

Araştırma Makalesi

Mersin Univ Sağlık Bilim Derg 2019;12(2):210-219

doi: 10.26559/mersinsbd.489911

Stres ve menopozun öğrenme üzerindeki etkileri

Mehmet Berköz¹, Fatma Rezan Hatungil², Ali Erdinç Yalın³, Ülkü Çömelekoğlu⁴, Serap Yalın³, Hüseyin Beydağı⁵, Bora Reşitoğlu⁶, Nefise Özlen Şahin⁷, Pelin Eroğlu⁸

¹Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Van

²Toros Üniversitesi, Sağlık Bilimleri YO, Hemşirelik ve Sağlık Hz. Bölümü, Mersin

³Mersin Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Mersin

⁴Mersin Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyofizik Anabilim Dalı, Mersin

⁵Özel Beydağı Polikliniği, Mersin

⁶Mersin Üniversitesi, SHMYO, Anestezi (İkmep) Programı, Mersin

⁷Mersin Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Biyoteknoloji AD, Mersin

⁸Mersin Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Mersin

Öz

Amaç: Bu çalışmada stres ve menopozun birlikte, öğrenme işlevi üzerindeki etkileri araştırılmıştır. **Yöntem:** Çalışmada, 60 adet dişi Wistar-Albino sıçan kullanılmıştır. Bu sıçanlar randomize olarak kontrol (Grup I), deneysel immobilizasyon stres modeli (Grup II), deneysel menopoz modeli (Grup III) ve deneysel menopoz modeli + deneysel stres modeli (Grup IV) olmak üzere her bir grupta 15'er hayvan bulunan 4 gruba ayrılmıştır. Tüm sıçanların uzun dönemdeki bilişsel ve motor yetileri davranış deneyleri (açık alan ve Morris su tankı) ile değerlendirilmiştir. Ayrıca hipotalamus-hipofiz-adrenal ekseninin geribildirim işlevinde merkezi konumunda olan kortikosteroid reseptör (Glukokortikoid reseptörü ve mineralokortikoid reseptörü) gen ekspresyonu mRNA izolasyonu ve cDNA sentezi takibinde SYBR Green kullanılarak eş zamanlı PCR yöntemiyle incelenmiştir. **Bulgular:** Tüm grupların kendi içinde günlere göre ortalama yükseltiyi bulma sürelerinin karşılaştırmasında, birinci günden 4. güne kadar, tüm gruplarda her günün ortalama yükseltiyi bulma sürelerinin bir önceki günden istatistiksel olarak anlamlı düzeyde kısa olduğu saptanmıştır ($p < 0.001$). Güne göre yükseltiyi bulma sürelerinin gruplar arasında karşılaştırmasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p > 0.05$). Açık alan deneyinde ortalama katedilen mesafenin gruplara göre karşılaştırmasında grup II en düşük ortalama mesafeye sahip olmasına karşın, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p > 0.05$). Hipokampal dokuda hem glukokortikoid reseptörünün hem de mineralokortikoid reseptörünün gen ekspresyonu tüm gruplarda kontrol grubuna kıyasla düşük bulunmuştur. Ancak bu düşüş istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0.05$). **Sonuç:** Bu sonuç akut immobilizasyon stresin ve deneysel menopoz modelinin öğrenme üzerinde etkili olmadığını düşündürmüştür.

Anahtar Kelimeler: Stres, menopoz, öğrenme, hipotalamus-hipofiz-adrenal aksı, kortikosteroid reseptörleri

Yazının geliş tarihi: 29.11.2018 **Yazının kabul tarihi:** 28.12.2018

Sorumlu Yazar: Dr. Öğretim Üyesi Mehmet Berköz, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Zeve Kampüsü, Tuşba, Van, Tlf: 0 432 2251271 / 21156, E-posta: mehmet_berkoz@yahoo.com

The effects of stress and menopause on learning

Abstract

Aim: In this study, we aimed to investigate the co-effect of stress and menopause on the learning ability in rats. **Methods:** 60 female Wistar-Albino rats were used in this study and were randomly divided into four groups (15 rats per group) as follows: Control group (Group I), experimental immobilization stress model (Group II), experimental menopause model (Group III), and experimental menopause model + experimental stress model (Group IV). Long-term cognitive and motor abilities of all rats were evaluated by conducting behaviour experiments (open field and morris water maze test). Furthermore, the gene expression of corticosteroid receptor (glucocorticoid receptor and mineralocorticoid receptor) was examined by Real-Time PCR using SYBR Green followed by mRNA isolation and cDNA synthesis. **Results:** In the comparison study of in-group time for attaining mean elevation over days, it was detected that time for attaining mean elevation was statistically significantly shorter than previous day from 1st day to 4th ($p < 0.001$). There was no statistical significance for daily time for mean elevation among the groups ($p > 0.05$). In the open area experiment, although the Group II exhibited shorter mean when comparing the progressed distances, but the difference among the groups was not statistically significant ($p > 0.05$). Gene expression of both glucocorticoid receptor and mineralocorticoid receptor in the hippocampal tissue was determined to be lower in comparison with the control group. However, this decrease was not statistically significant ($p > 0.05$). **Conclusion:** This result shows that acute immobilization stress and experimental menopause model is not efficient on the learning ability in rats.

