

DİŞİ YAVRU SIÇANLARDA SOSYAL İZOLASYON STRESİNİN ÖĞRENMEYE ETKİSİ Effects of Social Isolation Stress on Learning in Female Juvenile Rats

Meral AŞÇIOĞLU¹, Zekiye ALKAN BİŞKİN²

Özet : Akut stres ile bilişsel fonksiyonlar arasındaki ilişki konusundaki birçok çalışmaya karşın süttten kesme dönemi sonundaki sosyal izolasyon stresinin yer bulma öğrenmesine etkileri konusunda bilinenler çok azdır. Bu çalışmada yer bulma öğrenmesinin; Wistar albino dişi yavru siçanlarda yaşamlarının 28.-49. günleri arasında (sütten kesme sonrasında), günde 4 saat olacak şekilde uygulanan sosyal izolasyona maruz kalma ile etkilenip etkilenmeyeceği araştırıldı. Üç grup hayvan çalışıldı. 1. ön deneme grubu (n=5), 2. kontrol grubu (n=11), 3. sosyal izolasyon grubu (n=11): doğum sonrası 28. günden 49. güne kadar hergün günde bir defa , dört saat süreyle diğer bireylerden ayrılan siçanların oluşturduğu grup. Süttten kesme sonrası dönemdeki 49 günlük yavru dişi Wistar albino siçanlar (kontrol ve sosyal izolasyon grubu) yer bulma öğrenmesi için Morris Su Tankı ile test edildiler. Kontrol ve sosyal izolasyon grubundaki siçanların kaçış platformunu bulma süreleri ve platformlu 1/2 'lik alanda geçirdikleri sürenin toplam sürenin yüzdesi cinsinden değerleri istatistiksel olarak analiz edildi. İstatistiksel analizler için tekrarlı ölçümlerde ANOVA (önemlilik düzeyi için $p<0,05$ kabul edilerek) ve unpaired t-testi (önemlilik düzeyi için $p<0,05$ kabul edilerek) kullanıldı. Çalışma sonunda, dişi yavru siçanlarda sosyal izolasyon stresinin Morris Su Tankında yer bulma öğrenmesini değiştirmedeği bulundu ve sosyal izolasyon stresinin yer bulma öğrenmesi üzerindeki etkilerinin stresin periyodu ve şiddeti ile ilişkili olduğu kanısına varıldı.

Anahtar kelimeler: Sosyal izolasyon, rat , öğrenme, stres, Morris Su Tankı

Öğrenme; görme, işitme, dokunma, tat ve koku duyu- ları ile algılanan uyarılar sonunda beyinde ilişkilendir- me, tekrarlama gibi birden çok işlem ile gerçekleşir ve deneyime dayanarak davranış değiştirme, yeni bir bilgi kazanma yeteneğidir (1)

¹ Prof.Dr.Erciyes Ün, Tıp Fak.Fizyoloji AD, Kayseri

² Bilim Uz, Erciyes Ün, Sağlık Bil.Ens.Fizyoloji AD, Kayseri

Summary : Despite extensive research on the relationship between acute stress and cognitive functions in adults little is known about the postweaning social isolation stress on spatial learning. This research investigated whether spatial learning would be altered in female juvenile Wistar albino rats exposed to a stressor: 4h social isolation daily at 28-49 days of age (after weaning). Three groups of animals were investigated. 1. preexperiment group (n=5), (2) normal controls (n=11), (3) social isolation group (n=11): rats which from postnatal 28 until postnatal 49, were seperated from the family one time per day for 4h. After weaning 49 day old female juvenile Wistar albino rats (control and social isolation groups) were tested in the Morris Water Maze for spatial learning. For the rats in the control and social isolation group, the total duration of time spent to find the platform and the duration of time spent in half area of the maze including the platform in a value representing the percentage in the total time were compared statistically. For statistical analysis, ANOVA for repeated measures (with criteria of $p<0,05$) and unpaired t-test (with criteria of $p<0,05$) were used.

At the end of the study, it was found that spatial learning in the Morris Water Maze had not altered in female juvenile rats exposed to social isolation stress and it was concluded that the effect of social isolation stress on spatial learning was related to period and degree of stress.

Key words: Social isolation, rats, learning, stress, Morris Water Maze

Stres, organizmayı bedensel ve ruhsal olarak zorla- yan etkenlerin bireyin psişik dengesini bozması sonucunda ortaya çıkan gerilim durumu olup strese beden tepkisi genellikle stresörün etkisini azalt- ma çarelerini aramak şeklindedir. Bu tepkide temel amaç, stresin etkisi ile organizmanın bozulan den- gesinin (homeostazisinin) yeniden kurulmasıdır (2,3).

* Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından SBY.03.06 nolu proje ile desteklenmiştir.

Organizmada stresin çeşitli komplikasyonlara yol açtığı, özellikle de endokrin sistem ve hematopoetik sistem üzerinde fonksiyonel değişikliklere neden olduğu bilinmektedir. Bu değişikliklerin sinir sistemindeki bazı biyokimyasal, yapısal ve fonksiyonel bozukluklarla seyrettiği araştırmalarla da gösterilmiştir. Stresin sinir sisteminde neden olduğu değişikliklere bağlı olarak öğrenmeyi de etkileyeceği düşüncesiyle birçok çalışma yapılmıştır. Ancak uygulanan stresin çeşidi, şiddeti, uygulama dönemi ve takiben öğrenmenin test edildiği dönem ile ilişkili olarak farklı sonuçlar elde edilmiştir. Bu nedenle bu çalışmada sosyal izolasyon stresinin dişi yavru sıçanlarda öğrenmeye olan etkisi araştırılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma Erciyes Üniversitesi Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezi'nde gerçekleştirildi. Çalışma ön deneme için 5, kontrol ve deney grupları için 11'er olmak üzere toplam 27 adet 28 günlük Wistar albino dişi yavru sıçan ile yürütüldü. Sıçanlar 12 saatlik karanlık-aydınlık siklusu uygulanarak standart şartlarda 25x40x15cm. ebatlarındaki kafeslerde barındırıldılar. Deney grubu sıçanlar için sosyal izolasyon, görsel iletişimi engelleyecek şekilde opak bir malzemeden yapılmış kafeslere sıçanları tek tek koyarak hergün 12:00-16:00 saatleri arasında günde dört saat olacak şekilde ve 21 gün süreyle uygulandı.

Sosyal izolasyon uygulama süresi sonunda öğrenme deneyleri yapıldı. Öğrenme deneylerinde 130cm çapında ve 45cm derinliğindeki Morris Su Tankı, süt tozu ile opaklaştırılmış su ile yarısına kadar doldurularak kullanıldı (4). Su sıcaklığı 26C olarak ayarlandı. Tankın bulunduğu odada üç farklı yönde duvarlara tankdaki suyun yüzeyinde bulunan sıçanın görebileceği şekilde üç farklı renkte (siyah,beyaz,kırmızı) panolar yerleştirildi

Tank içerisine su seviyesinin 1cm üzerinde kenardan 18cm içte kalacak şekilde ve 10 cm çapında silindir bir kaçma platformu yerleştirildi. Kaçma

platformu sıçanın kendini emin hissedeceği ve pencereleri ile kolayca tutunabileceği lifli bir örtü ile kaplandı (5).

Öğrenme deneyleri sabah 9:00-13:00 saatleri arasında olacak şekilde ardışık 3 günde yapıldı. Tank içerisine bırakılan sıçanlara platformu bulmaları için maksimum iki dakika süre verildi. Bu sürede platformu bulamayan sıçanlar platforma yönlendirilip platformu bulmaları ve platform üzerinde 30 saniye kalmaları sağlandı(6). Sıçanlara 30 dakika aralarla günde dört deneme yaptırıldı. Test fazında suyun altında kalacak şekilde yerleştirilen platform ile aynı işlemler tekrarlandı. Her bir sıçan için platformu bulana kadar geçen toplam süre ve platformsuz yarı alanda geçirilen süre dijital kronometre ile ölçüldü. Kontrol ve deney grubu sıçanların platformu bulmaları için geçirdikleri toplam süre ve platformlu1/2'lik alanda geçirdikleri sürenin toplam sürenin yüzdesi cinsinden değerleri hesaplandı.

Elde edilen verilerin istatistiksel değerlendirmelerinde her bir gündeki öğrenme performanslarının grup içi karşılaştırmasında tekrarlayan ölçümlerde ANOVA, gruplar arası karşılaştırmalarda eşleştirilmemiş t testi kullanıldı. Anlamlılık düzeyi $p<0,05$ olarak kabul edildi.

BULGULAR

Tablo I ve II'de görüldüğü üzere kontrol ve deney grubu için kaçma platformunu bulma süreleri açısından deneyin öğrenme fazı olan 1.,2.,3. günleri karşılaştırıldığında grup içi farklılık anlamlı bulunmuş ($p<0,05$) ve uygulanan 3 günlük öğrenme periyodunun yeterli olduğu görülmüştür.

