

T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ

**YENİDOĞAN DIŞI VE ERKEK SIÇANLARDA ANNEDEN AYIRMA
SÜRELERİNİN MOTOR VE DUYSAL GELİŞİME ETKİSİ, ANSIYETENİN
DEĞERLENDİRİLMESİ DAVRANIŞ VE KOGNİTİF FONKSİYONLARIN
ARAŞTIRILMASI**

Proje No:THD-2015-5846

Proje Türü

Hızlı Destek Projesi

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:

Asuman Gölgeli

Tıp Fakültesi/Fizyoloji

Yük.Lis.Öğr.Kamile Yazgan

Tıp Fakültesi/Fizyoloji

Öğr.Receb Tayyib Yıldırım

Tıp Fakültesi Dönem III Öğrenci

Öğr.Zeynep İnce

Tıp Fakültesi Dönem III Öğrenci

Vet.Dr.Zeynep Soyer Sarıca

DEKAM Veteriner Hekim

Kasım 2015

KAYSERİ

İÇİNDEKİLER

Tablo ve Şekiller Listesi.....	4
Teşekkürler.....	5
Özet.....	6
Abstract.....	7
1.GİRİŞ.....	8
2.GENEL BİLGİLER.....	10
2.1.Anne Yoksunluğu ve Beyinde Yapısal Değişiklikler.....	12
2.2.Anne Yoksunluğu ve Beyinde Nörokimyasal Değişiklikler	13
2.3.Anne Yoksunluğunun Davranış Üzerine Etkisi.....	14
3.GEREÇ VE YÖNTEM.....	16
3.1 Deney Hayvanları.....	16
3.2 Deney Modeli Oluşturulması.....	16
3.3.Davranışın Değerlendirilmesi: Açık Alan Düzeneği.....	16
3.4. Anksiyetenin Değerlendirilmesi: Yükseltilmiş T-Labirent Düzeneği.....	17
3.5.Ağrı Eşiğinin Değerlendirilmesi: Sıcak Plaka Testi (Hot Plate).....	17
3.6.Allodini Değerlendirilmesi: von Frey Flament Testi	18
3.7. Kan Parametrelerinin Değerlendirilmesi.....	19
3.8. İstatistiksel Analiz.....	19
3.8.1. Açık Alan Parametrelerinin Değerlendirilmesi.....	19
3.8.2. Hot Plate ve von Frey Testleri Parametrelerinin Değerlendirilmesi.....	19
3.8.3. T Labirent Testi Değerlendirilmesi.....	19
3.8.4. İntrayardiak Kanda ACTH ve Tam Kan Parametreleri Değerlendirilmesi...19	
4.BULGULAR.....	20
4.1.Sıçanlarda Davranışın Değerlendirilmesi.....	20
4.2.Sıçanlarda Anksiyetenin Değerlendirilmesi.....	22
4.3. Sıçanlarda Ağrı Eşiğinin Değerlendirilmesi.....	25
4.4.Sıçanlarda Allodini Değerlendirilmesi.....	26
4.5.Sıçanlarda Kan Parametrelerinin Değerlendirilmesi.....	27
5.TARTIŞMA SONUÇ.....	32
6.KAYNAKLAR.....	34

TABLO VE ŞEKİLLER LİSTESİ

Tablo 1. Erkek ve dişi sıçan gruplarının açık alan düzeneğinde çizgi geçme, şahlanma, kaşınma ve defakasyon sayıları (sayı/5 dk).....	22
Tablo 2. Erkek ve dişi sıçan gruplarının T labirent testinde anksiyetenin değerlendirilmesi (sn).....	24
Tablo 3. Erkek ve dişi sıçan gruplarının hot plate testinde pençe yalama süresi (sn)...	26
Tablo 4. Erkek ve dişi sıçan gruplarında von Frey filamentlerde pençe çekme süresi ..	27
Tablo 5. 21. günde anneden ayrılan erkek ve dişi sıçan gruplarında tam kan parametreleri.....	29
Tablo 6. 28. günde anneden ayrılan erkek ve dişi sıçan gruplarında tam kan parametreleri.....	30
Tablo 7. 15. günden 21. güne kadar anneden bir saat ayrılan erkek ve dişi sıçan gruplarında tam kan parametreleri.....	30
Şekil 4.1. Erkek sıçan gruplarının açık alan düzeneğinde çizgi geçme, şahlanma, kaşınma ve defakasyon sayıları (sayı/5 dk).....	21
Şekil 4.2. Dişi sıçan gruplarının açık alan düzeneğinde çizgi geçme, şahlanma, kaşınma ve defakasyon sayıları (sayı/5 dk).....	22
Şekil 4.3. Erkek sıçan gruplarında T labirent testinde anksiyetenin değerlendirilmesi (sn).....	23
Şekil 4.4. Dişi sıçan gruplarınınT labirent testinde anksiyetenin değerlendirilmesi (sn)	23
Şekil 4.5. Erkek sıçan gruplarının hot plate testinde pençe yalama süresi (sn).....	25
Şekil 4.6. Erkek sıçan gruplarının hot plate testinde pençe yalama süresi (sn).....	25
Şekil 4.7. Erkek sıçan gruplarında von Frey filamentlerde pençe çekme süresi (sn) ve uygulanan ağırlık (gr).....	26
Şekil 4.8. Dişi sıçan gruplarında von Frey filamentlerde pençe çekme süresi (sn) ve uygulanan ağırlık (gr).....	27
Şekil 4.9. Erkek sıçan gruplarında bazı tam kan parametreleri.....	28
Şekil 4.10. Dişi sıçan gruplarında bazı tam kan parametreleri.....	28
Şekil 4.11. Erkek ve dişi sıçan gruplarında kanda ACTH değerleri (pg/dL).....	29

TEŞEKKÜR

Bu proje THD-2015-5846 hızlı destek projesi olarak BAP tarafından kabul edilmiştir.
BAP birimine teşekkür ederiz.

ÖZET

Yenidoğanın anneye bağımlı olduğu süt alma süresinin uzaması veya bu süre içerisinde kısa süreli strese maruz kalmaların daha sonra davranışlar üzerine, korkunun öğrenilmesine ve somatik duyuların gelişimine ve hematopoeze etkisini araştırmak ve cinsiyete göre ilişkilendirmek için bu çalışma planlanmıştır.

Bu amaçla her iki cins için üç ayrı grup oluşturulmuştur. Doğumu takiben anneden beslendiği 21. gün sonra ve 28 gün sonra ayrılan iki gruba anneden 21 gün sonra ayrılan ancak son bir hafta hergün bir saat süreyle ayrılan anneden ayırma stresi uygulanan grup ilave edilmiştir.

Davranış parametreleri açık alan düzeneğinde, emosyonel öğrenme ve panik davranışlar yükseltilmiş T-labirente bakılmış, somatik duyular için sıcak plaka testi ile ağrı eşiği değerlendirilmiş, Von Frey filamentleri ile allodoni gelişip gelişmediğine bakılıp yine somatik duyu algılaması test edilmiştir. Stresin gelişimi stres hormonu analizi ile yapılmış, tam kan sayımı ile hematopoezin baskılanıp baskılanmadığı kontrol edilmiştir. Kısa süreli anneden izole edilerek uygulanan stres, açık alanda lokomotor aktiviteyi azaltmış, sıcak plakada pençe yalama süresini etkilememiş, T-labirente kaçma süresini uzatmış, ACTH da artışa, kan parametrelerinde azalmaya neden olmuştur. emosyonel öğrenmeyi, somatik duyuların algılanmasını etkilememiş ancak, farklı test apareylerinde depresif veya panik davranışa neden olmuştur.

Sonuç olarak anneden ayrılma süresi tamamlanmadan strese maruz kalınırsa emosyonel stresin ve panik davranışın ortaya çıktığını, ancak emosyonel öğrenmenin bozulmadığını, her iki cins içinde geçerli olduğunu söyleyebiliriz. Anneden süt almaya devam edilen evrede uygulanan stres, stres hormonlarını arttırarak hematopoezi de olumsuz şekilde etkilemektedir. Anneden ayrılma süresinin uzaması açık alanda anksiyeteyi arttırsada olumsuz bir davranışa ve strese neden olmamıştır.

Anahtar kelimeler: anneden ayrılma süresi, davranış parametreleri, anksiyete, emosyonel öğrenme, ağrı eşiği, kan parametreleri.

Abstract

Thus study aimed to investigate the effects of the period of the separation newborn from mother and the short-term maternal deprivation on behaviour, fear of the learning and the development of somatic sensation and investigate the effect of hematopoiesis on the rats. The study is to associate by gender. To this end, three groups were formed for both sexes were fed from the mother after birth. First and second groups are separated after 21 and 28 days from the mother respectively, third group is separated after 21 days but last week every day for one hour maternal separation stress is added administered. The behavior parameters is evaluated in open field arrangement, emotional learning and panic behavior were looked in the elevated T-maze, the pain threshold for somatic sense was evaluated in the hot plate test and Von Frey filament. ACTH and complete blood analysis was performed.

Short-term stress is applied isolated from the mother, reduced locomotor activity in the open field, did not affect the paw licking time in the hot plate, which extends the time to escape in the T-maze, ACTH increases, causing a decrease in blood parameters. Did not affect the emotional learning and somatic sensation, caused depression or panic behavior in different testing apparatus.

As a result, if the exposure time is complete separation from the mother's emotional stress and stress the emergence of panic behavior, but that the emotional learning impairment, we can say that applies to both sexes. Mother to be applied in the milk stage continue to stress also adversely affect hematopoiesis by increasing stress hormones. The extended separation from the mother does not lead to negative behavior and stress but only increased anxiety in open field.

Key words: maternal separation time, the parameters behavior, anxiety, emotional learning, pain threshold, blood parameters.