Keywords: Stress, menopause, learning, hypothalamus-pituitary-adrenal axis, corticosteroid receptors

Giriş

İnsan çalışmalarında in vivo ve in vitro kanıtlar, bilişsel bozuklukların ve hastalıkların ortaya çıkmasında, nöroendokrin değişikliklerin ve stresin nedeni etkili olduğunu göstermektedir.¹ Organizma stres etmeni ile karşılaştığında, hem fizyolojik hem psikolojik düzeyde bir dizi olaylar meydana gelmektedir. Fizyolojik stres tepkisinin özelliği, stres vericilerin türüne bağlı olmaksızın ortaya çıkan sabit bir tepki olmasıdır.² Fiziksel, sosyal, psikolojik pek çok stres etmeni bulunmaktadır. Üzerinde en çok çalışılan stres modeli immobilizasyon (hareketsizlik) stresidir. Stres yanıtında esas rolü, klasik nöroendokrin eksen düzeninde olan hipotalamus-hipofiz-adrenal (HPA) eksen oynamaktadır. HPA eksen aktivitesi başta amigdala ve hipokampus gibi limbik sisteme ait yapılar ve prefrontal korteks olmak üzere beyinde birçok bölge tarafından düzenlenmektedir. HPA ekseninin aktivitesinin negatif geribildirim yoluyla inhibisyonu veya aktivasyonunda, hipokampus en büyük rolü oynamaktadır.³

HPA ekseninin geribildirim düzenlenmesinde rol oynayan iki kortikosteroid reseptörü vardır. Bunlardan mineralokortikoid reseptörü (MR), hipokampusta yüksek oranda eksprese edilmekte olup kortikosteronun, MR'e 10 kat daha fazla eğilimi bulunmaktadır. İkincisi ise Glukokortikoid reseptörüdür (GR). Hipokampusta, geribildirim düzenlemeyi kolaylaştırmak üzere çok fazla miktarda MR ve GR mevcuttur. MR ve GR arasındaki bir dengesizliğin etkisi ile eksitator uyarılara karşı, HPA ekseninin yanıtı değişmektedir.^{4,5} Strese verilen yanıt, gonadlar ve adrenal eksen arasındaki çapraz iletişimden de etkilenmektedir. Bu bulgu stresle ilintili belirli hastalıkların seks bağlantılı olma nedenlerini açıklamaktadır. Kadınlar erkeklere oranla daha çok kortizol yanıt üretmektedirler.⁶ HPA eksen fonksiyonunu testosteron engellerken, estradiol artırmaktadır.⁷ Menopoz sırasında, nörodejenerasyonun artması estradiolün azalması ile ilgilidir. Östrojenin nöroprotektif bir hormon olduğu bilinmektedir. Estradiol çeşitli mekanizmalarla, mesencefalik dopaminerjik

nöronların nörodejenerasyonunu inhibe etmektedir.⁸

Yaşamın her döneminde ve günlük hayatta her an karşılaşılan stres, kişilerin öğrenme ve bellek fonksiyonlarını bozmakta ve yaşamını zorlaştırmaktadır.^{1,3} Menopoz döneminde de östrojen azalmasına bağlı olarak öğrenme eksiklikleri ortaya çıkmaktadır. Menopoz ve stres nedeniyle, öğrenme ve bellek fonksiyonlarında kayıplarla karşılaşan insanların yaşam kaliteleri ve başarımları azalacaktır.^{1,8,9} Bireylerin kendi kendine yetebilmeleri, çevrelerine, topluma zorluk vermemeleri ve onların yaşam kalitesini yükseltebilmeleri amacı ile menopozun ve stresin öğrenme üzerindeki olumsuz etkilerinin açıklığa kavuşturulması, bu konuda bir farkındalık oluşturulması için önem taşımaktadır. Bu çalışmada menopoz ve stresin anksiyete, bellek, öğrenme ve HPA ekseninin geribildirim işlevinde merkezi konumunda olan GR ve MR gen ekspresyonları üzerindeki etkileri incelenmiştir.

