubu dişi ve erkek sıçanlara göre BDNF protein ekspresyonu seviyeleri arasında istatistiksel anlamlı bir fark gözlenmemiştir (Şekil 4.30. PKU dişi  $p=0,5197$  A); PKU erkek  $p=0,9021$ ).



**Şekil 4.30.** Hipokampal BDNF miktarlarının kontrol ve deneysel PKU oluşturulan sıçanlarda cinsiyete göre karşılaştırılmaları. PKU dişi ve PKU erkek grubun kontrol dişi ve erkek grubuna göre BDNF seviyesi Her iki cinsiyette artan bir eğilim izlenmesine rağmen hiçbir grup karşılaştırmasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır (PKU dişi  $*p=0,0265$  A); PKU erkek  $*p=0,0260$ ).

Hipokampal BDNF miktarları hem kontrol grubu hayvanlarda hem de deneysel hiperfenilalaninemi oluşturulan hayvanlarda ELISA yöntemi ile incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre hiçbir deneysel grup arasında BDNF miktarları açısından anlamlı bir fark gözlenmemiştir (Şekil 4.31.).



**Şekil 4.31.** Hipokampal BDNF miktarlarının kontrol ve deneysel Hiperfenilalaninemi oluşturulan sıçanlarda karşılaştırılması. HPE grubu ve kontrol grubu BDNF miktarında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştı, her iki grupta da BDNF aynı seviyelerde gözlenmektedir

**Tablo 4.1.** Sonuçların özet tablosu

	Kontrol Dişi	PKU Dişi	Kontrol Erkek	PKU Erkek	Misli Artış/Azalış Dişi	Misli Artış/Azalış Erkek
	Ortalama	Ortalama	Ortalama	Ortalama		
<b>Plazma Phe seviyesi</b>	1,085	8,388	1,311	7,996	7,73 Kat Artış (****p =0,0001)	6,10 Kat Artış (****p =0,0001)
<b>Lokomotor aktivite</b>	1606	1499	1591	1233	0,93 Kat Azalış (p=0,6334)	0,77 Kat Azalış (*p=0,0156)
<b>Toplam vücut ağırlığı</b>	57,92	45,13	56,18	41,89	0,78 Kat Azalış (**p=0,0079)	0,75 Kat Azalış (**p=0,0017)
<b>PKA mRNA ifadesi</b>	1,046	1,141	1,078	0,8921	1,09 Kat Artış (p=0,2318)	0,83 Kat Azalış (p=0,4845)
<b>CREB mRNA ifadesi</b>	1,193	0,5982	1,072	0,4798	0,50 Kat Azalış (*p=0,0499)	0,45 Kat Azalış (**p=0,0007)
<b>BDNF mRNA ifadesi</b>	1,068	0,7272	1,035	0,7718	0,68 Kat Azalış (*p=0,0265)	0,75 Kat Azalış (*p=0,0260)
<b>AChE mRNA ifadesi</b>	0,2146	0,1698	0,2025	0,07845	0,79 Kat Azalış (p=0,2964)	0,39 Kat Azalış (*p=0,0131)
<b>BChE mRNA ifadesi</b>	0,1295	0,2124	0,1088	0,341	1,64 Kat Azalış (p=0,1794)	3,13 Kat Azalış (*p=0,0134)
<b>cAMP miktarı</b>	1,752	1,648	1,71	1,603	0,94 Kat Azalış (p=0,3818)	0,94 Kat Azalış (p=0,1200)
<b>PKA Aktivitesi</b>	22,25	69,78	67,14	26,19	3,14 Kat Artış (*p=0,0311)	0,39 Kat Azalış (*p=0,0480)
<b>Total CREB miktarı</b>	0,5333	0,932	0,854	0,6688	1,75 Kat Artış (*p=0,0174)	0,78 Kat Azalış (p=0,0757)
<b>pCREB miktarı</b>	0,08778	0,04222	0,07111	0,08714	0,48 Kat Azalış (*p=0,05)	1,23 Kat Artış (p=0,4916)
<b>pCREB/CREB oranı</b>	0,1829	0,04391	0,09946	0,1854	0,24 Kat Azalış (*p=0,003)	1,86 Kat Artış (p=0,9003)
<b>BDNF miktarı</b>	2291	2852	3572	3969	1,24 Kat Artış (p=0,5197)	1,11 Kat Artış (p=0,9021)

## 5. TARTIŞMA

Fenilketonüri, fenilalanin hidroksilaz eksikliğinden kaynaklanan fenilalanin metabolizmasının doğuştan bir bozukluğu olup yaklaşık 1/10000 insanda görülen gelen nadir bir hastalıktır. Fenilalanin hidroksilaz enzim mutasyonu ve dihirobiyopterin enzim mutasyonu PKU hastalarının doku ve vücut sıvılarında Phe ve metabolitlerinin birikmesine neden olur. Temel belirti ve bulgular beyinde bulunur, ancak bu hastalığın patofizyolojisi henüz iyi anlaşılmamıştır (2).

Kan fenilalanin konsantrasyonlarını azaltarak entellektüel gerilik önlenmesine rağmen, fenilketonüri hastalarının nörobilişsel ve psikososyal sonuçları hala sağlıklı bireylerinin seviyesinin altında kalmaktadır (2, 152). Tedavi edilmemiş PKU hastaları yüksek kan Phe düzeyleri görülür. Klinik olarak tedavi edilmemiş PKU, ciddi zihinsel engellilik, nörolojik problemler, motor bozukluklar ve davranışsal problemlerle karakterizedir (153).

Çalışmamızda PKU modeli oluşturmak için Sprague-Dawley cinsi sıçan yavruları kullanılmıştır. Çalışmada iki farklı model oluşturulması amaçlanmıştır. Bu hedefle gün aşırı PAH enzim inhibitörü olarak 4 Cl-Phe ile her gün fenilalanin verilerek PKU modeli ve hergün yüksek doz Phe enjeksiyonu ile hiperfenilalaninemi modeli oluşturulmuştur. Literatürde farklı PAH enzim inhibitörleri kullanılarak deneysel PKU modeli oluşturulmuş çalışmalar da mevcuttur (134, 135, 154). Yapılan çalışma ile PKU'de bozulan öğrenme bellek mekanizması bozukluğunun BDNF sinyal yolağı üzerinden cinsiyete göre aydınlatılmaya çalışılmıştır. BDNF yolağı ve nörobilişsel hastalıklar birçok çalışma olmasına rağmen PKU hayvan modelinde herhangi bir çalışma mevcut değildir.

Yapılan çalışmada erkek PKU sıçanların kontrol grubu sıçanlara göre lokomotor aktivitesinden azalma gözlenirken dişi PKU sıçanlarda istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Daha önce yapılan bir çalışmada erkek PKU sıçanlarda kontrol grubuna göre lokomotor aktivitenin azaldığını rapor edilmiştir. Öğrenme ve belleği ölçmek için yapılan yeni nesne tanıma testinde PKU grubunun kontrol grubuna

göre yeni nesne ile daha fazla ilgilendiği tespit edilmiştir. Literatürde erkek PKU sıçanlar ile yapılan NOR testinde kontrol grubuna göre PKU grubun öğrenmesinin bozulduğu rapor edilmiştir (155). Literatürde yer alan PKU çalışmalarında davranış testleri 4-5 aylık fareler üzerinde gerçekleştirilmiştir. Ayrıca sözü edilen çalışmada PKU transgenik hayvan modeli ile çalışılmıştır, literatür ile bizim çalışmamızın uyuşmamasının nedeninin yukarıda belirtilen yöntemsel farklılıklar olduğu düşünülmüştür. Deney şemasında 14. günde gözlerinin açılması beklenip öğrenme testine 14. günde başlanacağı planlanmasına rağmen PKU sıçanlarda oluşan gelişim geriliğinden dolayı gözleri 21. günde açılmıştır. (155). Bu nedenle testlere 21.günden itibaren başlanmıştır. Ancak gelecekte planlanan çalışmalarda gelişim geriliğinin görme duyusunu etkileyebileceği göz önünde bulundurularak dokunma veya koku temelli testlerin yapılmasının daha uygun olabileceği düşünüldü.

Yeni nesne tanıma testinde kontrol grubunun da beklenen düzeyde öğrenmediği gözlenmiştir. Bunun olası nedenlerinden birinin yavruların enjeksiyon ve davranış deneyleri esnasında anneden yaklaşık 1 saat süreyle ayrılması olabileceği düşünüldü. Önce ki çalışmalarda anneden ayrılma stresinin öğrenme ve belleği olumsuz etkilediği bilindiğinden (136) yavruların enjeksiyonlar sırasında anneden ayrılmadığı yeni bir kontrol grubu eklendi. Ancak sonuçlarda farklılık oluşmadı. Bu doğrultuda yeni bir kontrol grubu eklendi. Yeni kontrol grubu ile tüm davranış testleri aynı şekilde tekrarlandı fakat tüm işlemler boyunca yavru anneden ayrılmadı.

Amigdala ile ilişkili öğrenme ve belleği değerlendirmek için yaptığımız pasif sakınma testinde PKU grubunun öğrenme ve bellek fonksiyonlarında herhangi bir azalma olmadığı sonucuna ulaşıldı. Aksine 24 saat sonra PKU grubunun aydınlık bölmeden karanlık bölmeye geçiş gecikmesinin daha fazla olduğu gözlemlendi. Bu bulgu lokomotor aktivitede ki azalma ile ilişkilendirildi. Yani sıçanların karanlık kutuda elektrik şoku aldıklarını öğrendiklerinden değil, hareketsiz kalma eğiliminde olduklarından aydınlık kutuda kaldıkları düşünüldü. Aydınlık kutuda araştırmacı davranışlarının azalmış olması bu düşünceyi desteklemektedir.

