T.C.

ERCİYES ÜNİVERSİTESİ

BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ

KOORDİNASYON BİRİMİ

SIÇANLARDA SOĞUK STRESİN HİPOKAMPÜS ALAN POTANSİYELLERİ ve MORRİS SU TANKI PERFORMANSI ÜZERİNE ETKİSİ

Proje No: TSY-11-3770

Proje Türü: Yüksek Lisans Tez Projesi

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:

CEM SÜER

TIP FAKÜLTESİ FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

HÜLYA KİRAS

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

Ocak 2014

KAYSERİ

İÇİNDEKİLER

ABSTRACT 6

1. GİRİŞ / AMAÇ VE KAPSAM 7

2. GENEL BİLGİLER 7

3. GEREÇ VE YÖNTEM 10

3.1. Deney hayvanları. 10

3.2. Stresin Uygulanma Süresi ve Yöntemi: 11

3.4. Morris Su Tankı testi (MST) 11

Şekil 1. Morris Su Tankının ilgili yazılım kullanılarak yapılan bir denemesindeki ekran görünümü 13

3.5. Uzun Dönemli Güçlenme 13

Tipik Elektriksel Yanıtın Elde Edilmesi 14

Veri Kazanımı ve Uyarım 15

Girdi-Çıktı Eğrileri "Input – Output (I/O) Curve" 15

Uzun Erimli Güçlenme 16

3.6. Veri Analizi ve İstatistik 16

4. BULGULAR 16

4.1. Soğuk stresin rektal sıcaklığa etkisi: 16

4.3. Soğuk stresin Platforma kaçış süresi üzerine etkisi. 18

4.4. Soğuk stresin Platformu bulmak için yüzülen mesafe üzerine etkisi. 19

4.5. Soğuk stresin Platformu bulma denemelerinde ortalama yüzme hızı değerleri üzerine etkisi. 20

4.6. Soğuk stresin probe denemesinde hedef kadranda geçirilen zamanın yüzdesine etkisi. 21

4.7. Soğuk stresin probe denemesinde platforma olan ortalama uzaklığa etkisi. 22

4.8. Soğuk stresin UDG'de populasyon spile genliğindeki artışa etkisi. 23

4.7. Soğuk stresin UDG'de EPSP eğimindeki artışa etkisi. 24

5. Tartışma 26

6. Kaynaklar 29

ÖZET

Amaç: Davranışsal çalışmalar için, Morris Su Labirent testi, hipokampus bağımlı öğrenmenin değerlendirilmesine spesifik ve yüksek duyarlıklı bir testtir. Ayrıca hipokampal bellek, elektrofizyolojik olarak hipokampal uzun dönemli etkinleşme yanıtlarının incelenmesi ile çalışılabilir. Bu çalışmada soğuk stresin hipokampus bağımlı öğrenme performansına etkisi, davranışsal ve elektrofizyolojik yöntemler kullanılarak belirlenmiştir.

Yöntem: Bu çalışmada 2-3 aylık erkek sıçanlar kullanıldı ve kontrol grubu (n=8), kısa süreli (15 dk) soğuk stres uygulanan grup (n=8), orta süreli (2 saat) soğuk stres grubu (n=8) ve uzun süreli (4 saat) soğuk stres grubu (n=8) oluşturuldu. Hipokampal öğrenme ve hatırlama performansı 5 günlük (4 gün öğrenme denemeleri ve 1 gün hatırlama denemesi) Morris su tankında test edildi. Ayrıca hipokampal öğrenmede önemli rolü bilinen sinaptik havuzlardan biri olan perforan yol – dentat girus sinapslarının etkinliği ekstrasellüler kayıt yöntem ile in vivo olarak çalışıldı. Soğuk stresin etki düzeyi rektal sıcaklığın ölçülmesi ve ekstrasellüler kayıtları alındıktan sonra elde edilen venöz kan örneklerinden serum kortikosteron düzeyi ölçülerek gerçekleştirildi.