Yöntem

Bu çalışmada Mersin Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Merkezinden temin edilen 60 adet 200-250 g ağırlığında (90 günlük) dişi Wistar-Albino sıçanlar kullanılmıştır. Bu sıçanlar randomize olarak kontrol (Grup I), deneysel immobilizasyon stres modeli (Grup II), deneysel menopoz modeli (Grup III) ve deneysel menopoz modeli + deneysel immobilizasyon stres modeli (Grup IV) olmak üzere her bir grupta 15'er hayvan bulunan 4 gruba ayrılmıştır. Sıçanların bir hafta önceden laboratuvar koşullarına uyumları sağlanmış olup yem ve su tüketimleri sınırlanmamıştır. Sıçanlar deney boyunca sıcaklığı $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ ve nem oranı $\%55\pm 10$ olan bir odada tutulmuşlardır. Hayvanların bulunduğu laboratuvarın havalandırılması pencere tipi aspiratör vasıtasıyla sağlanmış ve aydınlatılma için 12 saat aydınlık-12 saat karanlık esasına riayet edilmiştir. Sıçanlara ilaç uygulaması her sabah 09.00-10.00 arasında yapılmıştır. Sakrifikasyondan önceki 12 saat boyunca sıçanlara yem verilmemiştir. Yapılan çalışma için Mersin

Üniversitesi Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulu'ndan etik kurul onayı alınmıştır.

Deneysel menopoz modeli oluşturmak için sıçanlara overektomi işlemi uygulandı. Hayvanların bellek ve öğrenme performansları Morris su tankı deneyi ile belirlendi. Hayvanların anksiyete düzeyi açık alan testi ile bellek ve öğrenme performansları ise Morris su tankı ile belirlendi. Ayrıca HPA ekseninin geribildirim işlevinde merkezi konumunda olan GR ve MR mRNA gen ekspresyonu incelendi.

Çalışmamızda Grup III ve Grup IV'deki hayvanlara overektomi işlemi uygulandı. Bunun için intraperitoneal olarak uygulanan ketamin (60 $\mu\text{g}/\text{kg}$ i.p.) ve xylazine (20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ i.p.) anestezisi altındaki dişi sıçanların operasyon bölgesindeki tüyler temizlenip, bölge batikon ile silindikten sonra, abdominal kaviteyi açıldı, sağ ve sol tuba uterileri bulunarak, proksimal ve distal uçları klamplenmiş overler izole edildi. Açıkta kalan tuba uçları ise '0000 krome katgüt' ile ligate edildi. Operasyon bittikten sonra, abdominal kavite ve cilt dokusu dikilmiş ve enfeksiyon gelişimini önlemek amacıyla batikon ile pansuman yapıldı. Operasyon sırasında kullanılan tüm cerrahi malzeme, operasyon öncesinde ve sonrasında sterilize edildi.

Çalışmamızda Grup II ve Grup IV'deki hayvanlara anksiyete oluşturmak amacıyla akut immobilizasyon stresi uygulandı. Akut immobilizasyon, erişkin sıçanların içinde hareket etmelerine olanak vermeyecek boyutlarda olan tel, pleksiglas vb maddelerden yapılmış kafeslerde hayvanların belirli periyotlarda, gün içinde belirli bir süre tutulmaları ile oluşturulmaktadır. Çalışmamızda 6 cm çapında 12 cm yüksekliğinde pleksiglas silindirler kullanıldı. Hayvanlara davranış testlerinden önce 10 dakika immobilizasyon stresi uygulandı ve bu süre içinde rahat solumaları ve ısı stresi altında kalmamaları sağlandı. Daha önce el temasına alıştırmış hayvanların kafeslere yerleştirme sırasında ek bir stres yaşamamalarına dikkat edildi.

Açık Alan Testi

Bir kenarı 100 cm duvar yüksekliği 40 cm olan kare şeklindeki bir alana 5 dakika süreyle bırakılan sıçanın davranışı bir kamera yardımıyla kaydedilip Ethovision programıyla analizi yapıldı ve anksiyete düzeyi değerlendirildi.

Morris Su Tankı Deneyi

Sıçanlara saat 09:00-14:00 arasında ve beş gün süreyle morris su tankı deneyi uygulandı. Bilgisayar ekranındaki görüntü üzerinden 150 cm çapındaki su tankı batı, kuzey, doğu ve güney olmak üzere dört eşit kadrana ayrıldı. Tank 42 cm derinlik olacak şekilde ve $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ sıcaklığında su ile dolduruldu. Deneyin ilk dört gününde 15 cm çaplı yükselti su altında gizlenecek şekilde 40 cm yüksekliğe ayarlanıp, yeri sabit olmak üzere doğu kadrانının orta noktasına yerleştirildi. Deneyin ilk günü tüm sıçanlar batı kadrانından başlanıp saat yönünde ilerleyerek her kadrانından günde bir kez olmak kaydıyla toplam dört kez, başları su tankı duvarına dönük olarak suya bırakıldı ki bu işleme atış adı verilmektedir. Sıçanlar her atışta 60 s süre ile yüzdürüldü. Bu süre içinde yükselti üzerine çıkan, 5 s orada kalan sıçanlar deneyin bu aşamasını tamamlamış kabul edilerek 15 s süreyle yükselti üzerinde kalmalarına izin verildi. 60 s içinde yükseltiyi bulamayan sıçanlar elle yönlendirilerek yükseltiyi bulmaları ve 15 s süreyle yükselti üzerinde kalmaları sağlandı. Deneyin 2, 3 ve 4. günlerinde saat yönünde ilerleyerek ilk atışların hergün farklı bir kadrانından yapılması sağlanarak dört gün süresince her atışta yükseltiyi bulma süresi (YBS) kaydedildi. Her grubun 1., 2., 3. ve 4. günlerdeki ortalama YBS'leri hesaplanıp bu süreler her grup için kendi içinde birbirleriyle ve her gün için gruplar arasında karşılaştırıldı. Ayrıca 1. gün ile 4. gün arasındaki YBS farkı da gruplar arasında karşılaştırıldı. Deneyin beşinci günü doğu kadrانındaki yükselti su tankından çıkartıldı. Tüm sıçanlar yükseltinin eskiden olduğu kadrانının karşısında yer alan batı kadrانından bir kez suya bırakıldı ve 60 s süreyle yüzdürüldü. Bu süre sonunda eskiden yükseltinin olduğu doğu kadrانında ortalama geçirdikleri süre (s), yüzme hızları (cm/s) katettikleri