Bu çalışmada bellek işlevlerinde PKU ile bir değişiklik saptanmadı. Literatürde de PKU hastalarında ağırlıklı olarak yürütücü işlevlerin bozulduğu bildirilmiştir (40).

Ayrıca belleği değerlendiren çalışmalar sözel belleğe yoğunlaşmıştır. İnsanda sözel ve görsel belleğin farklı hemisferler tarafından yönetildiği bilindiğinden bu çalışmada görsel belleğin değerlendirilmiş olması farklılık görülmemesinin açıklayabilir.

Daha önce yapılan PKU hayvan çalışmalarında, PAH enzim inhibitörü verilerek kan Phe seviyesi yükseltilmiş ve kan Phe seviyesi ölçülerek PKU modeli oluşturulmuş kanıtlanmıştır. Benzer olarak literatürde kullanılan transgenik PKU hayvan modelinde de aynı yöntem ile yüksek kan Phe seviyelerine saptanmıştır (156). Bizde çalışmamızda PAH enzim inhibitörü ile beraber fenilalanin uygulaması sonucu kan Phe seviyesi yükseltildi. Ayrıştırılan plazmadan Phe seviyesindeki artış tespiti ile enzimin inhibe olduğunu kanıtlandı. Sonuç olarak hem dişi hem de erkek PKU gruplarında kan Phe seviyesi hedeflendiği gibi yükselmiş ve kontrol grubuna göre bu artış istatistiksel olarak anlamlı çıkmıştır. Bu bulgu, oluşturulan PKU hayvan modelinin başarısını göstermektedir.

Literatürde PAH mutasyonu yapılan PKU farelerde vücut ağırlığı belirlenmiş ve istatistiksel olarak PKU ve kontrol grubu fareleri arasında anlamlı farklar bulunmuştur. Çalışmamızda toplam vücut ağırlık değişimleri belirlenmiş ve karşılaştırılmıştır. Biz de çalışmamızda, vücut ağırlığı verilerini kontrol ve deneysel hiperfenilalaninemi oluşturulan sıçanlarda cinsiyete göre karşılaştırdık ve istatistiksel olarak vücut ağırlıklarında azalmayı gösterdik. Literatürde PKU hayvan modellerinde kilo kaybını gösteren farklı çalışmalar rapor edilmiştir (157). Bizim çalışmamızda inhibitör uygulamayı sadece Phe uygulaması yaptığımız hayvan grubunda kilo azalması yerine kontrol grubunu geçecek kadar kilo artışı gözlemledik. Bu durumun gerçek bir PKU modelini yansıtmadığı düşünülerek hiperfenilalaninemi grubu davranış testlerine tabi edilmedi.

BDNF'nin bilişsel performanstaki rolünün en güçlü kanıtı, BDNF'nin bellek üzerindeki rolünü aydınlatmak için kemirgen modelleri kullanan geniş literatürden gelmektedir. Bu güçlü kanıtın örnekleri olarak, BDNF'in bellekteki kritik rolünün açık gösterimini sağlayan iki özel çalışma vardır. Mu ve ark. (88), endojen hipokampal BDNF ifadesini etkin bir şekilde yok eden bir BDNF antikoru uygulayarak Morris su labirenti ile değerlendirilen mekansal öğrenme ve bellek üzerindeki etkiyi



incelemişlerdir. Elde ettikleri sonuçlar, BDNF'den mahrum bırakılan hayvanların bilişsel performanslarının kontrollere kıyasla azaldığını göstermiştir. Böylece BDNF'nin bilişsel performans için önemi rapor edilmiştir. Diğer bir çalışma da, Cirulli ve ark.(87), mekansal öğrenme ve bellek üzerindeki etkileri incelemek için yapay olarak BDNF arttırma yaklaşımını benimsemiştir. Kemirgenlerle yapılan ve Morris su labirentinin benzer bir formunu kullanan çalışmalarında, eksojen BDNF enjeksiyonlar ile uygulanmıştır. Çalışma sonucunda kontrollere kıyasla eksojen BDNF enjeksiyonlarını alan kemirgenlerde bilişsel performansta iyileşmeler olduğunu gösterilmiştir. Bu yüzden iki farklı sorgulama yöntemi ile gerçekleştirilen bu iki çalışma, BDNF'nin mekansal öğrenme ve belleğin bilişsel süreçlerine katılımının önemini göz önüne sermektedir. Biz de gerçekleştirdiğimiz çalışmada BDNF sinyal yolağını cAMP/PKA/CREB elemanları üzerinden analiz ettik. Bulduğumuz sonuçlara göre kontrol ve PKU oluşturulan sıçanlarda cinsiyete göre lokomotor aktivitesi incelendiğinde sadece PKU erkek istatistiksel olarak anlamlı bir azalma saptadık.

Çalışmada ana yaklaşım öğrenme bellek mekanizması olarak temel alınan PKA, CREB ve BDNF yolağının özellikle PKU'da hipokampal ifadelerinde değişiklik yaratıp yaratmadığı idi. Bu amaçla öncelikle yolakta PKA aktivasyonunda görev alan cAMP molekülü miktarlarında kontrol ve PKU oluşturulan sıçanlarda cinsiyete göre bir fark olup olmadığını ve ardından yolak bileşenlerinin hem mRNA seviyesi hem de protein seviyesinde ifadelerini inceledik. İncelemelerde mRNA ifadeleri RT-qPCR protein düzeyleri ELISA ile ölçüldü.

PKA aktivitesini uyaran ikincil haberci cAMP molekülünün miktarı kontrol ve PKU oluşturulan sıçanlarda cinsiyete göre incelendiğinde gruplar arasında fark bulunamadı. Bir alt basamak olan PKA'nın mRNA ifadesi sonuçlarına baktığımız da ne erkek PKU ne de dişi PKU grubunda kontrol PKA mRNA ekspresyonunda anlamlı bir azalma görülmedi, tüm gruplarda sabit bir düzeyde PKA bulundu. Ancak PKA proteinin aktivitesi incelendiğinde ise erkek sıçanlarda PKU gelişimi ile PKA aktivitesinde azalma gözlemlendi. Dişi sıçanlarda ise PKU grubunda kontrol grubuna kıyasla PKA aktivitesi arttı. Bu proteinin mRNA ekspresyonu sabit olmasına rağmen aktivitesinin cinsiyetlere göre farklı olduğunu söyleyebiliriz.

PKA aktivitesinin hedeflerinden olan CREB molekülünü de çalışmamızda hem mRNA hem de protein seviyesinde inceledik. CREB proteinin mRNA ifadesi kontrol ve PKU oluşturulan sıçanlarda cinsiyete göre incelendiğinde ifadenin her iki cinsiyette de PKU gruplarında kontrole göre istatistiksel olarak azaldığını saptadık. Ancak bu molekülün protein ifadesi ve etkinliğini gösteren fosforile formu analizleri mRNA ifadesinin aktif protein formlarına cinsiyete göre farklı şekilde yansıdığını gösterdi. Total CREB ve aktif form olan fosfoCREB protein miktarları deney düzeneğinde yer alan erkek hayvan gruplarında değişmediği saptandı. Kısaca ne PKU ne de kontrol erkek sıçanların CREB/pCREB düzeyleri birbirlerinden istatistiksel olarak farklı değildi.

Ancak dişi sıçanlar incelendiğinde, PKU grubunda kontrol gruba kıyasla total CREB düzeylerinde belirgin ve istatistiksel olarak anlamlı bir artış bulundu. Ancak PKU dişilerde artmış CREB miktarı, aktif formu olan Fosfo CREB düzeylerine yansımadağı gözlemlendi. Total CREB miktarının tersine pCREB miktarı dişi PKU grubunda dişi kontrol grubu düzeyine kıyasla azaldığı bulundu. Bu durum cinsiyetler arası gözlenen farkların moleküler temelinde yer aldığını düşünmekteyiz.

Yolakta incelemek için seçtiğimiz son bileşen olan BDNF de hem nükleik asit hem de protein seviyesinde incelendi. BDNF mRNA ifadesi kontrol ve PKU oluşturulan sıçanlarda cinsiyete göre incelendiğinde ifadenin her iki cinsiyette de PKU gruplarında kontrole göre istatistiksel olarak azaldığını saptadık. Ancak BDNF mRNA ekspresyonunda gözlenen bu azalma protein seviyesine yansımadağı gözlemlendi. Bu durum ana yaklaşımımızda öğrenme bellek mekanizması olarak temel alınan PKA, CREB ve BDNF yolağının özellikle PKU'da hipokampal ifadelerinde değişiklik yarattığını ancak cinsiyet farklarının etkisinin daha da etkin olduğunu gösterdi.

Çalışmamızda, BDNF sinyal yolağı üzerinde değişim hem metabolit hem de farklı şekillerde ekspresyon seviyesinde dişi ve erkek PKU gruplarında araştırılmıştır. Literatürde PKU'de bozulan bilişsel fonksiyonların BDNF sinyal yolağı ile ilgili olabileceğine dair herhangi bir çalışma yoktur. Ayrıca cinsiyete göre PKU çalışmalarından mevcut olamamasından dolayı çalışmamızın özgünlüğü büyük önem arz etmektedir.