Bulgular: Soğuk stres, sıçanların rektal sıcaklıklarında uygulandıkları süreyle orantılı bir hipotermiyle beraber; uzamsal öğrenme performansında 2 ve 4 saat/gün uygulama gruplarında belirgin olmak üzere bir azalmaya ve üç stres grubunda da uzamsal bellek performansında azalmaya neden olmuştur. Performanstaki bu bozulmalar soğuk stres gruplarında YFU'dan sonra 1 saat süreyle ölçülen potansiyalizasyondaki azalma ile birlikte idi.

Sonuç: Çalışmamızda Morris su performans sonuçları ve uzun dönemli etkinleşme yanıtlarında kortkikosteron farklılıklarına bağlı değişmeler gözlendiğinden bu bulgular, hormonal etkilerin öğrenme ve bellek oluşumu üzerindeki etkilerini ve öğrenme ve bellek oluşma süreçlerinde hormonal etkilerin rolü hakkında katkı sağlamaktadır.

Anahtar Kelimeler: Hipokampus; Öğrenme ve Bellek; Dentat Girus; Ekstrasellüler potansiyeller.

ABSTRACT

Purpose: This study examined spatial memory as measured by Morris Water Maze performance and hippocampal long-term potentiation in the dentate gyrus after exposure to cold in a repeated stress condition for 15 min/day, 2 h/day, or 4 h/day for 5 days.

Methods: Three to four month old male Wistar rats were divided into four groups to form a control group and three cold stress groups. The cold stress groups were placed in a cold room for 5 days; 15 min/d, 2h/d or 4 h/day. Rats were subjected to Morris water maze immediately after daily exposure. Latency to locate the hidden platform, distance moved, mean distance to platform, swim speed and time spent in the platform quadrant were compared between genders and treatments. Field potential recordings were made, under urethane anesthesia, from the DG granule-cell layer, with stimulation of the medial perforant pathway 2 hours after the probe trial.

Results: The 2h/d and 4h/d cold-exposed male rats needed more time to find the hidden platform and spent less time in the target quadrant than the control male rats. 15min/d, 2h/day and 4h/d cold exposure decreased population spike potentiation during both induction and maintenance intervals in male rats.

Conclusion: Overall, the results showed that repeated cold exposure could selectively destroy spatial learning and impair retention memory for platform location in male rats. It is possible that impaired LTP underlies some of the impaired retention memory caused by cold exposure in the male rats.

Keywords: Stress; Hippocampus; Long-term potentiation; Morris water maze test.

1. GİRİŞ / AMAÇ VE KAPSAM

Öğrenmeyi etkileyen önemli bir faktör strestir. Hipokampus ise uzamsal öğrenme ve belleğin pekiştirilmesinde önemli rol oynayan sinir sistemi yapısıdır. Araştırma bulguları, stresin uzamsal öğrenme-bellek işlevleri üzerine olan etkisinin oluşmasında hipokampal bileşenin önemli katkısının olabileceğini düşündürmektedir. Hipokampusun uzamsal öğrenmedeki rolü, strese maruz kalma süresinden etkilenebilir. Sunulan projenin amacı, değişik sürelerde soğuk strese maruz bırakılan sıçanlarda uzamsal öğrenme bozukluğunu araştırmaktır.

Bu çalışma, strese maruz kalındığında ortaya çıkan hormonal yanıtların bellek ve öğrenme süreçlerini hangi yönde etkilediğini araştırmayı kapsar ve bu etkilerin mekanizmasını açıklamayı kapsam dışı tutar. Stres, biyolojik canlının değişen çevre koşullarına verdiği içsel ve karmaşık bir tepkidir. Bu fizyolojik tepkinin uzun etki süreli bileşenleri steroid yapıda olan ve hücre içi reseptörleri vasıtasıyla gen ekspresyonunu ve yeni protein sentezini etkileyen böbrek üstü bezi hormonlarıdır. Bu nedenle değişik sürede strese maruz bırakmak, hipokampal nöronal devrelerin değişen konsantrasyon ve sürede kortikosterona maruz kalmasına ve buna bağlı olarak da davranış performansının farklılık göstermesine neden olabilir.