mesafeler (cm) kaydedildi ve gruplar arasında karşılaştırma yapıldı.⁹

Kortikosteroid Reseptör Genlerinin Ekspresyonunun Ölçülmesi

Çalışmamızda kullanılan tüm sıçanların beyin hipokampal dokuları steril petride serum fizyolojik ile yıkandıktan sonra RNA izolasyonuna uygun büyüklüklerde steril bistüri ile küçük parçalara ayrıldı. Örnekler analiz gününe kadar -80°C ' de saklandı. Doku örneklerinden RNA izolasyonu işlemi dokudan RNA izolasyon kiti (Qiagen RNeasy Mini Kit, USA) kullanılarak, üretici firmanın tavsiye ettiği protokole göre yapıldı. Kontaminasyonu engellemek amacı ile işlemler güvenlik kabini içerisinde gerçekleştirildi. Elde edilen RNA'lar spektrofotometre'de (RNA için 260 nm'de, protein için 280 nm) ölçülerek nanogram/mikrolitre (ng/ μL) miktarları ve saflıkları belirlendi.

cDNA elde etmek için Promega (Madison, WI, USA) ticari RT-PCR kiti kullanıldı ve aşağıdaki işlemler sırası ile uygulandı. Oligo (dT) 15 primer kullanılarak toplamda 20 μL 'lik reaksiyon ortamı hazırlandı.

Hazırlanan reaksiyon ortamı 42°C 'de 15 dakika ve 95°C 'de 5 dakika inkübe edildikten sonra reaksiyon ortamında bulunan AMV revers transkriptazını inhibe etmek ve cDNA'ya bağlanmasını inhibe etmek için 4°C 'de 5 dakika inkübe edilerek enzim inhibisyonu sağlandı.

MR ve GR genlerinin ifadenmesinin kantitatif değerlendirilmesi için LightCycler 480 II (Roche, Germany) cihazı kullanıldı. Amplifikasyonlar 10 μL toplam tepkime hacmi içerisinde, cDNA ve uygun primerler eşliğinde LC FastStart DNA SYBR Green I karışımı kullanılarak gerçekleştirildi.¹⁰ MR ve GR genlerinin ekspresyonlarını normalize etmek için elde edilen cDNA örnekleri, gliseraldehidfosfat dehidrogenaz (GAPDH) genine özgü primerler kullanılarak da çalışıldı. Gene özgü primerler ile LC FastStart DNA SYBR Green I karışımı ve elde edilen cDNA'lar kullanılarak LightCycler 480 II (Roche, Germany) cihazında Real-time

PCR tepkimesi gerçekleştirildi. Reaksiyon sonucu her bir bireye ait *MR*, *GR* ve *GAPDH* mRNA düzeyini gösteren threshold cycle (Ct) değerleri belirlendi. *MR* ve *GR* genlerinin ekspresyon düzeyleri *GAPDH* geninin ekspresyon düzeyi referans alınarak normalize edildi.

İstatistiksel analiz

İstatistiksel analizler SPSS for Windows v16.0 paket programı yardımıyla yapılmıştır. Tüm parametreler için gruplar arasındaki istatistiksel farklılıkların test edilmesinde ANOVA ve alt grup karşılaştırmalarında Tukey çoklu karşılaştırma testleri kullanılmıştır. Tanıtıcı istatistik olarak ortalama \pm standart sapma değerleri verilmiştir. Elde edilen sonuçlarda $p < 0.05$ ise fark veya ilişki istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Bulgular

Morris su tankı uzak hafıza deneyinin ilk dört gününde elde edilen verilerden, her grubun günlere göre ortalama yükseltiyi bulma süreleri ayrı ayrı hesaplandı. Her grubun kendi içinde günlere göre ortalama yükseltiyi bulma sürelerinin karşılaştırmasında, birinci günden 4. güne kadar, tüm gruplarda hergünün ortalama yükseltiyi bulma sürelerinin bir önceki günden istatistiksel olarak anlamlı düzeyde kısa olduğu saptandı ($p < 0.001$). Güne göre yükseltiyi bulma sürelerinin gruplar arasında karşılaştırmasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p > 0.05$) (Tablo 1).