Sinirbilim alanında cinsiyetin beyin işlevi üzerindeki etkisi vurgulanmaktadır. Bu araştırmada, BDNF yolağının PKU üzerindeki olası etkisini cinsiyet ve motor işlevine dayanarak bir dizi nöronal sinyal yolağı üzerinden araştırdık ve cinsiyet farkının beyin kaynaklı nörotrofik faktör yolağı üzerinden olabileceğini rapor etmiş olduk. Daha önce rapor edilen çalışmalar BDNF seviyelerinin cinsiyete göre değişik gösterdiği bildirilmiştir (158).

Cinsiyet steroidleri ile BDNF ekspresyonu arasındaki ilişki açık olmasına rağmen, steroid sinyali ile cAMP/PKA/CREB/BDNF yolağı arasındaki etkileşim istenilen ölçüde aydınlatılamamıştır. Yakın zamanda yapılan bir araştırmada, depresyon modeli oluşturulan erkek hayvan gruplarında cAMP/PKA/CREB/BDNF yolağı elemanlarında azalma rapor edilmiştir (159). Bizim çalışmamızda, literatür verileri ile paralellik göstermekte olup PKU modeli erkek sıçanlarının hipokampusundaki PKA seviyelerinin kontrol grubundakilere göre anlamlı derecede düşük olduğunu doğrulamaktadır.

Literatür çalışmaları PKU'de öğrenme ve belleğin bozabileceğini göstermektedir, ancak moleküler mekanizması hala belirsizdir. Son zamanlarda yapılan birkaç çalışma, PKA-CREB-BDNF sinyal yolunun, uzun süreli öğrenme ve bellek ile ilişkili olduğunu göstermiştir (130, 160). PKA, her yerde eksprese edilen ve MSS'nde hücre içi sinyal iletimine aracılık eden bir serin / treonin kinazdır. Dört alt üniteye sahip olan PKA, aktivitesi aracılığı ile nörojenez, sinaptik plastisite ve bellek oluşumunda önemli roller oynar (161, 162). CREB aralarında PKA, MAPK, PKC ve CaMK gibi çeşitli protein kinaz moleküllerinin substratı olarak fosforile olabilen ve bu fosforilasyon sonucu çekirdeğe geçip farklı genler üzerinde etki gösterebilen bir düzenleyici faktördür. Çoklu sinyal yolları CREB'nin aktivasyonunu etkileyebilir (163, 164).

CREB aracılı gen transkripsiyonu ve protein sentezinin, uzun süreli hipokampal sinaptik plastisite ve bellek oluşumunda önemli olduğu düşünülmektedir (118, 165, 166). CREB işlevi, Ser133 üzerinden fosforilasyonla baskın olarak düzenlenir. p-CREB'in ifadesi öğrenme ve bellek kaybı ile ilişkilendirilmiştir (167). BDNF, CREB'nin aşağı akış hedef genlerinden biridir. CREB fosforilasyonu, hayatta kalma, büyüme,

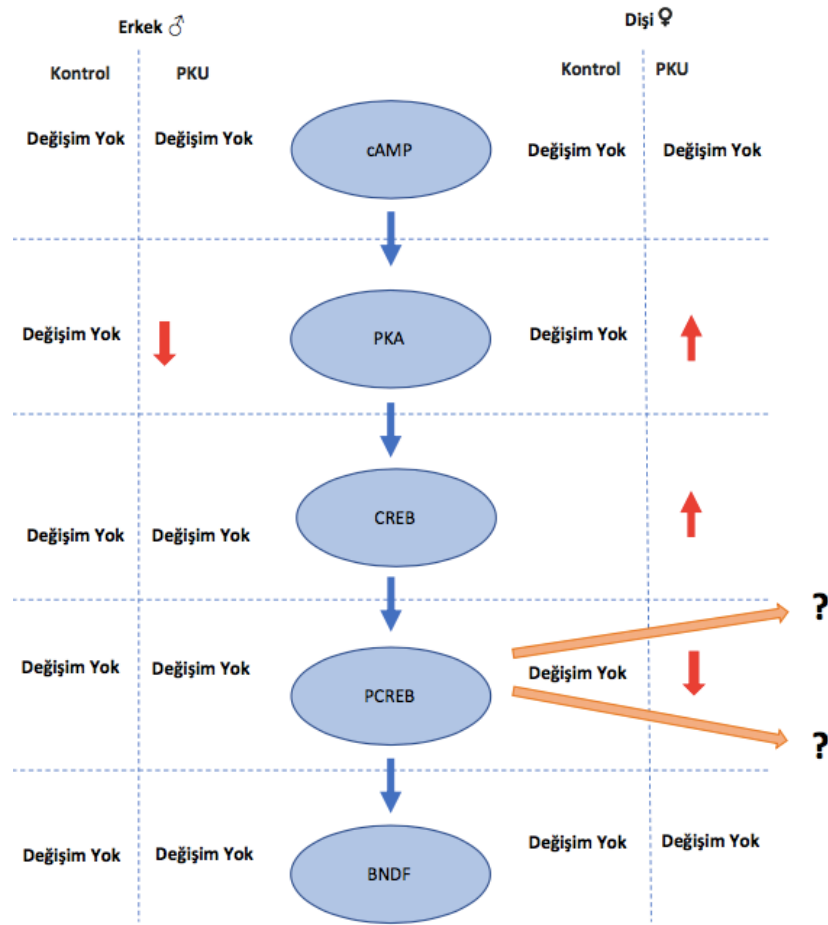
sinaptik plastisite, uzun süreli öğrenme ve belleği düzenleyen BDNF'nin ekspresyonuna yol açar (168, 169). BDNF ise uzun süreli potansiyonu (LTP) oluşumu ve sürdürülmesinde önemli roller oynar. BDNF sinyalinin inhibisyonu, öğrenme ve bellek için gereken nörofizyolojik temeli olarak ifade edilen LTP'yi uyarabilir (170).

İn vitro hipokampal primer kültür çalışmasında estrodiol uygulaması yapılan kültürlerde 7.günde pCREB seviyesi zirveye çıkarken 14. günde pCREB azalarak CREB seviyesinin altına düşmüştür. Zamana bağlı yapılan bu çalışmada estrodiolün CREB fosforilasyonu üzerinden etkisi kanıtlanmıştır (171). Yapılan farklı bir çalışmada doğumdan 2 saat sonra elde edilen sıçan hipokampus dokularından cinsiyete göre estrodiol seviyelerine bakıldığında, dişi sıçanların erkek sıçanlara göre hipokampus estrodiol seviyeleri istatistiksel olarak yüksek çıkmıştır (172). Cinsiyet hormonları hem erkek hem de dişi kemirgenlerde hipokampal morfoloji, plastisite ve belleğin önemli düzenleyicileridir. Bu hormonların reseptörlerinin beynin her yerinde bulunduğu düşünüldüğünde, bu hormonlar çeşitli beyin bölgelerinin aracılık ettiği birçok bellek tipini modüle edebilir. Cinsiyet hormonlarının öğrenme üzerine etkisine bakıldığında ise östrojenin olumlu etkisi farklı çalışmalar ile gösterilmiştir (173).

Çalışmamız da yukarıda belirtilen literatür verilerini destekleyecek biçimde PKU modeli erkek sıçanlarda hipokampal PKA aktivitesi kontrol grubuna göre azalmıştır. Bu duruma zıt olarak PKU dişi grubunda hipokampal PKA ve CREB seviyeleri kontrol grubuna göre artmaktadır. Daha öncede belirttiğimiz gibi dişilerin cAMP/PKA/CREB/BDNF sinyal yolağı üzerindeki azalmaya dirençli olmaları cinsiyet steroidleri ile ilişkili olabilir. RT-qPCR sonuçlarına baktığımızda ise hem erkek hem dişi PKU gruplarda CREB ve BDNF hipokampus seviyesi anlamlı olarak azalmıştır. Fakat bu azalış mRNA seviyesinde kalmış ve protein düzeyine yansımamıştır. Erkek PKU sıçanlarda lokomotor aktivite testi sonuçlarına paralel olarak moleküler analizler PKU'da hipokampal PKA seviyesinde buna bağlı olarak azalmaktadır. Literatürde daha önce yapılan PKU çalışmalarının hepsi erkek hayvan modellerinden olup, dişi PKU model daha önce rapor edilmemiştir.

Bilindiği gibi merkezi kolinerjik nöronlar dikkat, algı, öğrenme, bellek, uyku ve uyanıklığın kontrolü, motor fonksiyon dahil olmak üzere birçok beyin

fonksiyonlarında yer alır (174-176). Merkezi kolinerjik sistemlerin işlev bozuklukları, çeşitli nöropsikiyatrik bozukluklarda yer alırken, Alzhemier hastalığı (AD) ve Lewy cisimcikli demans (DLB) gibi yaşlılık bunamalarında özellikle belirgindir (177-179). Asetilkolin hipokampus (180, 181), entorhinal korteks (182) ve piriform korteks (183) dahil olmak üzere birçok alanda LTP'yi artırarak kodlamayı geliştirdiğini göstermiştir. Alzhemier hastalığı AChE seviyeleri bazı beyin bölgelerinde % 85'e kadar düşerken, hastalık ilerledikçe BuChE seviyeleri (özellikle G1 formu) arttığı çalışmalarda rapor edilmiştir (184, 185). Yine elde edilen sonuçlar ile literatür verileri karşılaştırıldığında AChE ve BChE mRNA ekspresyonlarına PKU erkek sıçanların AChE ve BChE mRNA seviyelerinin kontrol grubuna göre azaldığı gösterilmiştir. AChE ve BChE seviyelerin öğrenme, bellek, uyku ve uyanıklığın kontrolü, motor fonksiyon dahil olmak üzere birçok etkisinin olduğunu göz önüne alırsak bulduğumuz sonuçların literatür ile tutarlı olduğunu söylenebilir.