Kontrol ve deney grubu sıçanların deneyin 1., 2., 3., 4. günlerinde kaçma platformunu bulma sürelerinin gruplar arası karşılaştırılması Tablo III'de sunulmuştur.

Kontrol ve deney grubu sıçanların Morris Su Tankı'nın platformlu yarı alanında geçirdikleri sürenin toplam sürenin yüzde (%)si olarak değerlerinin öğrenme ve test fazı için gruplar arası karşılaştırılmaları Tablo IV'de sunulmuştur.

Tablo I. Kontrol grubu sıçanların (n:11) 1., 2., 3. ve 4. günlerde kaçma platformunu bulmaları için geçen toplam sürelerin grup içi karşılaştırılması

Deney Günleri	Kaçma Platformunu Bulma Süresi (sn) (X ± SD)
1.gün	19.32 ± 11.26*
2.gün	10.75 ± 4.56*
3.gün	6.75 ± 3.07 ^y §
4.gün	7.09 ± 3.17 ^y §

F = 12.35

* : Diğer günlerdeki değerler ile karşılaştırıldığında p < 0.05

y : 1.gün değeri ile karşılaştırıldığında p < 0.05

§ : 2.gün değeri ile karşılaştırıldığında p < 0.05

Tablo II. Deney grubu sıçanların (n:11) 1., 2., 3. ve 4. günlerde kaçma platformunu bulmaları için geçen toplam sürelerin grup içi karşılaştırılması

Deney Günleri	Kaçma Platformunu Bulma Süresi (sn) (X ± SD)
1.gün	22.45 ± 8.75*
2.gün	12.21 ± 4.81 ^y
3.gün	8.72 ± 2.84 ^y
4.gün	8.36 ± 3.91 ^y

F = 16.76

* : Diğer günlerdeki değerler ile karşılaştırıldığında p < 0.05

y : 1.gün değeri ile karşılaştırıldığında p < 0.05

Tablo III. Kontrol ve deney grubu sıçanların deneyin 1., 2., 3., 4. günlerinde kaçma platformunu bulma sürelerinin gruplar arası karşılaştırılması (n:11)

Deney Günleri	Kaçma Platformunu Bulma Süresi (sn) (X ± SD)		p
	Kontrol Grubu (n:11)	Deney Grubu (n=:11)	
1.gün	19.32 ± 11.26	22.45 ± 8.75	> 0.05
2.gün	10.55 ± 4.56	12.21 ± 4.81	> 0.05
3.gün	6.75 ± 3.07	8.72 ± 2.84	> 0.05
4.gün	7.09 ± 3.17	8.36 ± 3.91	> 0.05

Tablo IV. Kontrol ve deney grubu sıçanların 1., 2., 3., 4 günlerde platformlu yarı alanda geçirdikleri sürenin toplam sürenin yüzde (%)si cinsinden değerlerinin (PYSY'lerin) gruplar arası karşılaştırılması

PYSY (X±SD)			
Deney Günleri	Kontrol Grubu (n:11)	Deney Grubu (n:11)	p
1. gün	48,69±11,08	46,14±8,06	> 0.05
2. gün	61,16±6,70	45,77±13,84	> 0.05
3. gün	52,83±7,62	44,76±8,87	> 0.05
4. gün	57,62±5,37	43,2±5,99	> 0.05

Tablo IV'de görüldüğü üzere kontrol ve deney grubu sıçanların Morris Su Tankı'nın platformlu yarı alanında geçirdikleri sürenin toplam sürenin yüzde (%)si cinsinden değerlerinin öğrenme ve test fazı için gruplar arası karşılaştırılmasında istatistiksel açıdan anlamlı fark bulunmamıştır. ($p>0,05$).

Sonuç olarak kontrol ve deney grubu sıçanların kaçma platformuna ulaşma süreleri ve platformlu yarı alanda geçirdikleri sürelerin toplam sürenin yüzdesi cinsinden değerleri için gruplar arası istatistiksel karşılaştırmada anlamlı fark olmadığı ve uygulanan sosyal izolasyonun oluşturduğu stresin yer bulma öğrenmesini etkilemediği bulunmuştur.