2. GENEL BİLGİLER

Stresin, bilişsel ve nöronal işlevler ve özellikle bellek üzerine olan etkisi uzun zamandır çalışılmaktadır (1, 2) ama farklı sonuçlar bildirilmiştir: Bazı çalışmalar strese bağlı bellek performans artışı bildirirken (3), diğer çalışmalar bellek performansında bozulma bulmuşlardır (4). Bazı araştırmacılar stres, kortikosteron salgılanması ve bellek arasında

karmaşık bir ilişkinin olduğunu ileri sürmektedirler (5). Diğer araştırmacılar ise stresin öğrenme ve bellek üzerinde adaptif bir yanıta neden olduğunu iddia ederler (6). Stres bazı beyin proteinlerinin yapımını kontrol eden genlerin ifadelenmesini etkiler ama nöronal gen ifadelenmesinin öğrenme ve bellek süreçlerinde stresin etkisi ile nasıl bir ilişkisi olduğu açık değildir (7). Son çalışmalar bellek ve stres arasındaki karmaşık ilişkiye yönelik bazı önemli bulgular ortaya koymaktadır.

Çalışmalar bellek oluşumu için önemli bir temporal lob elemanı olan hipokampusun stresten oldukça etkilendiğini göstermiştir. (8). Örneğin stresin daha önceden yeri öğretilmiş yemi bulma performansını (9) veya su tankında gizli bir platformu bulma performansını (10) bozduğu ve bu işin hipokampal bağımlı bellek olduğu bildirilmiştir. Bu bulgular, hipokampus bağımlı öğrenme ve sinaptik plastisitenin, yani uzun dönemli etkinleşme (UDE)'nin stresle veya artmış glukokortikoid düzeyi ile (ratlarda kortikosteron; insanlarda kortizol) bozulduğunu gösteren kemirgen ve insan çalışmaları ile uyumludur (11, 12). Hem kortikosteron düzeyinde stresle oluşturulan artışların hem de kortikosteron düzeyini azaltan manipülasyonların hipokampal fonksiyonu ve bilişsel performansı bozabildiği bildirilmiştir (13). Bunun bir açıklaması kortikosteron ve hem bellek (14) hem de hipokampal plastisite (15, 16) arasında U şeklinde bir ilişkinin varlığı olabilir. Strese karşı oluşan fizyolojik ve davranışsal yanıtlar hipotalamus-hipofiz-adrenal aksın aktivasyonu ile oluşan katekolamin ve glukokortikoid hormonların salgılanması ile başlar (17). Sıçanlarda stres yanıtına aracılık eden hormon olan kortikosteron, beyinde hipokampus, septum ve amigdal gibi korku, endişe ve bellek işlevleri ile ilgili olan yapılarda yerleşmiş hücre içi reseptörlere, minerelokortikoid ve glukokortikoid reseptörlere bağlanırlar (18). Strese veya yüksek stres hormon düzeylerine maruziyetin, duygulanım yanıtlarının yanı sıra öğrenme ve bellek işlevlerini de değiştirdiği bilinmektedir (19). Glukokortikoidlerin düzeylerindeki artışlar beyin ve davranış üzerine hem

kısa hem de uzun dönemli etkiler gösterirler. Adrenal steroidlerin kısa dönemli etkileri deney hayvanları ve insanlarda epizodik ve uzamsal bellek defisitlerini içerir (20). Akut stresin veya akut glukokortikoid uygulanmasının etkileri dakikalar süren dönemlerde belirgindir ve genellikle geri dönüşümlüdür ve stres türü ve uyaranına özgündür (21). Kronik stres veya uzun süreli glukokortikoid yükselmelerinin insanlarda bilişsel işlev bozuklukları ile sonuçlandığı bildirmiştir (22, 23). Örneğin Cushing sendromu yükselmiş glukokortikoid düzeyleri, hipokampal atrofi ve bilişsel bozuklukla birliktedir ve tüm bunlar tedavi ile geri dönüşümlüdür (24).