**Şekil 5.1.** Cinsiyete bağlı deneysel PKU ve kontrol grubunda PKA yolak elemanlarının değişimi

Çalışmamızda elde ettiğimiz bulgulara dayanarak öğrenme bellek mekanizması sinyalizasyonunda gözlenen değişiklikleri şu biçimde açıklayabiliriz. Birçok ileti grubunun birleştiği CREB molekülü bizim çalışmamızda da PKU'de gözlenen cinsiyetler arası farkın dönüşüm noktasını oluşturmaktadır. Erkek grubunda göreceli olarak sabit kalan yolak elemanları dişi gruptaki aktif pCREB miktarındaki azalma ile mekanizmanın farklı transkripsiyon regülatörleri üzerinde olacağını düşündürür. Bu yolakta yer alan farklı transkripsiyon faktörleri mevcuttur. BDNF dışında c-fos, c-jun gibi farklı transkripsiyon faktörleri de hedeflenmiş olabilir. Asetilkolin molekülü de bir nörotransmitter molekül olmanın yanı sıra gelişim sırasında trofik bir faktör olarak görev alabileceği rapor edilmiştir (186). Artan miktarlarda kolinesteraz enzimlerinin asetilkolin miktarının düzenlenmesinde de görevi vardır. Kolinergik sistem bileşenleri ile asetilkolin azalması Alzheimer Hastalığı

gibi demansların temelinde yer alan kolinerjik hipotezin özünü oluşturur. Ayrıca kolinesterazların farklı gen ürünlerinin c-fos molekülü üzerinden gerçekleştiği rapor edilmiştir (187). Bu çalışmada da benzer şekilde azalan ChE ifadesi de PKU öğrenme bellek mekanizmasının bu yolak ile ilgili olabileceğini düşündürmektedir.

Yaptığımız çalışma ile hem erkek hem dişi PKU gruplarda cAMP/PKA/CREB/BDNF yolağı üzerinden bozulan öğrenme bellek mekanizmasının aydınlatılması literatüre büyük katkı sağlayacaktır. Bu çalışmada PKU erkek sıçanı ile PKU dişi sıçanı arasındaki öğrenme ve bellek farklılıklarını belirlemeye çalıştık. Sonuç olarak, bu çalışma benzer PAH inhibisyon uygulamalarına rağmen, erkek ve dişi PKU arasında anlamlı farklılıklar göstermektedir. Bu bulgular, PKU'de cinsiyete göre uzun vadeli öğrenim ve belleğin bozulmasını anlayabilmek için önemlidir.

Bu çalışmada, motor fonksiyon ve biyokimyasal analizlerdeki farklılıkların, cinsiyet farklılığını göze alarak PKU için yeni tedavi hedeflerini yönlendireceğini düşünüyoruz. Çalışmanın bu nedenle PKU modelinde toplumsal cinsiyete dayalı yeni girişimsel stratejiler geliştirmeye ışık tutacağına inanıyoruz.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

### 6.1. Sonuçlar

Bu tez çalışması fenilketonürde cAMP/PKA/CREB/BDNF yolağını cinsiyet farkına göre değerlendiren ilk çalışmadır.

Fenilketonüri de öğrenme bellek mekanizmasını cAMP/PKA/CREB/BDNF yolağı üzerinden aydınlatmak amacı ile deneysel PKU modeli oluşturuldu. PKU modeli 6 günlük sıçanlara gün aşırı enzim inhibitörü olarak 4-Cl-Fenilalanin ile beraber Phe enjeksiyonu, HPE modeli için ise hergün 11,4 mg/kg Phe enjeksiyonu yapılarak oluşturuldu.

Sıçanlarda lokomotor aktiviteyi belirlemek için 20. ve 21. günlerde açık alan testi yapıldı. Erkek PKU sıçanların kontrol grubu PKU erkek sıçanlara göre lokomotor aktiviteleri azalırken, dişi sıçan gruplarının lokomotor aktiviteleri arasında bir değişiklik tespit edilmedi. Yeni nesne tanıma ve pasif sakınma testlerinde her iki grupta anlamlı bir fark gözlenmedi. Bu durumun PKU grubunda oluşan lokomotor aktivitede azalma ve tam olarak görme duyusunun gelişmemesi ile ilgili olduğu düşünüldü.

Toplam vücut ağırlıklarında ise PKU grubunda kontrol grubuna göre azalma tespit edilirken HPE grubunda artış gözlemlendi.

Deneysel PKU modelinin oluşturulduğunu kanıtlamak için sakrifikasyon sonrası kan Phe seviyeleri HPLC cihazı ile analiz edildi. Analiz sonucu, PKU ve HPE grubu sıçanların Phe düzeyleri kontrol gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı seviyede yüksek bulundu.

Sakrifikasyon sonrası hipokampus dokularından cAMP, PKA, CREB, pCREB ve BDNF seviyeleri kantitatif olarak ELİSA temelli yöntemler ile ölçüldü. Erkek PKU sıçanların kontrol grubu PKU erkek sıçanlara göre PKA aktiviteleri azalırken, dişi PKU grupta PKA aktivitesi ve total CREB seviyelerinde artma tespit edildi.

Hipokampus dokularından RT-qPCR yöntemi ile PKA, CREB, BDNF, AChE ve BChE mRNA ekspresyonları analiz edildi. Kontrol ve deneysel PKU olan sıçanlar arasında cinsiyete göre karşılaştırıldığında PKA mRNA seviyesinde bir değişiklik gözlenmezken, CREB ve BDNF mRNA ekspresyonlarında her iki cinsiyette de PKU



gruplarında azalma tespit edildi. Kolinerjik sistem bileşenleri AChE ve BChE mRNA seviyelerinde ise sadece kontrol gruplarına göre sadece PKU erkek sıçanlarında azalma saptandı.

## 6.2.Öneriler

Fenilketonüri modelinde uygulanan PAH enzim inhibitörünün kullanım dozu ve süresi artırılarak daha etkili bir PKU modeli oluşturulabilir.

Deney hayvan sayısı artırılarak cAMP, PKA, CREB, pCREB ve BDNF seviyeleri farklı hayvan gruplarında düzenli aralıklarla ölçülebilir ve bu sayede değişimin hangi gün/haftada olduğu tespiti edilebilir.

Hayvan sayısını arttırmak analizlerin tek bir beyin bölgesi yerine beyin tamamındaki Phe seviyesi belirlenebilir.

Deney sistemi yetişkin öncesi gerçekleştirilecek ise davranış testlerinde görme temelli testler yerine koku temelli testler tercih edilebilir.

Bir sonra ki çalışmada farklı beyin bölgelerinde cAMP/PKA/CREB/BDNF yolağı ve bu yolakla ilişkili farklı yolaklar araştırılabilir.

Hipokampal cAMP/PKA/CREB yolağının etkilenen son ürünü araştırılabilir.

Son dönemlerde araştırmaların arttığı ekzojen nörotrofik faktör uygulamaları PKU modelinde denenerek olası etkileri araştırılabilir.

## 7. KAYNAKLAR

1. Mitchell JJ, Trakadis YJ, Scriver CR. Phenylalanine hydroxylase deficiency. *Genetics in medicine*. 2011;13(8):697.
2. Blau N, van Spronsen FJ, Levy HL. Phenylketonuria. *The Lancet*. 2010;376(9750):1417-27.
3. Van Wegberg A, MacDonald A, Ahring K, Bélanger-Quintana A, Blau N, Bosch A, et al. The complete European guidelines on phenylketonuria: diagnosis and treatment. *Orphanet journal of rare diseases*. 2017;12(1):162.
4. Lever C, Wills T, Cacucci F, Burgess N, O'Keefe J. Long-term plasticity in hippocampal place-cell representation of environmental geometry. *Nature*. 2002;416(6876):90.
5. Ådén U, Herlenius E, Tang L-Q, Fredholm BB. Maternal caffeine intake has minor effects on adenosine receptor ontogeny in the rat brain. *Pediatric research*. 2000;48(2):177.
6. Huang EJ, Reichardt LF. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annual review of neuroscience*. 2001;24(1):677-736.
7. Brigadski T, Leßmann V. BDNF: a regulator of learning and memory processes with clinical potential. *e-Neuroforum*. 2014;20(1):1-11.
8. Panja D, Bramham CR. BDNF mechanisms in late LTP formation: a synthesis and breakdown. *Neuropharmacology*. 2014;76:664-76.
9. Bekinschtein P, Cammarota M, Medina JH. BDNF and memory processing. *Neuropharmacology*. 2014;76:677-83.
10. Sumaily KM, Mujamammi AH. Phenylketonuria: A new look at an old topic, advances in laboratory diagnosis, and therapeutic strategies. *International journal of health sciences*. 2017;11(5):63.
11. SK D. Inborn errors of metabolism: Challenges and management. *Indian J Clin Biochem*. 2013;23(311):3.
12. Kaufman S. The phenylalanine hydroxylating system from mammalian liver. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology, Volume 35*. 1971:245-319.
13. Fitzpatrick PF. Tetrahydropterin-dependent amino acid hydroxylases. *Annual review of biochemistry*. 1999;68(1):355-81.
14. Bjørge E, de Carvalho RMN, Flatmark T. A comparison of kinetic and regulatory properties of the tetrameric and dimeric forms of wild-type and Thr427→Pro mutant human phenylalanine hydroxylase. *The FEBS Journal*. 2001;268(4):997-1005.
15. Erlandsen H, Patch MG, Gamez A, Straub M, Stevens RC. Structural studies on phenylalanine hydroxylase and implications toward understanding and treating phenylketonuria. *Pediatrics*. 2003;112(Supplement 4):1557-65.
16. Fusetti F, Erlandsen H, Flatmark T, Stevens RC. Structure of tetrameric human phenylalanine hydroxylase and its implications for phenylketonuria. *Journal of Biological Chemistry*. 1998;273(27):16962-7.
17. Bickel H. Influence of phenylalanine intake on phenylketonuria. *Lancet ii*. 1953;812.