1.GİRİŞ

Deneylerde kullanılan hayvanlar önemli bir varyasyon kaynağıdır. Kullanılan hayvanın yaşı, cinsiyeti, beden ağırlığı, kardeş sayısı, gibi özellikler deney sonuçları üzerinde etkilidir. Sıçanlar sosyal hayvanlardır ve grup halinde yaşayabilirler. Sosyal davranışlar koku, ses ve duruş gibi iletişimi arttıran öğelerdir. Erkekler dişilere göre daha saldırgandır. Sıçanlarda normal davranışlar onlara sağlanan şartlara bağlıdır. Aynı cinsten sıçanlar bir arada tutulmaya hazırdır. Kafeslere tek tek ya da çok büyük gruplar halinde konulması onları daha saldırgan, anormal davranışlara ve fizyolojik özelliklerinde bazı değişimlere sebep olabilir (1). Nörofizyolojik olarak öğrenme bir yaşantı sonucu kimyasal, elektriksel ve yapısal bazı değişikliklere bağlı olarak yeni sinaptik bağların kurulması ile açıklanmaktadır (2). Öğrenme kompleks bir fonksiyon olup, fizyolojik koşullardaki değişikliklerden etkilenir. Bu nedenle de organizmanın iç ve dış ortamını bozan, dinamik durumu rahatsız eden stres faktörlerinin özellikle endokrin sistem ve sinir sisteminde biyokimyasal ve fonksiyonel değişikliklere neden olarak organizmada çeşitli komplikasyonlara yol açarken öğrenmeyi de etkileyeceği düşünülür (3). Ancak organizma her hangi bir stresle karşı karşıya kaldığında vereceği tepkiler çeşitli faktörlere bağlı olarak değişiklik gösterir. Bunlar stres ve bireye bağlı özelliklerdir. Bireyin yaşı, cinsiyeti bu faktörler arasında yer alır ve bireyin gelişim özelliklerine bağlı olarak stres oluşturacak durumlar ve etkileri farklıdır (4,5). Anneden ayrılma stresi yaşamın erken döneminde kemirgenlerde sıklıkla kullanılan bir anksiyete modelidir. Bu modelde, kemirgen yavruları doğumdan sonraki üç hafta içerisinde herhangi bir zamanda çeşitli sürelerle annelerinden ayrılır. İki çeşidi olan modelde

“Maternal Deprivasyon”da anneden ayrılan her yavru kardeşlerinden de ayrı tutulur. Bir tür sosyal izolasyon da olan bu model çok güçlü bir strestir. İkinci model olan “Maternal Separasyon”da ise anneden ayrılan yavruların hepsi bir arada tutulur, sıklıkla kullanılan modeldir (6). Anneden ayrılma günde bir kaç saat ve tekrarlayan stres şeklinde ya da bir kez 24 saatlik ayrılma şeklinde uygulanmaktadır. Stres, davranışlarımızı etkileyen ve çok sayıda hastalığa sebep olabilen, insan ve hayvan biyolojisinde yaygın rol oynayan önemli bir çevresel faktördür. Memelilerde stres oluşturan çeşitli etkenler nedeniyle otonom sinir sisteminin sempatik bileşeni ve hipotalamus-hipofiz-adrenal (HPA) sistemi aktive olmaktadır (6,7). Anneden ayrılma stresi yaşamış hayvanlarda ileri dönemde endokrin sistemde kalıcı değişiklikler oluşabilmektedir (8,9).BDNF, IGF-1 gibi nörotrofik faktörlerin hipotalamik seviyeleri anneden ayrılma stresi sırasında değişikliğe uğrar

Anneden ayrılmaya bağlı olumsuz etkilerin pek çoğu cinsiyete bağlı olarak meydana gelir (10). Cinsiyetin anneden ayrılma stresinde güçlü ve farklı rolü vardır. Dişi ve erkek sıçanlar farklı nöroendokrin ve davranışsal etkilerini gösterirler, stresten cinsiyete bağlı olarak hasar oluşabilmektedir (11). Yapılan araştırmalarda erkeklerin anneden ayrılma sürecinden daha çok etkilendikleri, erkek sıçanların bazal kortikosteron seviyelerinin dişilere göre daha yüksek olduğu görülmüştür (12). Uzamış anneden ayrılma stresi, erkek sıçanların beyinde glukokortikoid reseptör ekspresyonunu artırmaktadır. Anneden ayrılmış erkekler erişkin olduklarında dişilere göre daha çok korku ve anksiyete davranışı gösterirler. Anksiyetenin önemli bir göstergesi kan serumundaki kortizol seviyesinin değişmesidir. Kortizol seviyesinin değişme nedenleri arasında ise anormal ACTH seviyeleri, klinik depresyon, fizyolojik stres kaynakları (hipoglisemi, hastalık, ateş, trauma, ameliyat, korku, acı, aşırı soğuk veya sıcak, fiziksel zorlanma) olduğu bilinmektedir. Bireysel farklılıklar olmasına rağmen aynı bireyin, günün farklı saatlerinde de ritim farklılığı oluşmaktadır (13).Bu çalışmada yeni doğan erkek ve dişi sıçanlarda değişen sürelerde anneden ayırma anksiyetesinin öğrenme, bellek ve kan parametrelerine etkisi araştırıldı. Deney grupları çalışma sonunda abdomen açılarak intrakardiyak kanda ACTH seviyesi değerlendirildi.

2. GENEL BİLGİ

Anneden ayrılma stresinin, insan ve hayvanların fiziksel ve mental gelişimleri üzerindeki etkileri ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır ve yapılmaya devam etmektedir. Bu çalışmanın çıkış noktası çevremizde sokaklara bırakılan binlerce çocuğun ya da annesi tarafından terk edilen çocukların bu durumdan fiziksel ve mental olarak nasıl etkilendikleri sorusuna cevap bulmaktır. Bu çalışmayı planlarken denek olarak sıçanların seçilme nedeni omurgalı ve memeli olması, laboratuvar ortamında kontrollü ve standart şartlarda üretilme ve barındırma yapılabilmesidir. Ayrıca sıçanların, standart laboratuvar koşullarında üretilmesi ve bakılmasının, deney sonuçlarının güvenilirlik ve tekrar edilebilirlik özellikleri göz önüne alındığında çok önemli olduğu açıktır. Hayvanlar üzerinde stres oluşturacak tüm değişkenler deney sonuçlarında etkili olacaktır. Kafeslerde bulunan sıçan sayısı yem tüketimi üzerinde etkilidir. Yemin niteliği, deneysel standartlar arasında düşünülmesi gerekli bir varyasyon sebebidir. Hayvanın yediği yemin içeriği, kafesleme tipi, genetik özellik ve laboratuvar koşulları, sıçanların canlı ağırlık artışını etkilemektedir. Deneysel araştırmalarda %90 fare ve sıçanlar denek olarak kullanılmaktadır. Hayvan deneylerinin tekrar edilebilirliği ve sonuçların güvenirliliği yapılan çalışmaların standartlaşması ile mümkündür (14,15).

Deneylerde kullanılan hayvanların kendileri, önemli bir varyasyon kaynağıdır. Kullanılan hayvanın yaşı, cinsiyeti, beden ağırlığı, kardeş sayısı, gibi özellikler deney sonuçları üzerinde etkilidir. Sıçanlar sosyal hayvanlardır ve grup halinde yaşayabilirler. Sosyal davranışlar koku, ses ve duruş gibi iletişimi arttıran öğelerdir. Erkekler dişilere göre daha saldırgandır. Sıçanlarda normal davranışlar onlara sağlanan şartlara bağlıdır. Aynı cinsten sıçanlar bir arada tutulmaya hazırdır. Kafeslere tek tek ya da çok büyük gruplar halinde konulması onları daha saldırgan, anormal davranışlara ve fizyolojik özelliklerinde bazı değişimlere sebep olabilir (15).

Davranma; süngerler hariç tüm hayvanlarda görülen bir eylemdir. Davranma; basit hayatta kalma hareketlerinden, karmaşık sosyal tavırlara kadar hayvanın ve insanın verdiği tüm tepkilere denir. Davranma; hayvanın yaşamı, alışkanlıkları, fizyolojik durumu, yaşı, varsa oluşan hasarı hakkında ilk elden bilgi verir. Her hayvanın sergilediği davranışlar birbirinden farklıdır. Ancak aynı hayvan türleri aynı uyaran altında benzer tepkiler verir. Bunun istisnası olarak insan sosyal çevresi, eğitimi ve deneyimleri çerçevesinde benzer uyaranlara farklı çevresel tepkiler verir (fizyolojik tepkiler bu değişkenlerden bağımsız olduğu için insanlardan da benzer tepkiler alınabilir). Hayvanların benzer uyaranlara benzer tepkiler vermesinden yola çıkarak, uyarının etkisini ölçmeye yönelik yapılan, kontrollü ve standardize edilmiş laboratuvar testlerine “Davranış Testleri (Behavioural Tests)” denir (16). Davranış testleri çok çeşitli olup önceden standardize edilmek koşulu ile değişik türde hayvanlara uygulanabilir. Ancak uygulama kolaylığı ve uygulama süresinin kısa tutulması amacıyla en çok kullanılan laboratuvar hayvanları fare ve sıçandır (16).

Laboratuvar hayvanlarında büyümeyi genetik yapı, doğumda ana ağırlığı, doğumda yavru sayısı, bakım ve besleme koşulları gibi bir çok faktör etkilemektedir (19,25). Erken dönem büyüme, bireyin daha sonraki yaşamında sağlığını ve verimlerini etkiler (17,24,26). Bu dönemde yavru büyümesini etkileyen en önemli faktör alınan ana sütünün miktarı ve kalitesidir (23,30,31). Dolayısıyla ananın süt verimindeki varyasyon yavruların gelişimine yansımaktadır (22,27,28,30).

Guerra ve Nunes hamsterde doğumda yavru sayısı arttıkça yavruların doğum ağırlığı ve büyüme dönemindeki canlı ağırlık artışının düşük olduğunu bildirmiştir. Araştırmacılar, ana ve yavruların davranışlarının da doğumdaki yavru sayısından etkilendiğini, belirli bir yavru sayısından daha az veya çok yavrulu doğumlardan elde edilen yavruların büyümesinin olumsuz etkilendiğini, yavru sayısı çok olduğunda ananın yavru bakma kapasitesinin yetersiz kaldığını, yavru sayısı az olduğunda ise ananın yavrulara aşırı ilgisinin olumsuz etki yaptığını bildirmiştir. Heiko ve ark. sıçan ve tavşanda benzer sonuçları bildirmiş, doğumdaki yavru sayısı ile bu yavruların süttten kesim ağırlığı ve büyüme hızı arasında negatif ilişki olduğunu kaydetmişlerdir (24). Jameson ise bu ilişkiyi ancak çok az yavrulu doğumlarda olduğunu, doğumda daha ağır olan anaların

yavrularının daha hızlı büyüdüğünü tespit etmiştir. Pine ve ark. ile Vişaspando ve ark. da sıçanlarda benzer sonuçlar bildirmiş ve bu durumun annenin genel beden kondisyonu ile yani beden yağ depoları ile ilişkili olduğunu ve yağ depolarının gerektiğinde kullanılarak ananın laktasyon performansını arttırmasından kaynaklandığını bildirmiştir (25,29,32). Benzer bildirimler tavşanlarda da yapılmıştır.18 Memelilerde doğan yavru sayısı arttıkça ana sütünden yavru başına düşen oranın da azaldığı bildirilmiştir.14Fare ve sıçanlarda erken büyüme dönemlerindeki çevre ana tarafından şekillendirilir. Ana yavruya bakar, besler, sıcak tutar ve aynı zamanda yavrunun gelecekteki yaşamındaki temel çevre özelliklerini etkiler. Hatta yavruların beyin fonksiyonlarının bile ana davranışlarından etkilendiği bildirilmektedir. Ana davranışındaki varyasyonun yavrunun daha sonraki yaşam dönemlerinde çevreye ve sosyal güçlülere karşı verdiği neuroendokrin yanıtları etkilediği tespit edilmiştir (21). Champagne ve ark. sıçanlarda analık davranışlarında varyasyon bulunduğunu, analık davranışlarının yavru sayısı, yavruların süttten kesim ağırlığı ve cinsiyet ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir (20). Grup halinde yaşayan hayvanlarda ananın sosyal pozisyonu da yavruların erken dönem gelişimini etkiler. Sosyal üstünlük sıralamasında düşük pozisyonundaki anaların yeme ulaşması sınırlandığı için yavrularına gösterdikleri bakımda yetersiz olur. Bu analar stresli olur; bu stres annenin süt verimini etkiler (26,17).