Yükseltiyi bulma süresi bakımından Grup I ve Grup II'de, 1. gün ile 3. gün arasında ve 1. gün ile 4. gün arasında anlamlı bir düşüş bulunmaktaydı ($p < 0.001$). 2. gün ile 3. gün arasında da anlamlı bir düşüş mevcuttu ($p < 0.05$). Diğer günler arasında ise anlamlı fark bulunamamıştır ($p > 0.05$). Grup III'de 1. gün ile 3. gün arasında, 1. gün ile 4. gün arasında, 2. gün ile

3. gün arasında ve 2. gün ile 4. gün arasında anlamlı bir düşüş bulunmaktaydı ($p < 0.001$). Diğer günler arasında ise anlamlı fark bulunamamıştır ($p > 0.05$). Grup IV'de ise 1. gün ile 2. gün, 1. gün ile 3.gün, 1. gün ile 4. gün, 2. gün ile 3. gün ve 2. gün ile 4. gün arasında arasında anlamlı düşüş görülmüştür ($p < 0.05$). Diğer günler arasında ise anlamlı fark bulunamamıştır ($p > 0.05$). Yaptığımız çalışmada grup arasında yükseltiyi bulma süreleri bakımından istatistiksel bir fark tespit edilememiştir ($p > 0.05$, Tablo 1).

Uzak hafıza deneyi beşinci gününde sıçanların eskiden yükseltinin olduğu (doğu) kadranda geçirdikleri ortalama süre Tablo 2'de gösterilmiştir. Doğu kadranda geçirilen ortalama sürenin gruplar arası karşılaştırmasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanamamıştır ($p > 0.05$). Grup I, Grup II ve Grup IV'de doğu kadrani ile diğer kadranslar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmiştir ($p < 0.05$). Grup III'de ise doğu kadrani ile diğer kadranslar arasında anlamlı bir fark bulunmamaktadır ($p > 0.05$) (Tablo 2).

Açık alan deneyinde her grubun birim zamanda ortalama katettiği mesafe Tablo 3'de gösterilmiştir. Ortalama katedilen mesafe gruplara göre karşılaştırmasında grup II en düşük ortalama mesafeye sahip olmasına karşın, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p > 0.05$) (Tablo 3). Kortikosteroid reseptörleri olan GR ve MR'nin gen ekspresyonu sonuçları Tablo 4'te gösterilmiştir. Hem GR'nün hem de MR'nün gen ekspresyonu tüm gruplarda kontrol grubuna kıyasla düşük bulunmuştur. Her iki genin ekspresyon düzeyleri Grup 1'de en yüksek bulunurken, sonra Grup II'de, daha sonra Grup III'de, en düşük olarak da Grup IV'de bulunmuştur. Ancak gruplar arasındaki bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır ($p > 0.05$) (Tablo 4).

Tablo 1. Morris su tankı uzak hafıza deneyinde yükseltiyi bulma süreleri

Gruplar	1. gün (s)	2. gün (s)	3. gün (s)	4. gün (s)	1. gün-4. gün farkı (s)
Grup I	48.65±19. 47	37.96±20.54	26.44±21.51 a,b	28.05±21.84 a	20.6
Grup II	38.30±24. 31	25.87±24.7	8.72±12.92 ^a b	13.84±15.28 a	24.46
Grup III	52.48±18. 71	42.09±22.97	20.39±21.09 a,b	22.01±21.55 a,b	30.47
Grup IV	51.59±18. 91	34.34±21.92 a	20.34±22.23 a,b	12.59±12.08 a,b	39.0

^a1. Gün ile kıyaslandığında istatistiksel olarak düşük bulunmuştur (p<0.05)

^b2. Gün ile kıyaslandığında istatistiksel olarak düşük bulunmuştur (p<0.05)

Tablo 2. 5. gün platformun olduğu doğu kadranında ratların geçirdikleri sürenin değerlendirilmesi

Gruplar	Kadranlar	Ratların geçirdiği süre (s)	p
Grup I	Doğu Kadranı	20.68±12.89	p<0.001
	Diğer Kadranlar	13.11±4.3a	
Grup II	Doğu Kadranı	20.98±6.40	p=0.034
	Diğer Kadranlar	13.00±2.14a	
Grup III	Doğu Kadranı	18.85±7.72	p>0.05
	Diğer Kadranlar	13.72±2.57a	
Grup IV	Doğu Kadranı	22.97±5.58	p<0.001
	Diğer Kadranlar	12.34±1.86a	

^aDoğu kadranına kıyasla istatistiksel olarak düşük bulunmuştur (p<0.05)