18. KENNEDY JL, WERTELECKI W, GATES L, SPERRY BP, CASS VM. The early treatment of phenylketonuria. *American Journal of Diseases of Children*. 1967;113(1):16-21.
19. Seashore MR, Wappner R, Cho S, de la Cruz F, Kronmal RA, Schuett V. Management of phenylketonuria for optimal outcome: a review of guidelines for phenylketonuria management and a report of surveys of parents, patients, and clinic directors. *Pediatrics*. 1999;104(6):e68-e.
20. Walter J, White F, Hall S, MacDonald A, Rylance G, Boneh A, et al. How practical are recommendations for dietary control in phenylketonuria? *The Lancet*. 2002;360(9326):55-7.
21. Trefz F, Maillot F, Motzfeldt K, Schwarz M. Adult phenylketonuria outcome and management. *Molecular genetics and metabolism*. 2011;104:S26-S30.
22. Smith I, Cockburn F, Barwell B, Brenton D, Chapple J, Clark B, et al. Recommendations on the dietary management of phenylketonuria. *Arch Dis Child*. 1993;68(3):426-7.
23. dos Santos LL, de Castro Magalhães M, Januário JN, de Aguiar MJB, Carvalho MRS. The time has come: a new scene for PKU treatment. *Genet Mol Res*. 2006;5(1):33-44.
24. Brumm V, Azen C, Moats R, Stern A, Broomand C, Nelson M, et al. Neuropsychological outcome of subjects participating in the PKU adult collaborative study: a preliminary review. *Journal of inherited metabolic disease*. 2004;27(5):549-66.
25. Channon S, German E, Cassina C, Lee P. Executive functioning, memory, and learning in phenylketonuria. *Neuropsychology*. 2004;18(4):613.
26. Diamond A, Prevor MB, Callender G, Druin DP. Prefrontal cortex cognitive deficits in children treated early and continuously for PKU. *Monographs of the society for research in child development*. 1997:i-206.
27. De Groot M, Hoeksma M, Blau N, Reijngoud D, Van Spronsen F. Pathogenesis of cognitive dysfunction in phenylketonuria: review of hypotheses. *Molecular Genetics and Metabolism*. 2010;99:S86-S9.
28. Hanley WB. Adult phenylketonuria. *The American journal of medicine*. 2004;117(8):590-5.
29. Khemir S, El Asmi M, Sanhaji H, Feki M, Jemaa R, Tebib N, et al. Phenylketonuria is still a major cause of mental retardation in Tunisia despite the possibility of treatment. *Clin Neurol Neurosurg*. 2011;113(9):727-30.
30. Scriver C. Hyperphenylalaninemia: phenylalanine hydroxylase deficiency. *The metabolic and molecular bases of inherited diseases*. 2001:1667-724.
31. Ahring K, Bélanger-Quintana A, Dokoupil K, Ozel HG, Lammardo AM, MacDonald A, et al. Dietary management practices in phenylketonuria across European centres. *Clinical nutrition*. 2009;28(3):231-6.
32. El-Metwally A, Yousef Al-Ahaidib L, Ayman Sunqurah A, Al-Surimi K, Househ M, Alshehri A, et al. The Prevalence of Phenylketonuria in Arab Countries, Turkey, and Iran: A Systematic Review. *BioMed research international*. 2018;2018.
33. Targum SD, Lang W. Neurobehavioral problems associated with phenylketonuria. *Psychiatry (Edgmont)*. 2010;7(12):29-32.

34. Cleary MA. Phenylketonuria. *Paediatrics and Child Health*. 2015;25(3):108-12.
35. Koch J. Robert Guthrie--The PKU Story: Crusade Against Mental Retardation: Hope Publishing House; 1997.
36. İ Ö. VIII. Uluslararası Katılımlı Beslenme ve Metabolik Hastalıklar Kongre Kitabı. 2005. p. 146.
37. Paine RS. The variability in manifestations of untreated patients with phenylketonuria (phenylpyruvic aciduria). *Pediatrics*. 1957;20(2):290-302.
38. Hendriksz C, Walter J. Update on phenylketonuria. *Current Paediatrics*. 2004;14(5):400-6.
39. Surtees R, Blau N. The neurochemistry of phenylketonuria. *Eur J Pediatr*. 2000;159 Suppl 2:S109-S13.
40. Palermo L, Geberhiwot T, MacDonald A, Limback E, Hall SK, Romani C. Cognitive outcomes in early-treated adults with phenylketonuria (PKU): A comprehensive picture across domains. *Neuropsychology*. 2017;31(3):255.
41. Koch R, Burton B, Hoganson G, Peterson R, Rhead W, Rouse B, et al. Phenylketonuria in adulthood: a collaborative study. *Journal of inherited metabolic disease*. 2002;25(5):333-46.
42. Christ SE, Huijbregts SC, de Sonnevile LM, White DA. Executive function in early-treated phenylketonuria: profile and underlying mechanisms. *Molecular Genetics and Metabolism*. 2010;99:S22-S32.
43. Williamson ML, Koch R, Azen C, Chang C. Correlates of intelligence test results in treated phenylketonuric children. *Pediatrics*. 1981;68(2):161-7.
44. Kaufman S. An evaluation of the possible neurotoxicity of metabolites of phenylalanine. *The Journal of pediatrics*. 1989;114(5):895-900.
45. Vockley J, Andersson HC, Antshel KM, Braverman NE, Burton BK, Frazier DM, et al. Phenylalanine hydroxylase deficiency: diagnosis and management guideline. *Genetics in Medicine*. 2014;16(2):188.
46. Lichter-Konecki U, Vockley J. Phenylketonuria: Current treatments and future developments. *Drugs*. 2019;79(5):495-500.
47. Acosta P, Yannicelli S. The Ross metabolic formula system nutrition support protocols. Ross Products Division, Division of Abbott Laboratories. 2001.
48. MacLeod EL, Gleason ST, van Calcar SC, Ney DM. Reassessment of phenylalanine tolerance in adults with phenylketonuria is needed as body mass changes. *Molecular genetics and metabolism*. 2009;98(4):331-7.
49. Walter JH, White FJ. Blood phenylalanine control in adolescents with phenylketonuria. De Gruyter; 2004.
50. Pietz J, Kreis R, Rupp A, Mayatepek E, Boesch C, Bremer HJ. Large neutral amino acids block phenylalanine transport into brain tissue in patients with phenylketonuria. *The Journal of clinical investigation*. 1999;103(8):1169-78.
51. Bartholomé K, Byrd DJ, Kaufman S, Milstien S. Atypical phenylketonuria with normal phenylalanine hydroxylase and dihydropteridine reductase activity in vitro. *Pediatrics*. 1977;59(5):757-61.
52. Schaub J, Däumling S, Curtius H-C, Niederwieser A, Bartholome K, Viscontini M, et al. Tetrahydrobiopterin therapy of atypical phenylketonuria due to defective dihydrobiopterin biosynthesis. *Archives of disease in childhood*. 1978;53(8):674-6.