2.1.Anne Yoksunluğu ve Beyinde Yapısal Değişiklikler

Anne yoksunluğu modellerinde, sıçanlarda hipokampal yapının, fonksiyonların ve plastisitenin etkilendiği gösterilmiştir (35,36). Çalışmalarda, dentat girusta, granül hücrelerinin oluşumunun geç embriyogenezis döneminde başladığı ve doğum sonrası ilk haftalara kadar devam ettiği gösterilmiştir (37). Yaşamın erken döneminde anne yoksunluğu hipokampal granül hücrelerinin sayılarını etkilemektedir. Anne yoksunluğuna maruz kalan hayvanlarda hipokampal nöron ve glia sayısında, mossy fiber dansitesinde ve hücre çoğalmasında azalma gösterilmiştir (35,36). Anne yoksunluğunun, hipokampusta astrositlerin çoğalma ve farklılaşmasını etkileyebileceğideileri sürülmektedir (34).

Limbik sistemin bir parçası olan hipokampus, yetişkinliğe kadar yeni nöron yapımının olduğu birkaç beyin bölgesinden birisidir. Hipokampusta, özellikle dentat girus

bölgesinde yeni nöron oluşumu, bilişsel fonksiyonlar ve duygu durum gelişimi açısından çok önemlidir. Bu bölgedeki yeni nöron oluşumu çevresel faktörler, hormonal değişiklik ve erken dönem yaşam deneyimlerine oldukça duyarlıdır. Erken dönem olumsuz yaşam deneyimlerinden olan anne yoksunluğuna maruz kalmış 3 haftalık erkek sıçanların hipokampusunda, nörogenezde geçici bir artış gösterilmiştir. Fakat bu geçici artıştan sonra yetişkinlikte (10 haftalık erkek sıçanlarda) nörogenezde azalma rapor edilmiştir (37). Bu çalışmalarda, glukokortikoidlerin normal beyin gelişimi için gerekli olduğu ve nörogenezde görülen azalmanın HPA eksen sisteminde gerçekleşen değişikliğe bağlı olabileceği ileri sürülmüştür. Anne yoksunluğuna bağlı merkezi sinir sisteminde gerçekleşen yapısal değişikliklerin dişi ve erkek arasında farklılık gösterdiği rapor edilmektedir. Erkek sıçanların, dişilerle karşılaştırıldığında, anne yoksunluğundan daha fazla etkilendikleri görülmüştür. Dişilerin, daha az etkilenmelerinin nedeni olarak ise gonadal hormonların koruyucu etkisi gösterilmiştir (34).

2.2. Anne Yoksunluğu ve Beyinde Nörokimyasal Değişiklikler

Birçok nörotrofik faktörün nöron gelişiminde rol oynadığı bilinmektedir. Nörotrofik faktörler yalnızca nöronların gelişimini desteklemekle kalmaz, aynı zamanda nöronların dallanması, yeni sinapsların oluşumu gibi sinirsel ağların kurulmasında görev alırlar. Anne yoksunluğunda görülen nörokimyasal değişiklikler arasında, beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF) ve sinir hücresi büyüme faktörünün (NGF) azalması bulunmaktadır (39,40). Anne yoksunluğuna maruz kalma sırasında, hücre proliferasyonu ve olgunlaşmasında rol alan insülin benzeri büyüme faktörü-I (insulin-like growth factor, IGF-1) ve BDNF gibi nörotrofik faktörlerin hipotalamik ve hipokampal düzeylerinde değişiklik olmaktadır. Nörotrofik faktörlerin düzeylerindeki bu değişiklik, dişi ile erkek arasında da farklılık göstermektedir (38,40). Bu hipokampal ve hipotalamik gelişim değişikliklerinin anneden ayrılma sırasında ve sonrasındaki dolaşımdaki kortikosteron düzeylerindeki artış ile ilişkili olabileceği ileri sürülürken cinsiyet farkının ise gonadal hormonların etkisine bağlı olduğu düşünülmektedir. Nörotrofik faktör düzeylerindeki değişiklikte leptin gibi diğer hormonlarında etkisi olabileceği ileri sürülmektedir (41,42).

Anne-bebek ilişkisine erken dönemde müdahaleler, nöroendokrin sistemi etkilemesi dışında nörotransmitter sistemlerini de etkilemektedir. Özellikle monoaminerjik ve glutamaterjik sistemde bir takım değişiklikler gerçekleşmektedir(33,39,43). Anne yoksunluğu, erkek sıçanlarda hipokampal glutamat sisteminin normal gelişimini bozmaktadır. Yapılan bir çalışmada erkek Wistar sıçanlarda tekrarlayan anneden ayırmanın, hipokampal glutamat reseptör ekspresyonunda değişikliklere neden olduğu gösterilirken, prefrontal kortekste böyle bir değişikliğe neden olmadığı gösterilmiştir (44). Öğrenme ve belleğin moleküler temelinde rol oynayan hipokampustaki glutamat aracılı N-metil-d-aspartat (NMDA) reseptör düzeylerinin, anne yoksunluğuna maruz kalma ile azaldığı rapor edilmiştir (40). Çalışmalarda, sinaptik plastisitenin moleküler temelinde yer alan NMDA reseptörlerinin alt gruplarında (NR2A ve NR2B) azalma ile birlikte sinaptik plastisitenin göstergelerinden biri olan nöral hücre adhezyon molekülünün polisialite formunda (polysialylated-neuronal cell adhesion molecule, PSA-NCAM) azalma gösterilmiştir (45). Hipokampusta görülen bu değişiklikler, glutamaterjik sistem fonksiyonunun azalması ile birlikte sinaptik plastisiteninde azaldığına işaret etmektedir (46). Yetişkin dönem stresin etkilerine NMDA reseptörveglukokortikoidreseptör (GR) etkileşiminin aracılık ettiği bilinmektedir. Glukokortikoidlerin, hipokampal nöron kültürlerinde, GR aracılığı ile hücre içine NMDA reseptör aracılı Ca^{+2} geçişini ve NMDA bağlı LTP'yi kolaylaştırdığı rapor edilmiştir. Ayrıca, stres hipokampusta ekstrasellüler glutamat salınımında artışa ve glutamat reseptörlerinin aşırı aktivasyonuna neden olmaktadır. Artan glutamat ise, eksitotoksisite için risk faktörü oluşturmaktadır (47). Stres hormonlarının hedefi olan ve plastisitenin yoğun olduğu hipokampusta, kortikosteron düzeyinin bazal seviyede olduğu durumlarda LTP'nin spesifik paterni görülürken, kortikosteronun artışı ile LTP'nin bu kendine özgü paterni bozulmaktadır. Ayrıca artan kortikosteronun, hipokampusta LTD'nin oluşumunu kolaylaştırdığı rapor edilmektedir (52).

2.3. Anne Yoksunluğunun Davranış Üzerine Etkisi

Laboratuar ortamında kemirgenlerde anksiyete benzeri davranışlar genel olarak açık alan ve yükseltilmiş artı düzenek testlerinde değerlendirilmektedir (51). Bu testlerde, anne yoksunluğuna maruz kalan deneklerin uzun dönem anksiyete benzeri

davranışlarında çelişkili sonuçlar ortaya konulmuştur (48,49). Fakat çalışmaların genelinde, anne yoksunluğunun uzun dönemde anksiyete benzeri davranışların sıklığını arttırdığı ileri sürülmektedir (47). Gelişim sürecinde HPA eksenin anne yoksunluğundan etkilenmesi sonucu anksiyete benzeri davranışlarda artış görüldüğü düşünülmektedir (49).

Depresyon benzeri davranışların değerlendirildiği diğer bir test olan kuyruk asma testinde (tail suspension test), denekler kuyruklarından düzeneğe asılmakta ve denekler düzenden kurtulmadıkları anda düzenekte hareketsiz kalmaktadırlar. Bu testte deneklerin hareketsiz kalma süreleri depresyon benzeri davranış ölçütü olarak kullanılmaktadır. Anne yoksunluğuna maruz kalan yavrularda yetişkin dönemde kuyruk asma testinde hareketsiz kalma süresinin arttığı gösterilmiştir (50).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Deney Hayvanları

Erciyes Üniversitesi Hakan Çetinsaya Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezinden temin edilen 48 adet Wistar türü anneden yeni ayrılmış erkek ve dişi albino sıçan kullanıldı. Sıçanların ortalama ağırlığı çalışmaya başlamadan önce ve deneyler sırasında ve çalışma tamamlandıktan sonra tartılarak kaydedildi. Günün 07:00-19:00 saatleri arası aydınlık 19:00-07:00 karanlık olacak şekilde otomatik gün döngüsü oluşturulan, ortamın sıcaklığı ortalama 25 °C, nem oranı %40-50 arasında olacak şekilde klima ile sağlanan ortamlarda tutuldu. Kontrol sıçanlar standart sıçan yemi (Aytekinler, Türkiye) ile beslenip, su alımı kısıtlanmadı.

3.2 Deney Modeli Oluşturulması

Çalışmada cinsiyete göre hayvanlar rasgele 6 gruba ayrılacak; 1. Grup (n=8), Kontrol grubu dişi 21 gün sonunda anneden ayırma. 2. Grup (n=8), Kontrol grubu erkek 21 gün sonunda anneden ayırma. 3. Grup (n=8), 15 gün sonunda anneden 7 gün boyunca 12.00-13.00 saatleri arasında 1 saat ayırma dişi grup. 4. Grup (n=8), 15 gün sonunda anneden 7 gün boyunca 12.00-13.00 saatleri arasında 1 saat erkek grup. 5. Grup (n=8), 28 gün sonunda anneden ayırma dişi grup. 6. Grup (n=8), 28 gün sonunda anneden ayırma erkek grup olmak üzere altı grup oluşturuldu.

3.3.Davranışın Değerlendirilmesi: Açık Alan Düzeneği

Deney hayvanlarının davranış parametrelerini elde etmek için kullanılır, 100x100x30 cm ebatlarında, zemini çizgilerle 16 eşit kareye ayrılmış (ortadaki 4 kare merkezi bölge,

kenarlardaki 12 kare periferik bölge olarak kabul edilir) pleksiglastan yapılmış üstü açık, kare şeklinde bir düzendi Parent vd. (2012). Deney hayvanı açık alan düzeneğinin orta kısmına bırakılır. Değerlendirme için sıçanların beş dakikalık test süresince lokomotor aktive olarak, toplam kat ettikleri mesafe, keşif davranışı olarak; arka ekstremitelerin üzerine yükselme sayısı, otonomik fonksiyon olarak; kaçınma süresi ve sayısı, hareketsiz kalma (donma) süre ve sayısı, defekasyon sayısı belirlendi. Görüntülü kayıt sistemi ile aynı esnada merkezde ve periferde geçirdiği toplam süre periferden merkeze ve merkezden perifere geçiş süreleri sayı, sn cinsinden değerlendirildi.