Tablo 3. Açık alan deneyinde ortalama katedilen mesafe

Gruplar	Katedilen mesafe (cm)
Grup I	2421.58±395.49
Grup II	2150.54±381.24
Grup III	2263.61±375.11
Grup IV	2350.34±359.61

Tablo 4. Kortikosteroid Reseptör Genlerinin (MR ve GR) Ekspresyon Düzeyleri

Gruplar	MR gen ekspresyonu (Kat)	GR gen ekspresyonu (Kat)
Grup I	0.59 ± 0.018	0.65 ± 0.016
Grup II	0.54 ± 0.056	0.63 ± 0.012
Grup III	0.52 ± 0.014	0.61 ± 0.011
Grup IV	0.51 ± 0.045	0.60 ± 0.022

Tartışma

Bu çalışmada akut immobilizasyon stresinin ve menopozun emosyonel ve uzaysal hafıza üzerindeki etkileri, iki farklı deneysel öğrenme modeli kullanılarak tespit edilmeye çalışılmıştır. Çalışmamızda uzaysal hafızayı ölçmek için Morris su tankı testi kullanılmıştır. Çalışmamızda kullandığımız akut immobilizasyon stresinin ve deneysel menopoz modelinin ayrı ayrı veya birlikte emosyonel ve uzaysal hafızaya etkilerini karşılaştıran çalışmaya literatürde rastlanılmamıştır.

Hayvan davranış deneylerinde, sıçanların stres ve anksiyeteye girerek beklenenden farklı davranışlar sergiledikleri bilinen bir gerçektir. Daha önce yapılmış çalışmaların bulguları ışığında Ehman ve Moser, bu durumu en aza indirmek için düzeneklerin siyaha boyanmasını, deneyin yapıldığı odanın loş olacak şekilde aydınlatılmasını, aynı gün içinde tekrarların yapıldığı deneylerde sıçanların yorulmasını önleyecek şekilde atışlar arasında yeterince süre

birakılmasını, Morris su tankında yükseltinin sıçanın büyüklüğüne uygun seviyede su altına gizlenmesini ve sıçanların vücut sıcaklıklarının korunması için önlem alınmasını önermiştir.¹¹

Artı labirent deneyi ardışık iki veya üç günde, günde bir kez, 1-5 dakika süre ile yapılabilmektedir.¹²⁻¹⁵ Bu deneyle ilgili çalışmalarda sıçanların öğrenme yetisini bozacak herhangi bir durumun varlığında, sıçanların kapalı kola girme sürelerinin uzadığı ve deney günleri ilerledikçe de kapalı kola girme sürelerini kontrol gruplarına kıyasla yeterince kısaltamadıkları bildirilmiştir.^{12,14,15} Biz bu çalışmada altıncı haftasını tamamlamış sıçanlara, siyah renkli pleksiglastan üretilmiş bir düzenekte, üç gün süreyle, günde bir kez ve 60 sn süreyle artı labirent deneyini uyguladık. Artı labirent deneyinde ardışık uygulamalarla tüm grupların, günden güne kapalı kola girme süreleri diğer yayınlarda belirtildiği gibi kısalmıştır. Günlere göre sıçanların kapalı kola girme süreleri gruplar arasında karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmakla

birlikte tüm günlerde ortalama kapalı kola girme süresi en uzun olan grup, overektomi uygulanan grup, daha sonra immobilizasyon stresi ve overektomi uygulanan grup, daha sonra kontrol grubu ve en düşük olarak da immobilizasyon stresi uygulanan grup olarak tespit edilmiştir. Overektomi uygulanan grubun ve overektomi ve immobilizasyon stresi oluşturulan grubun kapalı kola girme süresi kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak artmış bulunmasına rağmen, sadece immobilizasyon stresi oluşturulan grupta bu süre kontrol grubuna kıyasla düşük bulunmuştur.

Uyguladığımız 10 dk'lık akut immobilizasyon stresinin uzaysal hafızayı bozmadığını, strese maruz kalmayan diğer deney hayvanlarla öğrenme düzeylerinin farklılaşmadığını tespit ettik. Hafif veya kısa süreli stresin hipokampus bağıntılı açık belleği ve dolayısıyla öğrenmeyi kolaylaştırdığı bilinmektedir. Hafif ve kısa süreli stresörlerin hipokampus bağıntılı belleği hangi mekanizmalar yoluyla güçlendirdiği daha az betimlenmiştir. Ancak kafeslerinden çıkarılarak havuza bırakılan sıçanlarda su, akut ve hafif düzeyde strese sebep olabileceğini düşünmekteyiz.