53. Kuvan™ (Sapropterin Dihydrochloride) prescribing information. BioMarin Pharmaceutical Inc, Novato. 2013. (v5/2015, revised: 07/2015).
54. Trefz FK, Burton BK, Longo N, Casanova MM-P, Gruskin DJ, Dorenbaum A, et al. Efficacy of sapropterin dihydrochloride in increasing phenylalanine tolerance in children with phenylketonuria: a phase III, randomized, double-blind, placebo-controlled study. *The Journal of pediatrics*. 2009;154(5):700-7. e1.
55. Hoskins J, Jack G, Peiris RD, Starr DT, Wade H, Wright E, et al. Enzymatic control of phenylalanine intake in phenylketonuria. *The Lancet*. 1980;315(8165):392-4.
56. Sarkissian CN, Shao Z, Blain F, Peevers R, Su H, Heft R, et al. A different approach to treatment of phenylketonuria: phenylalanine degradation with recombinant phenylalanine ammonia lyase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1999;96(5):2339-44.
57. Sarkissian CN, Gámez A. Phenylalanine ammonia lyase, enzyme substitution therapy for phenylketonuria, where are we now? *Molecular genetics and metabolism*. 2005;86:22-6.
58. Zori R, Thomas JA, Shur N, Rizzo WB, Decker C, Rosen O, et al. Induction, titration, and maintenance dosing regimen in a phase 2 study of pegvaliase for control of blood phenylalanine in adults with phenylketonuria. *Molecular genetics and metabolism*. 2018;125(3):217-27.
59. Thomas J, Levy H, Amato S, Vockley J, Zori R, Dimmock D, et al. Pegvaliase for the treatment of phenylketonuria: results of a long-term phase 3 clinical trial program (PRISM). *Molecular genetics and metabolism*. 2018;124(1):27-38.
60. Longo N, Zori R, Wasserstein MP, Vockley J, Burton BK, Decker C, et al. Long-term safety and efficacy of pegvaliase for the treatment of phenylketonuria in adults: combined phase 2 outcomes through PAL-003 extension study. *Orphanet journal of rare diseases*. 2018;13(1):108.
61. Bothwell M. Recent advances in understanding neurotrophin signaling. *F1000Research*. 2016;5.
62. Vilar M, Mira H. Regulation of Neurogenesis by Neurotrophins during Adulthood: Expected and Unexpected Roles. *Frontiers in neuroscience*. 2016;10:26.
63. Ledda F, Paratcha G. Assembly of neuronal connectivity by neurotrophic factors and leucine-rich repeat proteins. *Frontiers in cellular neuroscience*. 2016;10:199.
64. Bothwell M. Recent advances in understanding neurotrophin signaling. *F1000Research*. 2016;5.
65. Bothwell M. NGF, BDNF, NT3, and NT4. *Handbook of experimental pharmacology*. 2014;220:3-15.
66. Ibanez CF, Andressoo JO. Biology of GDNF and its receptors - Relevance for disorders of the central nervous system. *Neurobiology of disease*. 2017;97(Pt B):80-9.
67. Kerschensteiner M, Stadelmann C, Dechant G, Wekerle H, Hohlfeld R. Neurotrophic cross-talk between the nervous and immune systems: implications for neurological diseases. *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society*. 2003;53(3):292-304.

68. Lindahl M, Saarma M, Lindholm P. Unconventional neurotrophic factors CDNF and MANF: structure, physiological functions and therapeutic potential. *Neurobiology of disease*. 2017;97:90-102.
69. Levi-Montalcini R, Angeletti PU. Essential role of the nerve growth factor in the survival and maintenance of dissociated sensory and sympathetic embryonic nerve cells in vitro. *Developmental biology*. 1963;7:653-9.
70. Bothwell M. Ngf, bdnf, nt3, and nt4. *Neurotrophic factors*: Springer; 2014. p. 3-15.
71. Finkbeiner S, Tavazoie SF, Maloratsky A, Jacobs KM, Harris KM, Greenberg ME. CREB: a major mediator of neuronal neurotrophin responses. *Neuron*. 1997;19(5):1031-47.
72. Chen B, Dowlatshahi D, MacQueen GM, Wang J-F, Young LT. Increased hippocampal BDNF immunoreactivity in subjects treated with antidepressant medication. *Biological psychiatry*. 2001;50(4):260-5.
73. Karege F, Bondolfi G, Gervasoni N, Schwald M, Aubry J-M, Bertschy G. Low brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels in serum of depressed patients probably results from lowered platelet BDNF release unrelated to platelet reactivity. *Biological psychiatry*. 2005;57(9):1068-72.
74. Hashimoto K, Shimizu E, Iyo M. Critical role of brain-derived neurotrophic factor in mood disorders. *Brain research reviews*. 2004;45(2):104-14.
75. Malberg JE, Blendy JA. Antidepressant action: to the nucleus and beyond. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2005;26(12):631-8.
76. Mattson MP, Maudsley S, Martin B. BDNF and 5-HT: a dynamic duo in age-related neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. *Trends in neurosciences*. 2004;27(10):589-94.
77. Numakawa T, Suzuki S, Kumamaru E, Adachi N, Richards M, Kunugi H. BDNF function and intracellular signaling in neurons. *Histology and histopathology*. 2010;25(2):237-58.
78. Yamada K, Mizuno M, Nabeshima T. Role for brain-derived neurotrophic factor in learning and memory. *Life sciences*. 2002;70(7):735-44.
79. Gorski J, Balogh S, Wehner J, Jones K. Learning deficits in forebrain-restricted brain-derived neurotrophic factor mutant mice. *Neuroscience*. 2003;121(2):341-54.
80. Huang EJ, Reichardt LF. Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annual review of biochemistry*. 2003;72(1):609-42.
81. Reichardt LF. Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2006;361(1473):1545-64.
82. Takei N, Kawamura M, Hara K, Yonezawa K, Nawa H. Brain-derived Neurotrophic Factor Enhances Neuronal Translation by Activating Multiple Initiation Processes COMPARISON WITH THE EFFECTS OF INSULIN. *Journal of Biological Chemistry*. 2001;276(46):42818-25.
83. Horwood JM, Dufour F, Laroche S, Davis S. Signalling mechanisms mediated by the phosphoinositide 3-kinase/Akt cascade in synaptic plasticity and memory in the rat. *European Journal of Neuroscience*. 2006;23(12):3375-84.

84. Chiang H-C, Wang L, Xie Z, Yau A, Zhong Y. PI3 kinase signaling is involved in A $\beta$ -induced memory loss in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010;107(15):7060-5.
85. Mizuno M, Yamada K, Takei N, Tran M, He J, Nakajima A, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase: a molecule mediating BDNF-dependent spatial memory formation. *Molecular psychiatry*. 2003;8(2):217.
86. Ortega-Martinez S. A new perspective on the role of the CREB family of transcription factors in memory consolidation via adult hippocampal neurogenesis. *Front Mol Neurosci*. 2015;8:46.
87. Cirulli F, Berry A, Chiarotti F, Alleva E. Intrahippocampal administration of BDNF in adult rats affects short-term behavioral plasticity in the Morris water maze and performance in the elevated plus-maze. *Hippocampus*. 2004;14(7):802-7.
88. Mu J-S, Li W-P, Yao Z-B, Zhou X-F. Deprivation of endogenous brain-derived neurotrophic factor results in impairment of spatial learning and memory in adult rats. *Brain research*. 1999;835(2):259-65.
89. Horch HW, Krüttgen A, Portbury SD, Katz LC. Destabilization of cortical dendrites and spines by BDNF. *Neuron*. 1999;23(2):353-64.
90. Holsinger RD, Schnarr J, Henry P, Castelo VT, Fahnstock M. Quantitation of BDNF mRNA in human parietal cortex by competitive reverse transcription-polymerase chain reaction: decreased levels in Alzheimer's disease. *Molecular Brain Research*. 2000;76(2):347-54.
91. Tapia-Arancibia L, Aliaga E, Silhol M, Arancibia S. New insights into brain BDNF function in normal aging and Alzheimer disease. *Brain research reviews*. 2008;59(1):201-20.
92. Pan W, Banks WA, Fasold MB, Bluth J, Kastin AJ. Transport of brain-derived neurotrophic factor across the blood-brain barrier. *Neuropharmacology*. 1998;37(12):1553-61.
93. Krabbe K, Nielsen A, Krogh-Madsen R, Plomgaard P, Rasmussen P, Erikstrup C, et al. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2007;50(2):431-8.
94. Rasmussen P, Brassard P, Adser H, Pedersen MV, Leick L, Hart E, et al. Evidence for a release of brain-derived neurotrophic factor from the brain during exercise. *Experimental physiology*. 2009;94(10):1062-9.
95. Kerschensteiner M, Gallmeier E, Behrens L, Leal VV, Misgeld T, Klinkert WE, et al. Activated human T cells, B cells, and monocytes produce brain-derived neurotrophic factor in vitro and in inflammatory brain lesions: a neuroprotective role of inflammation? *Journal of Experimental Medicine*. 1999;189(5):865-70.
96. Green MJ, Matheson SL, Shepherd A, Weickert CS, Carr VJ. Brain-derived neurotrophic factor levels in schizophrenia: a systematic review with meta-analysis. *Molecular psychiatry*. 2011;16(9):960-72.
97. Laske C, Stellos K, Hoffmann N, Stransky E, Straten G, Eschweiler GW, et al. Higher BDNF serum levels predict slower cognitive decline in Alzheimer's disease patients. *International Journal of Neuropsychopharmacology*. 2011;14(3):399-404.