TARTIŞMA

Çalışmamızda sıçanların, Morris Su Tankı'nda kaçma platformunu bulma sürelerinin ve Morris Su Tankı'nın platformlu yarı alanında geçirdikleri sürenin toplam sürenin %'si cinsinden değerlerinin öğrenme fazı için grup içi karşılaştırılmasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunması, günde dört deneme olacak şekilde üç günlük bir periyodun öğrenme için yeterli olduğunu göstermektedir. Sıçanların platformu bulma süreleri ve tankın platformlu yarı alanında geçirdikleri sürelerin toplam sürenin %'si cinsinden değerleri için gruplar arası istatistiksel karşılaştırılma yapıldığında iki grup arasında anlamlı bir fark bulunmaması uygulanan sosyal izolasyonun yer bulma öğrenmesini etkilemediğini göstermiştir.

Erken dönemde karşılaşılan ılımlı stresin , strese daha az hassas ve böylece daha adaptif bir fenotip

gelişimini sağladığı bildirilmektedir(7,8). Sıçanlarda 21 günlük ılımlı stres sonunda morfolojik ve davranışsal belirgin değişikliklerin olmadığı ve stres uygulama döneminin bitiminden itibaren 5-20 günde başlangıca dönüşün sağlandığı, ancak uzun süre anneden ayırmayla oluşturulan daha şiddetli stresin erişkin dönemde strese artmış duyarlılıkla sonuçlandığı bildirilmektedir(9). Erişkin dönemden sonra akranlarından ayrılan ve tek tek izole kafeslere konulan sıçanlarda ise öğrenme test edildiğinde izolasyon süresi ile ilişkili değişiklikler gözlemlendiği bildirilmektedir(10,11). Frisone ve arkadaşları(7) tarafından yetişkin sıçanlar üzerine uygulanmış sosyal izolasyon stresinin öğrenmeyi artırdığı gözlemlenmiştir. Sunulan çalışmada, 28 günlük yavru sıçanların uygulanan sosyal izolasyonun öğrenmeyi etkilemiyor olması şeklinde farklı bir sonucu gözlemlenmesinin sosyal izolasyonun uygulandığı yaş döneminin farklı olmasından kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Molina ve arkadaşları (12) 20 günlük sıçanlara uygulamış oldukları sosyal izolasyon stresinin öğrenmeyi etkilemediğini göstermişlerdir. Çalışmamızda da yaklaşık aynı yaştaki yavru sıçanlara 21 gün süreyle günde 4 saat şeklinde uygulanan sosyal izolasyonun yer bulma öğrenmesini etkilemediği yönünde bulgular elde edilmiş olup bu bulgular Molina ve arkadaşlarının bulgularıyla paralellik göstermektedir.

Uysal ve arkadaşları (13) erkek yavru sıçanlarda doğumdan itibaren 21 gün süreyle, günde 6 saat şeklinde uygulanan sosyal izolasyon stresinin yer bulma öğrenmesini olumsuz yönde etkilediğini göstermişlerdir. Bildirilen çalışmada doğumdan itibaren başlayan, günde 6 saatlik bir izolasyon söz konusu olup yavru, anne-yavru arasındaki etkileşi-

min önemli olduğu dönemde bu stresi yaşamıştır. Çalışmamızda ise sıçanlara anne-yavru etkileşiminin önemli olduğu doğum sonrası 28 günlük sürenin sonunda, süttten kesme döneminde 21 gün süreyle günde 4 saat olacak şekilde sosyal izolasyon uygulaması yapılmıştır. Bulgularımıza göre anneye bağımlılık döneminden sonra yaşanmış ılımlı bir sosyal izolasyon stresi yavrunun yer bulma öğrenmesi performansını etkilememiştir. Çalışmamızda elde edilen bu bulgu yavrunun strese vereceği yarıttta anne yavru arasındaki etkileşimin önemli olduğu yönündeki savla (14) uyuşmaktadır. Farklı yaş grubundaki sıçanlarla yapılan çalışmalarda stres sonunda yer bulma belleğinin zayıfladığı görülmüş (16-18) stres faktörüyle ilişkili duyarlılığı oluşturan değişkenlerin tipi, niteliği, niceliğiyle ilgili olarak nöronal sistemlerde farklı etkiler oluştuğu ve bu farklılıkların, ilgili nöropeptit, reseptör ve ileti sistemlerini etkileyerek bellek sistemlerinde de farklı etkiler yarattığı bildirilmiştir (15-19). Uyguladığımız sosyal izolasyonun dişi yavru sıçanlarda yer bulma öğrenmesini etkilememesi yönündeki bulgularımız literatürdeki bilgiler (12-18) ışığında yorumlandığında sosyal izolasyon stresinin öğrenme üzerindeki etkisinin; stresin uygulandığı yaş dönemi, uygulama şekli ve süresi ile ilişkili olduğu düşünülmüştür.