3.4. Anksiyetenin Değerlendirilmesi: Yükseltilmiş T-Labirent Düzeneği

Bazal anksiyetenin ölçülmesi, emosyonel hafızanın değerlendirilmesi, sıçan T labirentler kullanılır. Şartlı ve şartsız korkunun oluşturulması, anksiyete ve panik davranışın değerlendirilmesi bu düzenek aracılığıyla yapılır. Kapalı kola yerleştirilen hayvanın dört ekstremitesi ile açık alana çıkması kaydedilir, deney süresi 5 dakika olup, 300sn de kapalı kolu terk etmezse deney sonlandırılır. Uygulama üç kez tekrarlanacak ve kapalı kolu terk etme sürelerinin ortalaması sakinme cevabı olarak değerlendirilir. Şartsız korku, panik davranış için etrafı açık olan açık kollardan birine bırakılan deney hayvanının tek yönlü kaçışla kapalı kola girme süresi tayin edilir. Kaçma latansı olarak kaydedilen bu süre şartsız korku cevabını göstermektedir. Uygulama bir kez yapılacak, eğer deney hayvanı kapalı kola girmez ise, deney 300 sn de sonlandırılır. Düzenek ilk kez uygulandığında deney hayvanında anksiyete modeli oluşturmak için kullanılır ve sakinme ve kaçma süreleri bazal anksiyete değerlerini verir. Deney üç gün tekrarlanarak pekiştirme ve korkunun öğrenilmesi gerçekleştirilir.

3.5. Ağrı Eşiğinin Değerlendirilmesi: Sıcak Plaka Testi (Hot Plate)

Ağrı eşiği değerlendirmek için kullanılır Eddy ve Leimback (1953). Isı kaynağı, zamanlayıcı ve güç kaynağından oluşan, 27.5 x 22.5 cm ebatlarında, kare şeklinde bir düzeneştir ve rodentlerin ağrı eşiğinin değerlendirilmesinde halen en çok kullanılan yöntemlerdendir. Temel olarak 50-56°C'ye kadar ısıtılmış bir yüzeyden (bakır veya alüminyum) oluşur. Hayvanın ısıtılan yüzey üzerinde belli bir bölge sınırlarında kalması için hareket kabiliyetini sınırlamayacak büyüklükte cam veya pleksiglas silindirler

kullanılır. Yüzeye bırakılmasından hayvanın arka ayağını çekmesine kadar olan süre hesap edildi. Belirli bir süre bu düzenek içine konulan hayvanın, levhanın ısınması ile yalama, sıçrama gibi davranışları sayılır ve değerlendirildi. Literatürde en çok kullanılan yöntemlerden biri olmasına rağmen hayvanın ağrıyı algıladığı gözlemlene kriteri çeşitlilik gösterir, hangi davranışın ağrı belirtisi olarak kabul edileceği konusunda sorunlar vardır ve zor bir deney metodudur.

Davranış sadece arka ayağın çekilmesi olabileceği gibi ayak çekme ve yalama, sallama veya sıçrama şeklinde olabilir. Nadiren hayvan sadece ön ayaklarını yalayabilir veya ön ayaklarla başlayan reaksiyon arka ayağın yalanmasıyla sonlanabilir South ve Smith (1998). Bir farenin normal reaksiyon süresi ortalama 5 ile 20 saniye arasında değişir. Doku hasarına neden olacağı için test 60 sn'den fazla uygulanmamalıdır. 60 sn kadar tepki vermeyen sıçanlar zemin üzerinden çekilmelidir. Her iki davranışın da supraspinal olarak tamamlanan tepkiler olduğu düşünülür. Testin duyarlılığı, sıcaklığın azaltılması ve ilk uyarılan davranışın reaksiyon zamanının ölçülmesi ile artırılabilir, reaksiyon zamanındaki değişiklik anksiyolitik etki için belirleyicidir.

3.6.Allodini Değerlendirilmesi: von Frey Flament Testi

Duyusal performansı test eder Osikowicz vd. (2013). Farklı kalınlıkta kılların ekstremitelere (bazen de farklı vücut yüzeylerine) teması ile deney hayvanının uyarana verdiği cevap esasına dayanır. Uyarıcı spesifik değildir. Serbest hareket eden denekte uygulama zordur. Düşük eşikli mekanoseptörleri de nosiseptörler gibi aktive edilebilir. Sıçanlar zemini metal delikli telden oluşan, yan kısımları şeffaf mika ile kaplı bir düzeneğe yerleştirilir. Mekanik stimulus hayvanların arka pençe plantar yüzeyine yerleştirilirdi ve flamentler sırayla delikli metal zeminin altından uygulanır. Her bir flament en düşükten başlanarak arka pençe tabanına giderek artan bir kuvvetle (2 g' dan 15 g' a kadar), hayvan pençesini çekene kadar basınç uygulanarak denendi. Geri çekme yanıtları, her ölçüm arasında 10 sn olacak şekilde üst üste 3 kez tekrarlanır. Geri çekme eşik değeri bu üç ölçümün ortalaması olan flament değeri olarak kabul edilir.

3.7. Kan Parametrelerinin Değerlendirilmesi

Çalışma sonunda bütün sıçanların ağırlığına göre hesaplanan keta ve rompun ile anestezi sağlandı (10'ü ketalar/20'ü rompum). Sıçanlardan alınan 2mL intrakardiyak kan alınarak ACTH değerleri tayin edildi. Kan parametreleri Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Merkez Laboratuvarında tam kan sayımı (hemogram) 22 parametre, ACTH değerleri analiz edildi.

3.8 İstatistiksel Analiz

İstatistik metodları IBM SPSS Statistic 21 paket programı kullanıldı.

3.8.1 Açık Alan Parametrelerinin Değerlendirilmesi

Grupların birbiriyle karşılaştırılması normallik testi uygulanarak parametrik testlerden (One-Way ANOVA)- Tamhane testi ile değerlendirildi. Cinsiyetler arasındaki değerlendirme nonparametrik testlerden Mann Whitney ile değerlendirildi.

3.8.2 Hot Plate ve von Frey Testleri Parametrelerinin Değerlendirilmesi

Grupların birbiriyle karşılaştırılması normallik testi uygulanarak nonparametrik testlerden (One-Way ANOVA)- Tukey testi ile değerlendirildi. Cinsiyetler arasındaki değerlendirme nonparametrik testlerden Mann Whitney ile değerlendirildi.

3.8.3 T Labirent Testi Değerlendirilmesi

Grupların birbiriyle karşılaştırılması normallik testi uygulanarak nonparametrik testlerden (One-Way ANOVA)- Tamhane testi ile değerlendirildi. Cinsiyetler arasındaki değerlendirme nonparametrik testlerden Mann Whitney ile değerlendirildi.

3.8.4 İntrayardiyak Kanda ACTH ve Tam Kan Parametreleri Değerlendirilmesi

Grupların birbiriyle karşılaştırılması normallik testi uygulanarak nonparametrik testlerden (One-Way ANOVA)- Tamhane testi ile değerlendirildi. Cinsiyetler arasındaki değerlendirme nonparametrik testlerden Mann Whitney ile değerlendirildi.

4.BULGULAR

4.1.Sıçanlarada Davranışın Değerlendirilmesi

Sıçanlarda davranış değerlendirilmesinde sıklıkla kullanılan açık alan düzeneğine bırakılan sıçanların 5 dakika boyunca çizgi geçme,şahlanma (arka iki ekstremitesi üzerinde yükselme), kaşınma ve defekasyon sayıları kaydedildi. Veriler aşağıda Şekil 4.1,Şekil 4,2 ve Tablo 1’de sunulmuştur.

Deney gruplarının kısaltmaları;

21.GAAEG= 21. günde anneden ayrılan erkek sıçan grubu

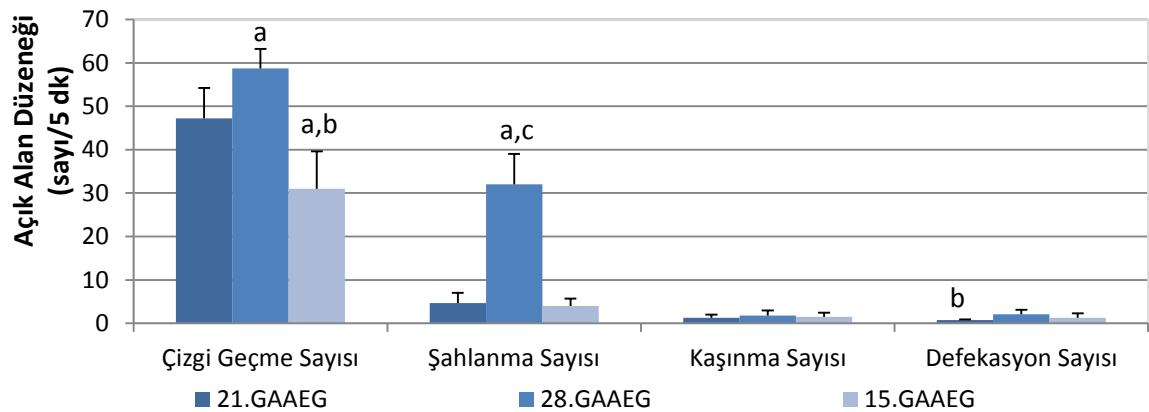
21.GAADG= 21. günde anneden ayrılan dişi sıçan grubu

28.GAAEG= 28. günde anneden ayrılan erkek sıçan grubu

28.GAADG= 28. günde anneden ayrılan dişi sıçan grubu

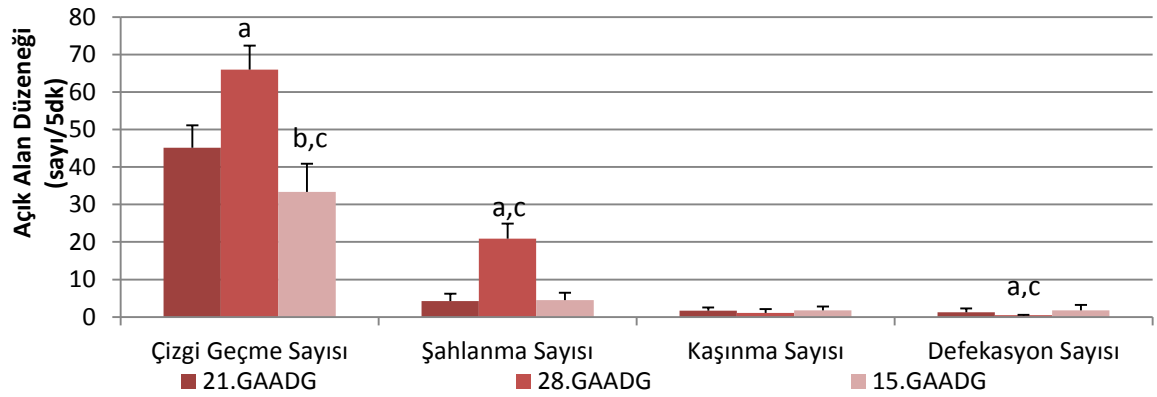
15.GAAEG= 15. günden 21. güne kadar anneden bir saat ayrılan erkek sıçan grubu

15.GAADG=15. günden 21. güne kadar anneden bir saat ayrılan dişi sıçan grubu



Şekil 4.1.Erkek sıçan gruplarının açık alan düzeneğinde çizgi geçme, şahlanma, kaşınma ve defakasyon sayıları (sayı/5 dk)

$p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilir.^a 21. günde anneden ayrılan erkek sıçan grubundan anlamlı olarak farklıdır. ^b 28. günde anneden ayrılan erkek sıçan grubundan anlamlı olarak farklıdır. ^c 15. günden 21. güne kadar anneden bir saat ayrılan erkek sıçan grubundan anlamlı olarak farklıdır.