98. Egan MF, Kojima M, Callicott JH, Goldberg TE, Kolachana BS, Bertolino A, et al. The BDNF val66met polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function. *Cell*. 2003;112(2):257-69.
99. Lima Giacobbo B, Doorduyn J, Klein HC, Dierckx RAJO, Bromberg E, de Vries EFJ. Brain-Derived Neurotrophic Factor in Brain Disorders: Focus on Neuroinflammation. *Molecular neurobiology*. 2019;56(5):3295-312.
100. Raznahan A, Lee Y, Stidd R, Long R, Greenstein D, Clasen L, et al. Longitudinally mapping the influence of sex and androgen signaling on the dynamics of human cortical maturation in adolescence. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010;107(39):16988-93.
101. Ruigrok AN, Salimi-Khorshidi G, Lai M-C, Baron-Cohen S, Lombardo MV, Tait RJ, et al. A meta-analysis of sex differences in human brain structure. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 2014;39:34-50.
102. Forger NG, Strahan JA, Castillo-Ruiz A. Cellular and molecular mechanisms of sexual differentiation in the mammalian nervous system. *Frontiers in neuroendocrinology*. 2016;40:67-86.
103. Cahill L. Why sex matters for neuroscience. *Nature reviews neuroscience*. 2006;7(6):477.
104. Li F, Zhang J-W, Wei R, Luo X-G, Zhang J-Y, Zhou X-F, et al. Sex-differential modulation of visceral pain by brain derived neurotrophic factor (BDNF) in rats. *Neuroscience letters*. 2010;478(3):184-7.
105. Sohrabji F, Miranda R, Toran-Allerand CD. Identification of a putative estrogen response element in the gene encoding brain-derived neurotrophic factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1995;92(24):11110-4.
106. Singh M, Meyer EM, Simpkins JW. The effect of ovariectomy and estradiol replacement on brain-derived neurotrophic factor messenger ribonucleic acid expression in cortical and hippocampal brain regions of female Sprague-Dawley rats. *Endocrinology*. 1995;136(5):2320-4.
107. Berchtold NC, Kessler JP, Pike CJ, Adlard PA, Cotman CW. Estrogen and exercise interact to regulate brain-derived neurotrophic factor mRNA and protein expression in the hippocampus. *European Journal of Neuroscience*. 2001;14(12):1992-2002.
108. Kiss Á, Delattre AM, Pereira SI, Carolino RG, Szawka RE, Anselmo-Franci JA, et al. 17 $\beta$ -estradiol replacement in young, adult and middle-aged female ovariectomized rats promotes improvement of spatial reference memory and an antidepressant effect and alters monoamines and BDNF levels in memory-and depression-related brain areas. *Behavioural brain research*. 2012;227(1):100-8.
109. Scharfman HE, Mercurio TC, Goodman JH, Wilson MA, MacLusky NJ. Hippocampal excitability increases during the estrous cycle in the rat: a potential role for brain-derived neurotrophic factor. *Journal of Neuroscience*. 2003;23(37):11641-52.
110. Solum DT, Handa RJ. Estrogen regulates the development of brain-derived neurotrophic factor mRNA and protein in the rat hippocampus. *Journal of Neuroscience*. 2002;22(7):2650-9.



111. Fusani L, Metzdorf R, Hutchison JB, Gahr M. Aromatase inhibition affects testosterone-induced masculinization of song and the neural song system in female canaries. *Journal of neurobiology*. 2003;54(2):370-9.
112. Yang CF, Shah NM. Representing sex in the brain, one module at a time. *Neuron*. 2014;82(2):261-78.
113. Venezia AC, Guth LM, Sapp RM, Spangenburg EE, Roth SM. Sex-dependent and independent effects of long-term voluntary wheel running on Bdnf mRNA and protein expression. *Physiology & behavior*. 2016;156:8-15.
114. Munro CA. Sex differences in Alzheimer's disease risk: are we looking at the wrong hormones? *International psychogeriatrics*. 2014;26(10):1579-84.
115. Borrow AP, Cameron NM. Estrogenic mediation of serotonergic and neurotrophic systems: implications for female mood disorders. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 2014;54:13-25.
116. Sohrabji F, Lewis DK. Estrogen–BDNF interactions: implications for neurodegenerative diseases. *Frontiers in neuroendocrinology*. 2006;27(4):404-14.
117. Mielke MM, Vemuri P, Rocca WA. Clinical epidemiology of Alzheimer's disease: assessing sex and gender differences. *Clinical epidemiology*. 2014;6:37.
118. Kandel ER. The molecular biology of memory: cAMP, PKA, CRE, CREB-1, CREB-2, and CPEB. *Molecular brain*. 2012;5(1):14.
119. Jahan S, Singh S, Srivastava A, Kumar V, Kumar D, Pandey A, et al. PKA-GSK3 $\beta$  and  $\beta$ -catenin signaling play a critical role in trans-resveratrol mediated neuronal differentiation in human cord blood stem cells. *Molecular neurobiology*. 2018;55(4):2828-39.
120. Barco A, Bailey CH, Kandel ER. Common molecular mechanisms in explicit and implicit memory. *Journal of neurochemistry*. 2006;97(6):1520-33.
121. Grimes MT, Harley CW, Darby-King A, McLean JH. PKA increases in the olfactory bulb act as unconditioned stimuli and provide evidence for parallel memory systems: pairing odor with increased PKA creates intermediate-and long-term, but not short-term, memories. *Learning & memory*. 2012;19(3):107-15.
122. Jiang H, Zhang X, Wang Y, Zhang H, Li J, Yang X, et al. Mechanisms underlying the antidepressant response of acupuncture via PKA/CREB signaling pathway. *Neural plasticity*. 2017;2017.
123. Zhong Y, Zhu Y, He T, Li W, Yan H, Miao Y. Rolipram-induced improvement of cognitive function correlates with changes in hippocampal CREB phosphorylation, BDNF and Arc protein levels. *Neuroscience letters*. 2016;610:171-6.
124. Nakagawa S, Kim J-E, Lee R, Chen J, Fujioka T, Malberg J, et al. Localization of phosphorylated cAMP response element-binding protein in immature neurons of adult hippocampus. *Journal of Neuroscience*. 2002;22(22):9868-76.
125. Fujioka T, Fujioka A, Duman RS. Activation of cAMP signaling facilitates the morphological maturation of newborn neurons in adult hippocampus. *Journal of Neuroscience*. 2004;24(2):319-28.
126. Ao H, Ko SW, Zhuo M. CREB activity maintains the survival of cingulate cortical pyramidal neurons in the adult mouse brain. *Molecular brain*. 2006;2(1):15.

127. Brightwell JJ, Smith CA, Neve RL, Colombo PJ. Long-term memory for place learning is facilitated by expression of cAMP response element-binding protein in the dorsal hippocampus. *Learning & memory*. 2007;14(3):195-9.
128. Rosenegger D, Parvez K, Lukowiak K. Enhancing memory formation by altering protein phosphorylation balance. *Neurobiology of learning and memory*. 2008;90(3):544-52.
129. Benito E, Barco A. CREB's control of intrinsic and synaptic plasticity: implications for CREB-dependent memory models. *Trends in neurosciences*. 2010;33(5):230-40.
130. Wang C, Guo J, Guo R. Effect of XingPiJieYu decoction on spatial learning and memory and cAMP-PKA-CREB-BDNF pathway in rat model of depression through chronic unpredictable stress. *BMC complementary and alternative medicine*. 2017;17(1):73.
131. Li X, Guo C, Li Y, Li L, Wang Y, Zhang Y, et al. Ketamine administered pregnant rats impair learning and memory in offspring via the CREB pathway. *Oncotarget*. 2017;8(20):32433-49.
132. Luo Y, Kuang S, Li H, Ran D, Yang J. cAMP/PKA-CREB-BDNF signaling pathway in hippocampus mediates cyclooxygenase 2-induced learning/memory deficits of rats subjected to chronic unpredictable mild stress. *Oncotarget*. 2017;8(22):35558-72.
133. Simon KR, dos Santos RM, Scaini G, Leffa DD, Damiani AP, Furlanetto CB, et al. DNA damage induced by phenylalanine and its analogue p-chlorophenylalanine in blood and brain of rats subjected to a model of hyperphenylalaninemia. *Biochemistry and Cell Biology*. 2013;91(5):319-24.
134. Hagen MEK, Pederzoli CD, Sgaravatti AM, Bridi R, Wajner M, Wannmacher CM, et al. Experimental hyperphenylalaninemia provokes oxidative stress in rat brain. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. 2002;1586(3):344-52.
135. Diemel GA, Cruz NF. Biochemical, metabolic, and behavioral characteristics of immature chronic hyperphenylalanemic rats. *Neurochemical research*. 2016;41(1-2):16-32.
136. Mishra PK, Kutty BM, Laxmi TR. The impact of maternal separation and isolation stress during stress hypo-responsive period on fear retention and extinction recall memory from 5-week- to 1-year-old rats. *Exp Brain Res*. 2019;237(1):181-90.
137. Belzung C, Griebel G. Measuring normal and pathological anxiety-like behaviour in mice: a review. *Behavioural brain research*. 2001;125(1-2):141-9.
138. Pirondi S, Kuteeva E, Giardino L, Ferraro L, Antonelli T, Bartfai T, et al. Behavioral and neurochemical studies on brain aging in galanin overexpressing mice. *Neuropeptides*. 2005;39(3):305-12.
139. ETHOVISION XT AND THE OPEN FIELD TEST. 19 FEBRUARY, 2016.
140. Mathiasen JR, DiCamillo A. Novel object recognition in the rat: a facile assay for cognitive function. *Curr Protoc Pharmacol*. 2010;Chapter 5:5.59.
141. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical biochemistry*. 1987;162(1):156-9.