Çalışmamızda 10. haftasını tamamlamış sıçanlara, açık alan deneyi beş dakika süreyle uygulanarak, sıçanların hareket hızları ve katettikleri mesafeler kaydedildi. Bu deneyde tüm gruptaki sıçanlar birbirlerine eşit denecek kadar yakın mesafe katettiler. En fazla mesafe kateden grup kontrol grubu olurken onu sırasıyla immobilizasyon stresi ve overektomi uygulanan grup, overektomi uygulanan grup ve immobilizasyon stresi uygulanan grup takip etmekteydi. Ancak gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamaktaydı. Yapılmış çalışmalarda, lokomotor etkilenmesi olan sıçanların açık alan deneyinde kontrol grubuna göre daha yavaş hareket ettikleri ve daha az mesafe katettikleri gösterilmiştir. Bu düzeneğin kenarlarında duvarları olması nedeniyle aslında bir kapalı alan olduğu, sıçanlarda anksiyete yarattığı, strese giren sıçanların köşelerde donup kalabileceği gibi aşırı hareketli olabileceğinin de iddia edildiği farklı yaklaşımlar da mevcuttur.^{16,17} Çalışmamızda kontrol grubu dışındaki

gruptaki sıçanların lokomotor yetilerinin strese bağlı olarak bozulduğu, istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamasının oluşturulan stresin yeteri kadar anksiyete meydana getirmediklerinden kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Yapılan çalışmalarda, Morris su tankı deneylerinde iki atış arasındaki bekleme süresinin 1-15 dakika arasında değiştiği görülmektedir.^{12,18,19} Bu deneylerde özellikle uzaysal öğrenmenin değerlendirildiği, bu yetinin de hipokampal fonksiyonlarla ilgili olduğu bildirilmiştir.^{20,21} Biz ise atışlar arası bekleme süresini uzak hafıza deneyinde 2-4 dk, yakın hafıza deneyinde 5 dk olacak şekilde düzenledik. Yaptığımız çalışmada, stres oluşturulan ve/veya overektomi yapılan sıçanlarda kontrol grubuna göre gizli yükseltiyi bulma süresinin daha uzun ve yükseltiyi bulana kadar katedilen mesafenin daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Uzak hafıza deneylerinde atışlar ve günler ilerledikçe kontrol grubu bu değerleri azaltırken akut immobilizasyon stresinin ve menopozun yeterince azaltmadığı gösterilmiştir. Uzak hafıza deneyi beşinci gününde ise kontrol gruplarının eskiden yükselti olan kadranda daha fazla süre geçirdikleri tespit edilmiştir. Yakın hafıza deneyinde atışlar ilerledikçe kontrol grubundaki sıçanlar yükseltiyi bulma sürelerini ve yükseltiyi bulmak için katettikleri mesafeleri kısaltırken, stres altındaki sıçanlarda ise daha az değişiklik meydana geldiğini tespit ettik. Daha önce yapılmış olan çalışmalarda, her iki Morris su testi deneyinde de yüzme hızlarının gruplara göre bir farklılık meydana getirmedikçe bildirilmiştir.^{15,18}

Yaptığımız çalışmada deneysel menopoz ve deneysel immobilizasyon stresi modellerinin hipokampal dokuda MR ve GR gen ekspresyonu üzerindeki etkisi incelenmiştir. Hem GR hem de MR gen ekspresyonu seviyesi en yüksek kontrol grubunda bulunurken, sonra immobilizasyon stresi uygulanan grupta, daha sonra deneysel menopoz modeli oluşturulan grupta en düşük olarak da menopoz ve immobilizasyon stresi oluşturulan grupta bulunmuştur. Ancak gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Bu durumun gerek

immobilizasyon ile gerekse deneysel menopoz oluşturulması ile ortaya çıkan stresin hipokampustaki gen ekspresyonunu etkilemeye yeterli şiddette olmadığından kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Uzun süreli stres veya eşdeğer madde uygulamasıyla oluşan anksiyete ister emosyonel ister uzaysal hafıza olsun öğrenme proseslerini bozmaktadır. Araştırmamızda ise bizim uyguladığımız 10 dk'lık akut immobilizasyon stresi ve deneysel menopoz modeli uzaysal hafızayı etkilemezken, daha primitif olan emosyonel hafızayı bozmuştur. Bu sonuç, uyguladığımız kısa süreli stresin uzun süreli stresten farklı olarak bir tek emosyonel öğrenme sürecinde görev alan anatomik ve nörokimyasal yolları etkilediğini, uzaysal hafıza oluşumunda rol alan anatomik ve nörokimyasal yollar üstünde ise etkisiz olduğunu göstermektedir. Bu bulgu hafif stresin öğrenmeyi kolaylaştırdığına dair bulgularla çelişkili görünüyorsa da 10 dk'lık akut immobilizasyon stresinin ve deneysel menopoz modelinin gruplar arasında anlamlı fark meydana getirmediği görülmüştür. Akut immobilizasyon modeli, deneysel menopoz modeli ve diğer stres modellerinin gelişimi için sonuçların daha ayrıntılı deneylerle desteklenmesine ihtiyaç vardır.

Teşekkür

Bu çalışma Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: BAP-ECZ F TEB (SY) 2009-7 A).