Şekil 4.2. Dişi sıçan gruplarının açık alan düzeneğinde çizgi geçme, şahlanma, kaşınma ve defakasyon sayıları (sayı/5 dk)

$p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilir.^a 21. günde anneden ayrılan dişi sıçan grubundan anlamlı olarak farklıdır. ^b 28. günde anneden ayrılan dişi sıçan grubundan anlamlı olarak farklıdır. ^c 15. günden 21. güne kadar anneden bir saat ayrılan dişi sıçan grubundan anlamlı olarak farklıdır.

Şekil 1’de açık alan düzeneğinde lokomotor aktivitenin göstergesi olan çizgi geçme sayısı ve keşif davranışların göstergesi olan kaşınma sayısı 28.GAAEG da anlamlı olarak diğer gruplardan fazladır.

Şekil 2’de açık alan düzeneğinde lokomotor aktivitenin göstergesi olan çizgi geçme sayısı ve keşif davranışların göstergesi olan kaşınma sayısı 28.GAADG da anlamlı olarak diğer gruplardan fazladır.

Tablo 1. Erkek ve dişi sıçan gruplarının açık alan düzeneğinde çizgi geçme, şahlanma, kaşınma ve defekasyon sayıları (sayı/5 dk)

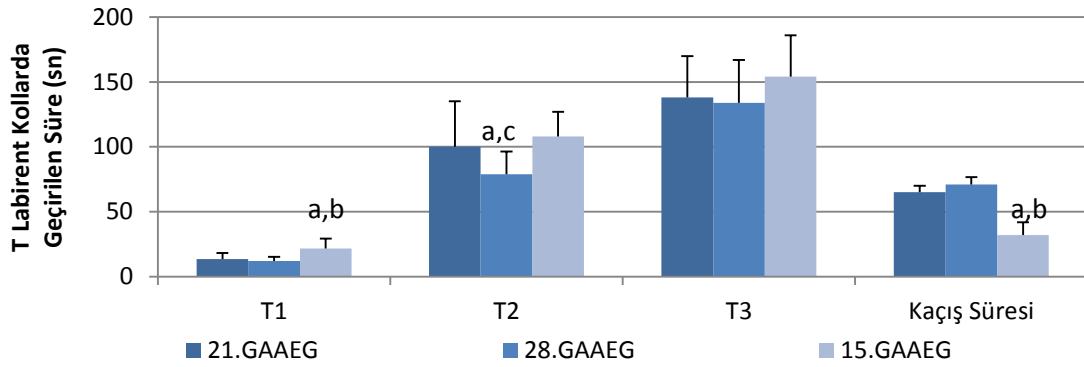
Açık Alan Testi	21.GAAEG	21.GAADG	<i>p</i>
Çizgi Geçme Sayısı	47,26±6,9	45,15±5,96	0,543
Şahlanma Sayısı	4,75±2,37	4,25±2,12	0,897
Kaşınma Sayısı	1,37±0,74	1,75±0,88	0,622
Defekasyon Sayısı	0,87±0,12	1,37±1,3*	0,03
Açık Alan Testi	28.GAAEG	28.GAADG	<i>p</i>
Çizgi Geçme Sayısı	58,75±4,52	66±6,42	0,152
Şahlanma Sayısı	32,25±7,12	20,87±4,25*	0,02
Kaşınma Sayısı	1,87±1,24	1,12±1,02	0,774
Defekasyon Sayısı	2,12±1,06	0,5±0,07*	0,001
Açık Alan Testi	15.GAAEG	15.GAADG	<i>p</i>
Çizgi Geçme Sayısı	31±8,61	33,37±7,55	0,663
Şahlanma Sayısı	4±1,69	4,50±2,2	0,965
Kaşınma Sayısı	1,5±1,06	1,87±1,11	0,753
Defekasyon Sayısı	1,37±1,1	1,75±1,45	0,452

$p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilir.* Erkek sıçanlardan anlamlı olarak farklıdır.

Tablo 1’de açık alan düzeneğinde 21. günde anneden ayrılan dişi sıçanların defekasyon sayısı erkek gruptan anlamlı olarak daha fazladır. 28. günde anneden ayrılan erkek sıçanların şahlanma ve defekasyon sayısı dişi gruptan anlamlı olarak daha fazladır.

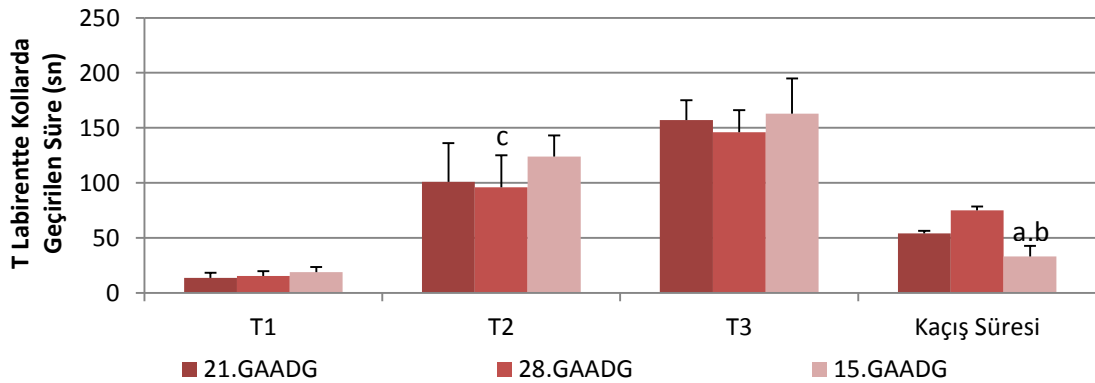
4.2.Sıçanlarda Anksiyetenin Değerlendirilmesi

Bazal anksiyetenin ölçülmesi, emosyonel hafızanın değerlendirilmesi, sıçan T labirentler kullanılır. Şartlı ve şartsız korkunun oluşturulması, anksiyete ve panik davranışın değerlendirilmesi bu düzenek aracılığıyla yapılır. Kapalı kola yerleştirilen hayvanın dört ekstremitesi ile açık alana çıkması kaydedilir, deney süresi 5 dakika olup, 300sn de kapalı kolu terk etmezse deney sonlandırılır. Uygulama üç kez tekrarlanacak ve kapalı kolu terk etme sürelerinin ortalaması sakınma cevabı olarak değerlendirilir. Veriler Şekil 3, Şekil 4 ve Tablo 2’de sunulmuştur.



Şekil 3. Erkek sıçan gruplarında T labirent testinde anksiyetenin değerlendirilmesi (sn)

$p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilir.^a 21. günde anneden ayrılan erkek sıçan grubundan anlamlı olarak farklıdır. ^b 28. günde anneden ayrılan erkek sıçan grubundan anlamlı olarak farklıdır. ^c 15. günden 21. güne kadar anneden bir saat ayrılan erkek sıçan grubundan anlamlı olarak farklıdır.



Şekil 4. Dişi sıçan gruplarının T labirent testinde anksiyetenin değerlendirilmesi (sn)

$p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilir.^a 21. günde anneden ayrılan dişi sıçan grubundan anlamlı olarak farklıdır. ^b 28. günde anneden ayrılan dişi sıçan grubundan anlamlı olarak farklıdır. ^c 15. günden 21. güne kadar anneden bir saat ayrılan dişi sıçan grubundan anlamlı olarak farklıdır.

Şekil 3’de anksiyetenin değerlendirilmesinde kullanılan T labirent testinde kapalı kolda kalma süresi (sn) 15. günden 21. güne kadar anneden bir saat ayrılan erkek sıçan

grubundan diğer gruplara göre anlamlı olarak fazladır ve kaçış süresi diğer gruplardan anlamlı olarak azdır.

Şekil 4’de anksiyetenin değerlendirilmesinde kullanılan T labirent testinde ve kaçış süresi 15. günden 21. güne kadar anneden bir saat ayrılan dişi sıçan grubu diğer gruplara göre anlamlı olarak azdır.

Tablo 2. Erkek ve dişi sıçan gruplarının T labirent testinde anksiyetenin değerlendirilmesi (sn)

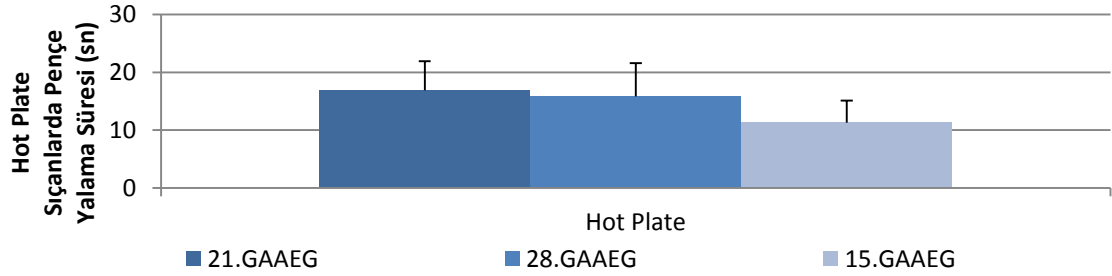
T Labirent Testi	21.GAAEG	21.GAADG	p
T1	13,67±4,61	13,62±4,47	0,998
T2	99,87±35,39	101,12±34,9	0,766
T3	138,12±32,68	157,12±18,27*	0,04
Kaçış Süresi	72,25±4,77	68,5±2,57*	0,045
T Labirent Testi	28.GAAEG	28.GAADG	p
T1	12,37±3,37	15,25±4,36	0,133
T2	78,62±17,45	96,62±29,09*	0,02
T3	134,12±32,99	146,62±19,61	0,258
Kaçış Süresi	79,5±5,78	71,87±3,39*	0,01
T Labirent Testi	15.GAAEG	15.GAADG	p
T1	21,75±7,7	18,87±4,45	0,637
T2	107,87±29,2	124,75±19,09*	0,02
T3	154±22,58	163,67±32,7	0,781
Kaçış Süresi	35,37±14,1	33,3±9,8	0,724

p<0,05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edilir.* Erkek sıçanlardan anlamlı olarak farklıdır.