Sonuç olarak, yavru anne arasındaki etkileşimin önemli olduğu anne sütü ile beslenme dönemi sonundaki ılımlı bir sosyal izolasyon stresinin yer bulma öğrenmesini etkilemediği kanısına varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Aktümsek A. *Anatomi ve Fizyoloji*. Nobel Yayın Dağıtım, Ankara 2001, ss 106-107
2. Baltaş A, Baltaş Z. *Stres ve Başa Çıkma Yolları Remzi Kitabevi*, İstanbul 2000, ss 23-25, 316-317
3. Koob GF. *Corticotropin-releasing factor, norepinephrine and stress*. *Biol Psychiat* 1999, 46(9):1167-1180
4. Manschot SM, Biessels G-J, Cameron NE, Cotter MA, Kamal A, Kappelle LJ, et al. *Angiotensin converting enzyme inhibition partially prevents deficits in water maze performance, hippocampal synaptic plasticity and cerebral blood flow in streptozotocin diabetic rats*. *Brain Res* 2003, 966(2):274-282
5. Wyss JM, Chambles BD, Kadish I, Groen VT. *Age-related decline in water maze learning and memory in rats: Strain differences*. *Neurobiol Aging* 2000, 21(5):671-681
6. Hedges H. *Maze Procedures: The radial arm and water maze compared*. *Cognitive Brain Res* 1996, 3(3-4):167-181
7. Frisone DF, Frye CA, Zimmerberg B. *Social isolation stress during the third week of life has age – dependent effects on spatial learning in rats*. *Behav Brain Res* 2002, 128(2):153-160
8. Ladd CO, Huot RL, Thirivikraman KV, Nemeroff CB, Meaney MJ, Plotsky PM. *Long-term behavioral and neuroendocrine adaptations to adverse early experience*. *Prog Brain Res* 2000, 122: 81-103
9. Plotsky PM, Meaney MJ. *Early postnatal experience alters hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) Mrna, median eminence CRF content and stress-induced release in adult rats*. *Mol Brain Res* 1993, 18 (3):195-200
10. Sutton RE, Koob GF, Le Moal M, Rivier J, Vale W. *Corticotropin-releasing factor (CRF) produces behavioral activation in rats*. *Nature* 1982, 297(5864):331-333
11. Conrad CD, Magarinos AM, McEwen BS, Leodoux J.E. *Repeated restraint stress facilitates fear conditioning independently of causing hippocampal CA3 dendritic atrophy*. *Behav Neurosci* 1999, 113(5): 902-913
12. Molina HM, Tellez AP, Perez GJ. *Isolation rearing induced fear-like behavior without affecting learning abilities of Wistar rats*. *Prog Neuro-Psychoph/Biol Psychiat* 2001, 25(5): 1111-1123

13. Uysal N, Gönenç S, Şişman A.R, Açıkgöz O, Dayı A ve ark. Anneden ayrılma stresinin spasyal belleğe ve sonradan karşılaşılan akut stresin genç sıçan beyin dokularında antioksidan enzim aktiviteleri ile lipid peroksidasyonuna etkileri, Türkiye 28. Ulusal Fizyoloji Kongresi Bildiri Kitabı , Dokuz Eylül Üniversitesi, İzmir 24-27 Eylül 2002, s 13.
14. Wilson DA, Willner J, Kurz EM, Nadel A. Early handling increases hippocampal long term potentiation in young rats. *Behav Brain Res* 1986, 21(3): 223-227
15. Poe GR, Teed RGW, Insel N, White R, McNaughton BL, Barnes CA. Partial hippocampal inactivation: effects on spatial memory performance in aged and young rats. *Behav Neurosci* 2000, 114(5): 940-9
16. Villarreal JS, Gonzalea LF, Berndt J, Barea REJ. Water maze training in aged rats: effects on brain metabolic capacity and behavior. *Brain Res* 2002, 939(1-2):43-51
17. Yang Y, Cao J, Xiong W, Zhang J, Zhov Q, et al. Both stress experience and age determine the impairment or enhancement effect of stress on spatial memory retrieval. *J Endocrinol* 2003, 178(1):45-54
18. Post RM, Weiss SR, Gabriele S. Transduction of psychosocial stress into the neurobiology of recurrent affective disorder. *Am J Psychiat* 1992, 999-1010
19. Shors JT, Chua C, Falduto J. Sex differences and opposite effects on dendritic spine density in the male versus female hippocampus. *J Neurosci* 2001, 21(16):6292-6297

Dişi yavru sıçanlarda sosyal izolasyon stresinin öğrenmeye etkisi