142. Livak KJ, Wills QF, Tipping AJ, Datta K, Mittal R, Goldson AJ, et al. Methods for qPCR gene expression profiling applied to 1440 lymphoblastoid single cells. *Methods*. 2013;59(1):71-9.
143. van Holst G-J, Clarke AE. Quantification of arabinogalactan-protein in plant extracts by single radial gel diffusion. *Analytical biochemistry*. 1985;148(2):446-50.
144. Olson BJ, Markwell J. Assays for determination of protein concentration. *Current protocols in protein science*. 2007;48(1):3.4. 1-3.4. 29.
145. Fuller HR, Goodwin PR, Morris GE. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the major crustacean allergen, tropomyosin, in food. *Food and agricultural immunology*. 2006;17(1):43-52.
146. Mariager B, SØve M, Eriksen H, Brogren CH. Bovine  $\beta$ -lactoglobulin in hypoallergenic and ordinary infant formulas measured by an indirect competitive ELISA using monoclonal and polyclonal antibodies. *Food and Agricultural immunology*. 1994;6(1):73-83.
147. Sletten G, Løvberg K, Moen L, Skarpeid H-J, Egaas E. A comparison of time-resolved fluoroimmunoassay and ELISA in the detection of casein in foodstuffs. *Food and agricultural immunology*. 2005;16(3):235-43.
148. Teuber SS, Sathe SK, Peterson WR, Roux KH. Characterization of the soluble allergenic proteins of cashew nut (*Anacardium occidentale* L.). *Journal of agricultural and food chemistry*. 2002;50(22):6543-9.
149. Sakai S, Adachi R, Akiyama H, Teshima R. Validation of quantitative and qualitative methods for detecting allergenic ingredients in processed foods in Japan. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2013;61(24):5675-80.
150. Konstantinou GN. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Food Allergens: Springer*; 2017. p. 79-94.
151. Hasselmo ME. The role of acetylcholine in learning and memory. *Current opinion in neurobiology*. 2006;16(6):710-5.
152. van Spronsen FJ, van Wegberg AM, Ahring K, Bélanger-Quintana A, Blau N, Bosch AM, et al. Key European guidelines for the diagnosis and management of patients with phenylketonuria. *The lancet Diabetes & endocrinology*. 2017;5(9):743-56.
153. Jahja R, van Spronsen FJ, de Sonnevile LM, van der Meere JJ, Bosch AM, Hollak CE, et al. Social-cognitive functioning and social skills in patients with early treated phenylketonuria: a PKU-COBESO study. *Journal of inherited metabolic disease*. 2016;39(3):355-62.
154. Andersen AE, Guroff G. Enduring behavioral changes in rats with experimental phenylketonuria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1972;69(4):863-7.
155. Bruinenberg VM. Phenylketonuria in mice and men: Rijksuniversiteit Groningen; 2017.
156. Bruinenberg VM, van der Goot E, van Vliet D, de Groot MJ, Mazzola PN, Heiner-Fokkema MR, et al. The behavioral consequence of phenylketonuria in mice depends on the genetic background. *Frontiers in behavioral neuroscience*. 2016;10:233.

157. Fiori E, Oddi D, Ventura R, Colamartino M, Valzania A, D'Amato FR, et al. Early-onset behavioral and neurochemical deficits in the genetic mouse model of phenylketonuria. *PloS one*. 2017;12(8):e0183430.
158. Chan CB, Ye K. Sex differences in brain-derived neurotrophic factor signaling and functions. *Journal of neuroscience research*. 2017;95(1-2):328-35.
159. Peng Y, Zhang C, Su Y, Wang Z, Jiang Y. Activation of the hippocampal AC-cAMP-PKA-CREB-BDNF signaling pathway using WTKYR in depression model rats. *Electrophoresis*. 2018.
160. Li X, Guo C, Li Y, Li L, Wang Y, Zhang Y, et al. Ketamine administered pregnant rats impair learning and memory in offspring via the CREB pathway. *Oncotarget*. 2017;8(20):32433.
161. Liu J, Liu Y, Wang XF, Chen H, Yang N. Antenatal taurine supplementation improves cerebral neurogenesis in fetal rats with intrauterine growth restriction through the PKA-CREB signal pathway. *Nutritional neuroscience*. 2013;16(6):282-7.
162. Mirisis AA, Alexandrescu A, Carew TJ, Kopec AM. The contribution of spatial and temporal molecular networks in the induction of long-term memory and its underlying synaptic plasticity. *AIMS neuroscience*. 2016;3(3):356.
163. Chen T, Zhu J, Yang L-K, Feng Y, Lin W, Wang Y-H. Glutamate-induced rapid induction of Arc/Arg3.1 requires NMDA receptor-mediated phosphorylation of ERK and CREB. *Neuroscience letters*. 2017;661:23-8.
164. Li Z-Y, Huang Y, Yang Y-T, Zhang D, Zhao Y, Hong J, et al. Moxibustion eases chronic inflammatory visceral pain through regulating MEK, ERK and CREB in rats. *World journal of gastroenterology*. 2017;23(34):6220.
165. Shi YQ, Huang TW, Chen LM, Pan XD, Zhang J, Zhu YG, et al. Ginsenoside Rg1 attenuates amyloid-beta content, regulates PKA/CREB activity, and improves cognitive performance in SAMP8 mice. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*. 2010;19(3):977-89.
166. Sakamoto K, Karelina K, Obrietan K. CREB: a multifaceted regulator of neuronal plasticity and protection. *Journal of neurochemistry*. 2011;116(1):1-9.
167. Lin R, Lin Y, Tao J, Chen B, Yu K, Chen J, et al. Electroacupuncture ameliorates learning and memory in rats with cerebral ischemia-reperfusion injury by inhibiting oxidative stress and promoting p-CREB expression in the hippocampus. *Molecular medicine reports*. 2015;12(5):6807-14.
168. Chen X, Wang X, Tang L, Wang J, Shen C, Liu J, et al. Nhe5 deficiency enhances learning and memory via upregulating Bdnf/TrkB signaling in mice. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics*. 2017;174(8):828-38.
169. Lin R, Li X, Liu W, Chen W, Yu K, Zhao C, et al. Electro-acupuncture ameliorates cognitive impairment via improvement of brain-derived neurotropic factor-mediated hippocampal synaptic plasticity in cerebral ischemia-reperfusion injured rats. *Experimental and therapeutic medicine*. 2017;14(3):2373-9.
170. Diógenes MJ, Costenla AR, Lopes LV, Jerónimo-Santos A, Sousa VC, Fontinha BM, et al. Enhancement of LTP in aged rats is dependent on endogenous BDNF. *Neuropsychopharmacology*. 2011;36(9):1823.

171. Lee S, Campomanes C, Sikat P, Greenfield A, Allen P, McEwen B. Estrogen induces phosphorylation of cyclic AMP response element binding (pCREB) in primary hippocampal cells in a time-dependent manner. *Neuroscience*. 2004;124(3):549-60.
172. Konkle AT, McCarthy MM. Developmental time course of estradiol, testosterone, and dihydrotestosterone levels in discrete regions of male and female rat brain. *Endocrinology*. 2011;152(1):223-35.
173. Frick KM, Kim J, Tuscher JJ, Fortress AM. Sex steroid hormones matter for learning and memory: estrogenic regulation of hippocampal function in male and female rodents. *Learning & Memory*. 2015;22(9):472-93.
174. Karczmar AG. Brief presentation of the story and present status of studies of the vertebrate cholinergic system. *Neuropsychopharmacology*. 1993;9(3):181-99.
175. Everitt BJ, Robbins TW. Central cholinergic systems and cognition. *Annual review of psychology*. 1997;48(1):649-84.
176. Gold PE. Acetylcholine: cognitive and brain functions. *Neurobiology of learning and memory (Print)*. 2003;80(3).
177. Collerton D. Cholinergic function and intellectual decline in Alzheimer's disease. *Neuroscience*. 1986;19(1):1-28.
178. Francis PT, Palmer AM, Snape M, Wilcock GK. The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*. 1999;66(2):137-47.
179. McKeith I, Mintzer J, Aarsland D, Burn D, Chiu H, Cohen-Mansfield J, et al. International psychogeriatric association expert meeting on DLB. Dementia with Lewy bodies *Lancet Neurol*. 2004;3(1):19-28.
180. Huerta PT, Lisman JE. Bidirectional synaptic plasticity induced by a single burst during cholinergic theta oscillation in CA1 in vitro. *Neuron*. 1995;15(5):1053-63.
181. Adams SV, Winterer J, Müller W. Muscarinic signaling is required for spike-pairing induction of long-term potentiation at rat Schaffer collateral-CA1 synapses. *Hippocampus*. 2004;14(4):413-6.
182. Cheong MY, Yun SH, Mook-Jung I, Joo I, Huh K, Jung MW. Cholinergic modulation of synaptic physiology in deep layer entorhinal cortex of the rat. *Journal of neuroscience research*. 2001;66(1):117-21.
183. Patil MM, Linster C, Lubenov E, Hasselmo ME. Cholinergic agonist carbachol enables associative long-term potentiation in piriform cortex slices. *Journal of neurophysiology*. 1998;80(5):2467-74.
184. Perry EK. The cholinergic system in old age and Alzheimer's disease. *Age and ageing*. 1980;9(1):1-8.
185. Atack JR, Perry EK, Bonham JR, Candy JM, Perry RH. Molecular forms of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in the aged human central nervous system. *Journal of neurochemistry*. 1986;47(1):263-77.
186. Landgraf D, Barth M, Layer PG, Sperling LE. Acetylcholine as a possible signaling molecule in embryonic stem cells: studies on survival, proliferation and death. *Chem Biol Interact*. 2010;187(1-3):115-9.
187. Shaltiel G, Hanan M, Wolf Y, Barbash S, Kovalev E, Shoham S, et al. Hippocampal microRNA-132 mediates stress-inducible cognitive deficits through its acetylcholinesterase target. *Brain Struct Funct*. 2013;218(1):59-72.