Tablo 2’de anksiyetenin değerlendirilmesinde kullanılan T labirent testinde kaçış süresi (sn) 21. günde anneden ayrılan dişi sıçan grubundan erkek sıçan grubundan anlamlı olarak azdır. Kaçış süresi (sn) 28. günde anneden ayrılan dişi sıçan grubundan erkek sıçan grubundan anlamlı olarak azdır.

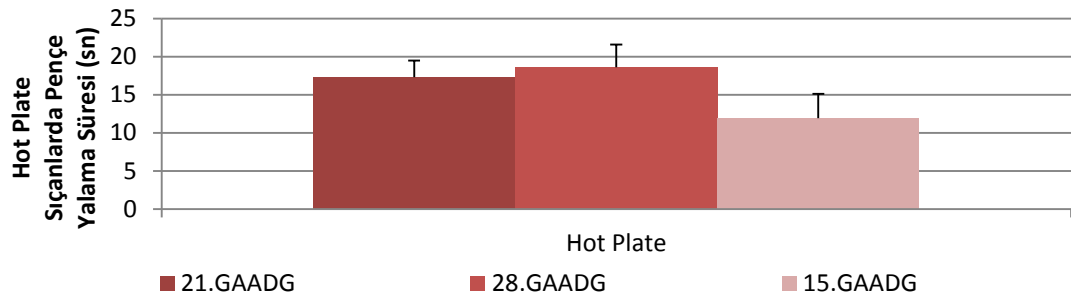
4.3. Sıçanlarda Ağrı Eşiğinin Değerlendirilmesi

Sıçanlarda ağrı eşiğinin değerlendirilmesinde hot plate pençe yalama testi sıklıkla kullanılmaktadır. Belirli bir süre bu düzenek içine konulan hayvanın, levhanın ısınması ile yalama, sıçrama gibi davranışları sayılır ve değerlendirildi. Veriler Şekil 5, Şekil 6 ve Tablo 3’de sunulmuştur.



Şekil 5. Erkek sıçan gruplarının hot plate testinde pençe yalama süresi (sn)

$p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilir.



Şekil 6. Erkek sıçan gruplarının hot plate testinde pençe yalama süresi (sn)

$p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilir.

Şekil 5 erkek ve Şekil 6 dişi sıçan gruplarında hot plate pençe yalama süresinde (sn) ağrı eşiğinin değerlendirilmesinde her iki cinsiyette de gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur.

Tablo 3. Erkek ve dişi sıçan gruplarının hot plate testinde pençe yalama süresi (sn)

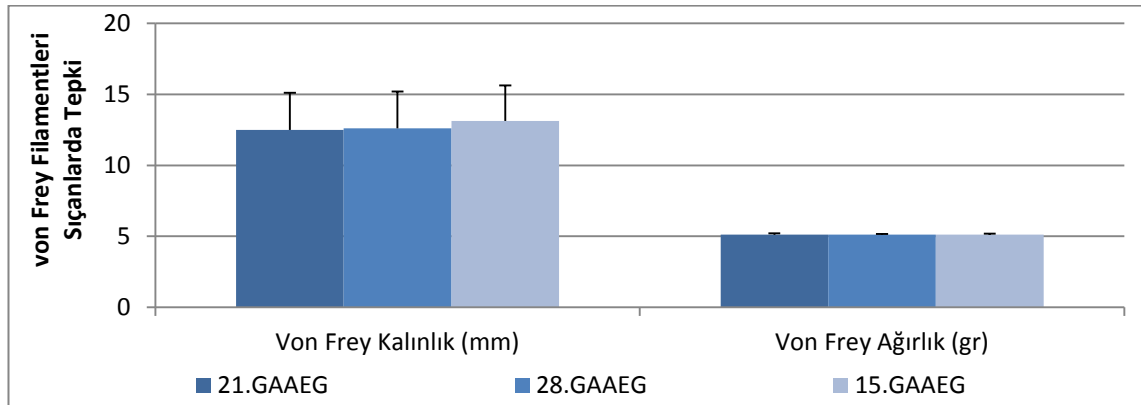
Hot Plate	21.GAAEG	21.GAADG	<i>p</i>
Pençe Yalama Süresi (sn)	16,91±2,26	17,36±4,82	0,661
Hot Plate	28.GAAEG	28.GAADG	<i>p</i>
Pençe Yalama Süresi (sn)	15,88±3	18,68±5,82	0,076
Hot Plate	15.GAAEG	15.GAADG	<i>p</i>
Pençe Yalama Süresi (sn)	11,33±3,25	11,93±3,86	0,978

$p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilir.

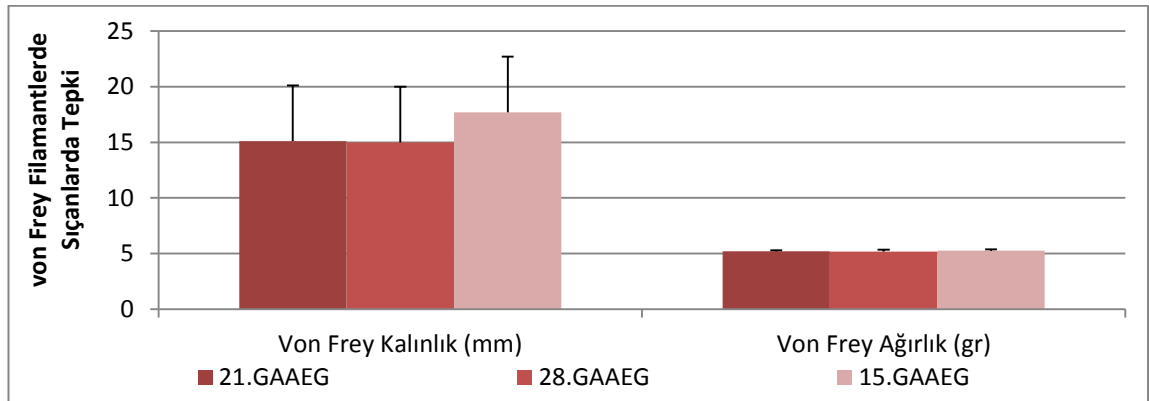
Tablo 3’de erkek ve dişi sıçan gruplarında hot plate pençe yalama süresinde (sn) ağrı eşliğinin değerlendirilmesinde her iki cinsiyette de gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur.

4.4.Sıçanlarda Allodini Değerlendirilmesi

Duyusal performansı test eder . Farklı kalınlıkta kılların ekstremiteye (bazen de farklı vücut yüzeylerine) teması ile deney hayvanının uyarana verdiği cevap esasına dayanır. Uyarın spesifik değildir. Mekanik stimulus hayvanların arka pençe plantar yüzeyine yerleştirilirdi ve filamentler sırayla delikli metal zeminin altından uygulandı. Veriler Şekil 7, Şekil 8 ve Tablo 4’de sunulmuştur.

**Şekil 7.** Erkek sıçan gruplarında von Frey filamentlerde pençe çekme süresi (sn) ve uygulanan ağırlık (gr)

$p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilir.



Şekil 8. Dişi sıçan gruplarında von Frey filamentlerde pençe çekme süresi (sn) ve uygulanan ağırlık (gr)

$p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilir.

Tablo 4. Erkek ve dişi sıçan gruplarında von Frey filamentlerde pençe çekme süresi (sn) ve uygulanan ağırlık (gr)

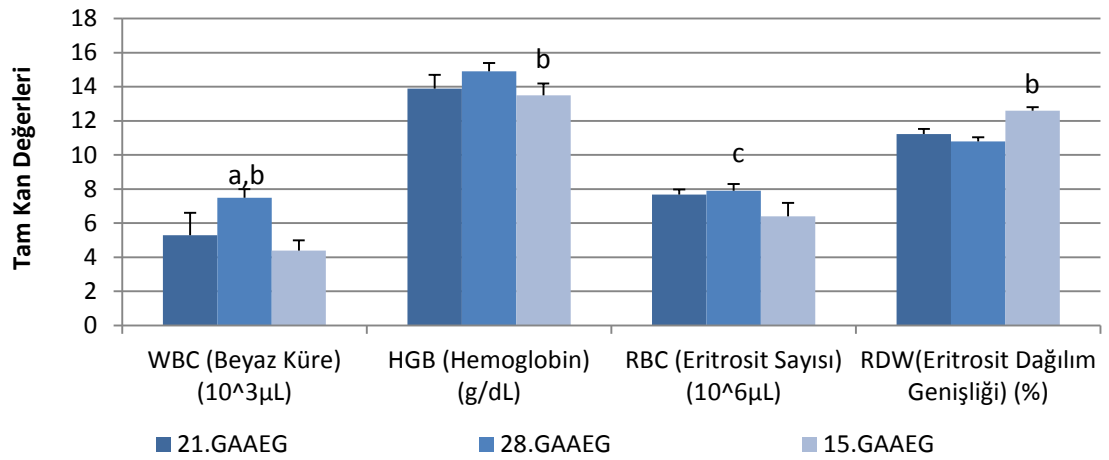
von Frey Testi	21.GAAEG	21.GAADG	<i>p</i>
von Frey Kalınlık (mm)	12,5±2,67	15,12±4,94	0,06
von Frey Ağırlık (gr)	5,12±0,08	5,2±0,12	0,745
von Frey Testi	28.GAAEG	28.GAADG	<i>p</i>
von Frey Kalınlık (mm)	12,6±2,6	15,1±4,92	0,258
von Frey Ağırlık (gr)	5,11±0,06	5,18±0,18	0,951
von Frey Testi	15.GAAEG	15.GAADG	<i>p</i>
von Frey Kalınlık (mm)	13,12±2,58	17,78±5,09*	0,001
von Frey Ağırlık (gr)	5,13±0,05	5,25±0,13	0,924

$p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilir.

Şekil 7 erkek ve Şekil 8 dişi sıçan gruplarında allodininin değerlendirilmesinde kullanılan von Frey filamentlerinde her iki cinsiyette gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmemiştir.