Yazar katkıları: Araştırmacıların tümü çalışmanın planlanması, deneysel hayvan modelinin oluşturulması ve analiz, çalışma metninin yazılması aşamalarına aktif olarak katılmıştır.

Çıkar çatışması: Yazarlar arasında herhangi bir çıkar çatışması bulunmamaktadır.

Kaynaklar

- 1) Lupien SJ, Juster RP, Raymond C, Marin MF. The effects of chronic stress on the human brain: From neurotoxicity, to vulnerability, to opportunity. *Front Neuroendocrinol* 2018;49:91-105.
- 2) Tamer Ş. Stres Fizyolojisi. Yiğit R. Genel Fizyoloji, İÜ, İstanbul Tıp Fakültesi., Temel ve Klinik Bilimler Ders Kitapları, Nobel Tıp Kitabevi 2001;29-39.
- 3) Herman JP, Ostrander MM, Muelle NK, Figueiredo H. Limbic system mechanisms of stress regulation: hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2005;29(8):1201-1213.
- 4) De Cloet ER, Vreugdenhil E, Oitzl MS, Joels M. Brain corticosteroid receptor balance and homeostatic control. *Frontiers Neuroendocrinol* 1991;12(2):95-164.
- 5) De Cloet ER, Vreugdenhil E, Oitzl MS, Joels M. Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. *Endocr Rev* 1998;19(3):269-301.
- 6) Heck AL, Handa RJ. Sex differences in the hypothalamic-pituitary-adrenal axis' response to stress: an important role for gonadal hormones. *Neuropsychopharmacology* 2019;44(1):45-58.
- 7) Sunstrum JK, Inoue W. Heterosynaptic modulation in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Neuropharmacology* 2018;3908(18):30841-30844.
- 8) Sawada H, Shimohama S. Neuroprotective effects of estradiol in mesencephalic dopaminergic neurons. *Neurosci Biobehav Rev* 2000;24(1):143-147.
- 9) Brandeis R, Brandys Y, Yehuda, S. The use of the Morris Water Maze in the study of memory and learning. *Int J Neurosci* 1989;48:29-69
- 10) Han F, Ding J, Shi Y. Expression of amygdala mineralocorticoid receptor and glucocorticoid receptor in the

- single-prolonged stress rats. *BMC Neurosci* 2014;15(1):77.
- 11) Ehman KD, Moser VC. Evaluation of cognitive function in weanling rats: A review of methods suitable for chemical screening. *Neurotoxicology and Teratology* 2006;28(1):144-161.
 - 12) Agrawal R, Tyagi E, Saxena G, Nath C. Cholinergic influence on memory stages: A study on scopolamine amnesic mice. *Indian J Pharmacol* 2009;41(4):192-196.
 - 13) Feng EC, Jiang L. Effects of leptin on neurocognitive and motor functions in juvenile rats in a preterm brain damage model. *Mol Med Rep* 2018;18(4):4095-4102.
 - 14) Biedermann SV, Biedermann DG, Wenzlaff F, Kurjak T, Nouri S, Auer MK, Wiedemann K, Briken P, Haaker J, Lonsdorf TB, Fuss J. An elevated plus-maze in mixed reality for studying human anxiety-related behavior. *BMC Biol* 2017;15(1):125.
 - 15) Ikeda T, Mishima K, Aoo N, Harada K, Liu AX, Egashira N, Iwasaki K, Fujiwara M, Ikenoue T. Rehabilitative training tasks improve spatial learning impairment in the water maze following hypoxic-ischemic insult in neonatal rats. *Ped Research* 2006;59(1):61-5.
 - 16) Lieben CKJ, Oorsouw KV, Deutz NEP, Blokland A. Acute tryptophan depletion induced by a gelatin-based mixture impairs object memory but not affective behavior and spatial learning in the rat. *Behav Brain Res* 2004;151(1-2):53-64.
 - 17) Ennaceur A, Michalikova S, Chazot PL. Models of anxiety: Responses of rats to novelty in an open space an enclosed space. *Behav Brain Res* 2006;171(1):26-49.
 - 18) Pereria LO, Artene NS, Peterson RC, Padilha da Rocha A, Achaval M, Netto CA. Effects of daily environmental enrichment on memory deficits and brain injury following neonatal hypoxia-ischemia in the rat. *Neurobiology of Learning and Memory* 2007;87(1):101-8.
 - 19) Ikeda T, Mishima K, Aoo N. Combination treatment of neonatal rats with hypoxia-ischemia and endotoxin induces long-lasting memory and learning impairment that is associated with extended cerebral damage. *Am J of Obst and Gynecology* 2004;191(6):2132-41.
 - 20) D' Hooger D, De Deyn PP. Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Res Rev* 2001;36(1):60-90.
 - 21) Bramham CR. Control of synaptic consolidation in the dentate gyrus: mechanisms, functions, and therapeutic implications. *Prog Brain Res* 2007;163:453-71.