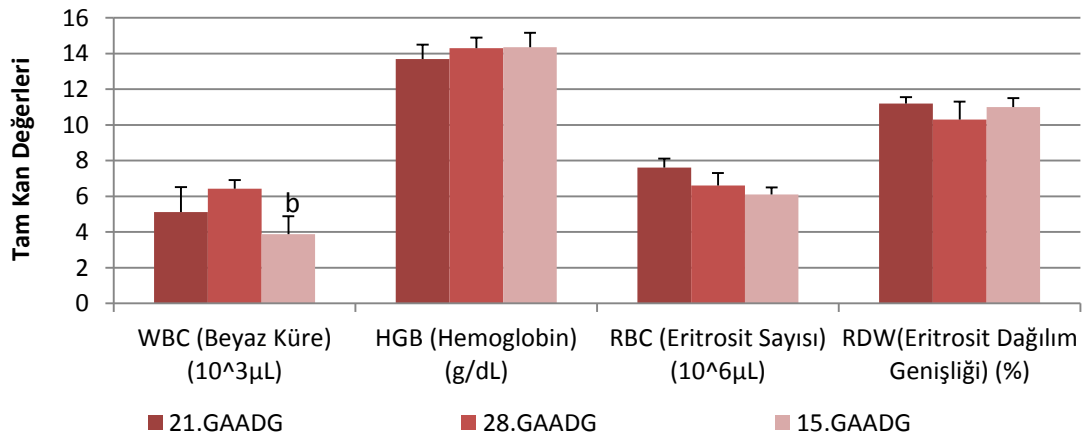
4.5.Sıçanlarda Kan Parametrelerinin Değerlendirilmesi

Çalışma sonunda bütün sıçanlardan alınan intrakardiyak kanda tam kan sayımı (hemogram) 22 parametre, ACTH değerleri analiz edildi. Veriler Şekil 9,10,11 ve Tablo 5,6,7’de sunulmuştur.



Şekil 9. Erkek sıçan gruplarında bazı tam kan parametreleri

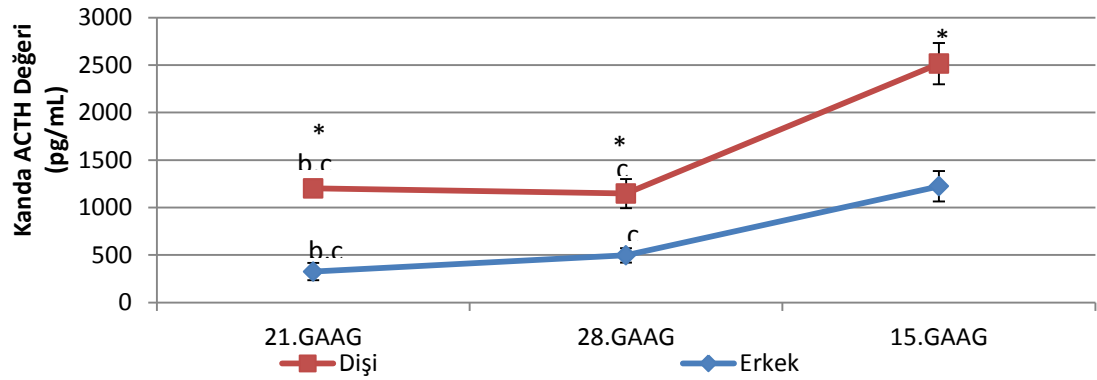
$p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilir.^a 21. günde anneden ayrılan erkek sıçan grubundan anlamlı olarak farklıdır. ^b 28. günde anneden ayrılan erkek sıçan grubundan anlamlı olarak farklıdır. ^c 15. günden 21. güne kadar anneden bir saat ayrılan erkek sıçan grubundan anlamlı olarak farklıdır.



Şekil 10. Dişi sıçan gruplarında bazı tam kan parametreleri

$p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilir. ^b 28. günde anneden ayrılan dişi sıçan grubundan anlamlı olarak farklıdır.

Şekil 9' da erkek sıçan gruplarında tam kan WBC (Beyaz Küre) ($10^3 \mu\text{L}$) değerleri 28. günde anneden ayrılan erkek sıçan grubunda diğer gruplardan anlamlı olarak fazladır.



Şekil 11. Erkek ve dişi sıçan gruplarında kanda ACTH değerleri (pg/dL)

$p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilir.^a 21. günde anneden ayrılan sıçan grubundan anlamlı olarak farklıdır.^b 28. günde anneden ayrılan sıçan grubundan anlamlı olarak farklıdır.^c 15. günden 21. güne kadar anneden bir saat ayrılan sıçan grubundan anlamlı olarak farklıdır.* Erkek sıçan grubundan anlamlı olarak farklıdır.

Şekil 11’de erkek ve dişi sıçan gruplarında kanda ACTH değerleri sunulmuştur. 15. günden 21. güne kadar anneden bir saat ayrılan erkek ve dişi sıçan gruplarında ACTH değerleri diğer gruplara göre istatistiksel olarak daha fazladır. Dişi deney gruplarında erkek deney gruplarına göre ACTH değeri anlamlı olarak fazladır.

Tablo 5. 21. günde anneden ayrılan erkek ve dişi sıçan gruplarında tam kan parametreleri

Kan Değerleri	21.GAAEG	21.GAADG	<i>p</i>
WBC (Beyaz Küre) ($10^3\mu\text{L}$)	5,36± 1,29	5,12±1,46	0,813
HGB (Hemoglobin) (g/dL)	13,96± 0,79	13,78±0,85	0,978
PLT (Platelet) ($10^3\mu\text{L}$)	681,5± 85,1	667,42± 60,5	0,347
RBC (Eritrosit Sayısı) ($10^6\mu\text{L}$)	7,65± 0,31	7,62± 0,53	0,885
HCT (Hematokrit) (%)	45,8± 1,81	43,27 ±2,58	0,165
MCV (Ort.Eritrosit Volümü) (fl)	58,41± 17,8	55,94 ±0,95	0,674
RDW (Eritrosit Dağılım Genişliği) (%)	11,23± 0,31	11,22± 0,35	0,987
PCT (Platekrit) (%)	0,4 ±0,05	0,45± 0,14	0,761

$p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilir.

Tablo 5’de 21. günde anneden ayrılan erkek ve dişi sıçan grupların tam kan parametreleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır.

Tablo 6. 28. günde anneden ayrılan erkek ve dişi sıçan gruplarında tam kan parametreleri

Kan Değerleri	28.GAAEG	28.GAADG	<i>p</i>
WBC (Beyaz Küre) ($10^3\mu\text{L}$)	7,56± 0,45	6,42±0,49	0,231
HGB (Hemoglobin) (g/dL)	14,9± 0,53	14,3±0,6	0,922
PLT (Platelet) ($10^3\mu\text{L}$)	873,4± 84,9	691,6± 45,26*	0,02
RBC (Eritrosit Sayısı) ($10^6\mu\text{L}$)	7,91± 0,39	6,66± 0,73	0,145
HCT (Hematokrit) (%)	51,2± 3,61	46,82 ±2,02	0,105
MCV (Ort.Eritrosit Volümü) (fl)	61,94± 3,61	56,56 ±1,63	0,074
RDW (Eritrosit Dağılım Genişliği) (%)	10,82± 0,24	10,32± 1,03	0,947
PCT (Platekrit) (%)	0,48 ±0,06	0,36± 0,03	0,431

$p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilir.

Tablo 6’da 28. günde anneden ayrılan dişi sıçan grupların PLT (Platelet) ($10^3\mu\text{L}$)değeri erkek sıçanlardan anlamlı olarak daha fazladır.

Tablo 7. 15. günden 21. güne kadar anneden bir saat ayrılan erkek ve dişi sıçan gruplarında tam kan parametreleri

Kan Değerleri	15.GAAEG	15.GAADG	<i>p</i>
WBC (Beyaz Küre) ($10^3\mu\text{L}$)	4,42± 0,63	3,88±0,99*	0,035
HGB (Hemoglobin) (g/dL)	13,52± 0,69	14,36±0,83	0,122
PLT (Platelet) ($10^3\mu\text{L}$)	699± 230,3	806,6± 64,4*	0,041
RBC (Eritrosit Sayısı) ($10^6\mu\text{L}$)	6,44± 0,78	6,14± 0,4	0,875
HCT (Hematokrit) (%)	47,7± 2,25	58,96 ±3,43	0,164
MCV (Ort.Eritrosit Volümü) (fl)	69,6± 2,4	58,96 ±3,43*	0,024
RDW (Eritrosit Dağılım Genişliği) (%)	12,66± 0,2	11,02± 0,51	0,747

Tablo 7’de 15. günden 21. güne kadar anneden bir saat ayrılan dişi sıçanlarda erkek sıçanlara göre WBC (Beyaz Küre) ($10^3\mu\text{L}$) ve MCV (Ort.Eritrosit Volümü) (fl) değeri daha az, PLT (Platelet) ($10^3\mu\text{L}$) değeri anlamlı olarak daha fazladır.

5.SONUÇ

Çalışmadan elde edilen bulgular değerlendirildiğinde aşağıdaki sonuçlara varılmıştır;

1. Anneden ayrılma süresi uzadığında lokomotor aktivite ve keşif davranışı her iki cins içinde artmış, daha tedirgin, daha anksiyetik bir davranış sergilenmiştir. Ayrılma süresinin uzaması anneye bağımlılığın artmasına neden olabilir.
2. Anneden ayrılma süresi öncesi kısa süreli anneden uzaklaştırma lokomotor aktiviteyi azalmış, depresif davranış benzeri aktivitede baskılanma ortaya çıkmıştır. Bu davranışta cinsiyetten bağımsızdır.
3. Anneden ayrılma süresinin uzaması veya bu süre içerisinde kısa süreli anneden uzaklaştırma emosyonel öğrenmeyi değiştirmemiş korkunun öğrenilmesi her iki cins içinde bozulmamıştır.
4. Anneden ayrılma süresi içinde kısa süreli anneden uzaklaştırmalar tek yönlü kaçış süresini artırarak, panik davranışı artırmış ve bu her iki cinsde de ortaya çıkmıştır.
5. Anneden ayrılma süresi ağrı eşiğini değiştirmemiş, somatik duyu algılanması bozulmamıştır ve bu duyu algılanmasının korunması her iki cins içinde söz konusudur.
6. Anneden ayrılma süresinin uzaması ACTH değerini değiştirmemiş, stres oluşturmamıştır. Ancak anneden ayrılma süresi içinde kısa süreli anneden uzaklaştırmalar ACTH değerini artırmış, stresin oluşmasına neden olmuştur. Bu durum her iki cinsde de cinsiyetten bağımsız olarak gözlenmiştir.
7. Anneden ayrılma süresinin uzaması kan parametrelerini etkilememiş ancak kısa süreli uzaklaştırmalar beyaz ve kırmızı kan hücre sayısını azaltmış hematopoezde baskılanmaya neden olmuştur.

Sonuç olarak anneden ayrılma süresi tamamlanmadan strese maruz kalınırsa emosyonel stresin ve panik davranışın ortaya çıktığını, ancak emosyonel öğrenmenin bozulmadığını, her iki cins içinde geçerli olduğunu söyleyebiliriz. Anneden süt almaya devam edilen evrede uygulanan stres, stres hormonlarını arttırarak hematopoezi de olumsuz şekilde etkilemektedir .

Anneden ayrılma süresinin uzaması belirgin bir stres oluşturmamakta stres hormonlarını etkilememekte, hematopoezi baskılamamakta anca anneye bağımlılık geliştirebilmektedir. Özellikle bu grup da bağımlılığa yatkınlık gelişebilir, yer tercihi testleri gibi deneylerle bağımlılık çalışmalarının yapılması önerilebilir.

6.KAYNAKLAR

1. Poyraz Ö. Laboratuar Hayvanları Bilimi. Ankara: Kardelen Matbacılık. 2000:20-46.
2. McBrain CJ, Macceferri G. Synaptic plasticity in hippocampal interneurons. Pharmacol. 1997; 75: 488-94.
3. Barry SF, Randolph BS, Stephen MR. Synopsis of Neuropsychiatry. New York, Maple Pres. 2000: 112-287.
4. McBrain CJ, Macceferri G. Synaptic plasticity in hippocampal interneurons. Pharmacol.1997, 75: 488-94.
5. Sorra KE, Fiala JC, Haris KM. Critical assesment of the involvement of perforation, spinules and spine brancing in hippocampal synapse formation. Compar Neurol. 1998, 398: 225-40.
6. Ellenbroek BA, Cools, AR. The long-term effects of maternal deprivation depend on the genetic background. Neuropsychopharmacology. 200; 23 (1): 99-106.
7. Spear LP. The adolescent brain and age related behavioral manifestations. Neurosci Biobehav Rev.2000,24 (4): 417-63.
8. Marais L, van Rensburg, SJ, van ZYL, Stein DJ, Daniels WM. Maternal separation of rat pups increases the risk of developing depressivelike behavior after subsequent chronic stress by altering corticosterone and neurotrophin levels in the hippocampus. Neurosci Res. 2008;61 (1): 106-12.
9. Kanit L, Yılmaz O, Taşkiran D, Kulalı B, Furedy JJ, Demirgören S, Pogün, S. Sexually dimorphiccognitive style, female sex hormones, and cortical nitric oxide. Physiol. Beha. 2000; 71(3): 277–287.

10. Schmidt MV, Levine S, Alam S. Metabolic signals modulate hypothalamic–pituitary–adrenal axis activation during maternal separation of the neonatal mouse. *J. Neuroendocrinol.* 2006;18 : 865–874.
11. Genest SE, Gulemoteve R, Laforet. Neonatal maternal separation and sex-specific plasticity of the hypoxic ventilatory response in awake rat. *J. Physiol.* 2004;554: 543–557.
12. Llorente R, Gallardo ML, Berzal AL. Early maternal deprivation in rats induces gender-dependent effects on developing hippocampal and cerebellar cells. *Int. J. Dev. Neurosci.* 2009;27: 233–241.
13. Freman Scott. *Biological Science*. Prentice Hall; 2nd Pkg edition 30: 2.
14. Ide T. *Laboratuar Hayvanlarında Temel İlkeler*. Ankara: Medipress Matbaacılık. 2003;5-24.
15. Poyraz Ö. *Laboratuar Hayvanları Bilimi*. Ankara: Kardelen Matbaacılık. 2004;35-41.
16. Desbonnet L, Garrett L, Daly E, Mcdermott KW, Dnan, TG. Sexually dimorphic effects of maternal separation stress on corticotrophin-releasing factor and vasopressin systems in the adult rat brain. *Int. J. Dev. Neurosci.* 2008; 26: 259–268.
17. Anonim. *Guide for the care and use of laboratory animals*. Institute of Laboratory Animal Resources. National Academy Press, Washington, D.C., USA. 1996.
18. Barnett SA, Dickson RB .Milk production and consumption and growth of young of wild mice after ten generatiojns in a cold environment. *J Physiol.* 1984;17:346-409.
19. Campbell MT . The effect of maternal mass on litter size and off spring survial in the Hispid Cotton Rat (*Sigmodon Hispidus*). *Can J Zool.* 1995; 73:133-140.
20. Champagne FA, Francis DD, Mar A, Meaney MJ . Variations in maternal care in the rat as a mediating influence for the effects of environment on development. *Physiol Behav.* 2003;79:359-371.

21. Coutellier L, Friedrich AC, Failing K, Würbel H . Variations in the postnatal environment in mice: effects on maternal behaviour and behavioural endocrine responses in the adult offspring. *Physiol Behav.* 2008; 93: 395-407.
22. Dryden GL, Anderson RR .Milk consumption and its relation to growth in the Musk Shew Suncus Murinus. *Comp Biochem Physiol.* 1978; 60: 213-216.
23. Guerra RF, Nunes CR .Effects of litter size on maternal care, body weight and infant development in Golden Hamsters (*Mesocricetus Auratus*). *Behavioural Processes.* 2001; 55: 127-142.
24. Heiko G R, Geraldine P , Volker S, Dietrich Von H, Robyn Hudson. Separating Maternal and Litter-Size Effects on Early Postnatal Growth in Two Species of Altricial Small Mammals. *Physiol Behav* 2008; 93: 826-834.
25. Jameson EW. Prepartum Mamogenesis, Milk Production, and Optimal Litter Size. *Oecologia.* 1998; 114: 288-291.
26. Knittle J, Hirsch J . Effect of Early Nutrition on The Development of Rat Epididymal Fat Pads: Cellularity and Metabolism *J. Clin Invest.* 1968; 47: 2091-2098.
27. Mattingly DK, McClure PA .Energetics of Reproduction in Large Littered Cotton Rats (*Sigmodon Hispidus*) *Ecology* 1982; 63 :183-195.
28. Millar JS. Energetics of Reproduction in *Peromyscus Leucopus*: The Costs of Lactation. *Ecology* 1978; 59 :1055–61.
29. Pine AP, Jessop NS, Oldham JD .Maternal Protein Reserves and Their Influence on Lactational Performance in Rats. *Brit J Nutr.* 1994; 71:13–27.
30. Rödel HG, Bora A, Kaetzke P, Khaschei M, Hutzelmeyer H, Zapka M, Holst, DV Timing of Breeding and Reproductive Performance of Female European Rabbits in Response to Winter Temperature and Body Mass. *Can J Zool.* 2005; 83: 935–42.
31. Said SI, Muwalla MM, Hanrahan JP . Sources of Variation and Repeatability For Litter Size, Body Weight and Matured Performance of Awassi Ewes. *J Vet Anim Sci.* 1999; 43:461-465.

32. Vişaşpando SF, Butte NF, Wong WW, Flores-Huerta S, Hernandez- Beltran MJ, Smith EO, Garza, C . Lactation Performanca of Rural Mesoamerindians. *Eur J Clin Nutr.* 1992; 46:33-48.
33. Pickering C, Gustafsson L, Cebere A, Nylander I, Liljequist S. Repeated maternal separation of male Wistar rats alters glutamate receptor expression in the hippocampus but not the prefrontal cortex. *Brain Res.* 2006; 1099:101-8.
34. Llorente R, Gallardo ML, Berzal AL, Prada C, Garcia-Segura LM, Viveros MP. Early maternal deprivation in rats induces gender-dependent effects on developing hippocampal and cerebellar cells. *Int J Dev Neurosci.* 2009; 27:233-41.
35. Huot RL, Plotsky PM, Lenox RH, McNamara RK. Neonatal maternal separation reduces hippocampal mossy fiber density in adult Long Evans rats. *Brain Res.* 2002; 950:52-63.
36. Fabricius K, Wörtwein G, Pakkenberg B. The impact of maternal separation on adult mouse behaviour and on the total neuron number in the mouse hippocampus. *Brain Struct Funct.* 2008; 212:403-16.
37. Kuhn HG, Dickinson-Anson H, Gage FH. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J Neurosci.* 1996; 16:2027-33.
38. Oomen CA, Soeters H, Audureau N, Vermunt L, van Hasselt FN, Manders EM et al. Severe early life stress hampers spatial learning and neurogenesis, but improves hippocampal synaptic plasticity and emotional learning under high-stress conditions in adulthood. *J Neurosci.* 2010; 30:6635-45.
2739. Knuth ED, Etgen AM. Long-term behavioral consequences of brief, repeated neonatal isolation. *Brain Res.* 2007; 1128:139-47.
40. Roceri M, Hendriks W, Racagni G, Ellenbroek BA, Riva MA. Early maternal deprivation reduces the expression of BDNF and NMDA receptor subunits in rat hippocampus. *Mol Psychiatry.* 2002; 7:609-16.

41. Viveros M-P, Dí'az F, Mateos B, Rodríguez N, Chowen JA. Maternal deprivation induces a rapid decline in circulating leptin levels and sexually dimorphic modifications in hypothalamic trophic factors and cell turnover. *Horm Behav* 2010; 57:405-414.
42. Llorente R, Miguel-Blanco C, Aisa B, Lachize S, Borcel E, Meijer OC et al. Long term sex-dependent psychoneuroendocrine effects of maternal deprivation and juvenile unpredictable stress in rats. *J Neuroendocrino*. 2011; 23:329-44.
43. Lee JH, Kim HJ, Kim JG, Ryu V, Kim BT, Kang DW et al. Depressive behaviors and decreased expression of serotonin reuptake transporter in rats that experienced neonatal maternal separation. *Neurosci Res*. 2007; 58:32-9.
44. Ellenbroek BA, Derks N, Park HJ. Early maternal deprivation retards neurodevelopment in Wistar rats. *Stres* 2005; 8:247-57.
45. Aisa B, Elizalde N, Tordera R, Lasheras B, Del Rí'o J, Ramí'ez MJ. Effects of neonatal stress on markers of synaptic plasticity in the hippocampus: implications for spatial memory. *Hippocampus* 2009; 19:1222-31.
46. Ellenbroek BA, Riva MA. Early maternal deprivation as an animal model for schizophrenia. *Clin Neurosci Res*. 2003; 3:297-302.
47. Lowy MT, Gault L, Yamamoto BK. Adrenalectomy attenuates stress-induced elevations in extracellular glutamate concentrations in the hippocampus. *J Neurochem*. 1993; 61:1957-60.
48. Akıllıoğlu K, Binokay S, Kocahan S. The effect of neonatal N-methyl-D-aspartate receptor blockade on exploratory and anxiety-like behaviors in adult Balb/c and C57BL/6 mice. *Behav Brain Res*. 2012; 233:157-61.
49. Kalinichev M, Easterling KW, Plotsky PM, Holtzman SG. Long-lasting changes in stress-induced corticosterone response and anxiety-like behaviors as a consequence of neonatal maternal separation in Long-Evans rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 2002; 73:131-40.

50. McIntosh J, Anisman H, Merali Z. Short- and long-periods of neonatal maternal separation differentially affect anxiety and feeding in adult rats: gender-dependent effects *Brain Res Dev Brain Res.* 1999; 113:97-106.
51. Wigger A, Neumann ID. Periodic maternal deprivation induces gender-dependent alterations in behavioral and neuroendocrine responses to emotional stress in adult rats *Physiol Behav* 1999; 66:293-302.
52. Martini M, Valverde O. A single episode of maternal deprivation impairs the motivation for cocaine in adolescent mice. *Psychopharmacology.* 2012; 219:149-58.