Dentat girus hipokampusun giriş nukleusudur ve gelen duyusal bilginin kalıp ayırımının yapılmasında ve bellek oluşumunda önemli bir rol oynar. Dentat girus duyusal bilgiyi entorinal korteksten perforan yollar vasıtasıyla alır. Burada işlenen bilgi hipokampusun CA3 alanına ve Yazım alanları gerektiği kadar uzatılabilir daha sonra da çıkıç bölgesi olan CA1 alanına iletilerek entegre edilir. Dentat girus granül nöronları lokal GABAerjik nöronlar tarafından güçlü bir inhibisyon altında tutulurlar ve bu yüzden bu nöronlar sadece perforan yolun uyarımı ile aktivite gösterirler (25). Bu yolun uyarımı ile salgılanan glutamatın reseptörü olan NMDA reseptörlerinin bellek oluşumunun altında yatan hipokampal nöral plastisite süreçleri ile ilgili olduğu gösterilmiştir (26). Hipokampal nöronlarda NMDA reseptörlerine glutamatın bağlanması katyon kanallarını açarak hücre içine Na ve Ca girişine neden olur. Nöron içindeki Ca düzeyinin yükselmesi CaMKII, AC1 ve AC8, PKA ve Ras/Raf/MEK/ERK sinyalleme yollarını aktive eder (27, 28). Bu sinyalleme yollarının aktivasyonu sinaptik yapıda uzun süre devam eden morfolojik ve fonksiyonel güçlenmeye neden olan yeni proteinlerin sentezlenmesini sağlar. Glukokortikoid reseptörler hipokampal nöronların sitoplazmasında yoğun olarak bulunurlar ve nukleus ve plazma membranında daha az seviyede de olsa ifadelenirler (29). Kortikosteronun reseptörüne bağlanmasından sonra

aktive olan hormon-reseptör kompleksi nukleusa geçer ve bir transkripsiyon faktörü gibi etki etmek üzere hedef genlerin promoter bölgesinde bulunan glukokortikoid yanıt elementine bağlanır. Araştırma bulguları, glukokorticoid hormonların da aynı hücre içi sinyalleme mekanizmaları üzerinden bellek oluşumuna etkili olabileceğini düşündürmektedir. (30). Stres ile indüklenen öğrenme ve bellek işlev değişikliklerinin, bu işlevde anahtar rol oynayan hipokampus üzerine odaklanmış olması beklenir (31).

Bu çalışmada değişik sürede stres uygulanmış sıçanlarda, hipokampustaki hedef sinapslar olan perforan yol-granül hücre sinapslarının farklı seviyede kortikosterona maruz kalmalarının davranışsal ve elektrofizyolojik düzeydeki sonuçları incelenecektir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Deney hayvanları.

Bu çalışma için, 48 erkek 2-3 aylık Wistar sıçan kullanıldı. Bütün sıçanlar Erciyes Üniversitesi Hakan Çetinsaya Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezi'nde üretildi. Sıçanların ağırlıkları 130-188 g arasında olup, musluk suyu ve standart sıçan yemi ile kısıtlama yapılmaksızın beslendi. Kontrol ve soğuk stres grupları aşağıdaki şekilde oluşturuldu.

1. Kontrol grubu (n=12)
2. 15 dakika/gün soğuk stres uygulanan grup (n=12)
3. 2 saat dakika/gün soğuk stres uygulanan grup (n=12)
4. 4 saat dakika/gün soğuk stres uygulanan grup (n=12).

Çalışmada gereksiz deney hayvanı kullanmamak ve deney hayvanlarına acı vermemek için özen gösterildi. Bu çalışma, Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu'ndan 14/09/2011 tarih ve 11/117 sayılı onay alındıktan sonra gerçekleştirildi. Proje önerisinde istenen 48 sıçanın tümü çalışmalarda kullanılmış ve ilgili veriler aşağıda sunulmuştur.

3.2. Stresin Uygulanma Süresi ve Yöntemi:

Soğuk stres sıçanların +4°C'de ortamda, 5 gün süreyle ve her gün 15 dakika, 2 saat veya 4 saat olmak üzere tutulması ile gerçekleştirildi. Stres grubu sıçanlar soğuk ortama her gün saat 10-12 arasında konuldu; bu saatlerin dışında standart ortamlarında bulunduruldu. Soğuk uygulamadan hemen sonra bir probe kullanılarak rektal sıcaklıklar ölçüldü ve yarım saat sonrasında su tankı denemeleri aşağıda anlatıldığı gibi yapıldı.

3.3. ACTH Ölçümü: Sıçanlardan elde edilen kan örnekleri, hizmet alımı şeklinde çalışılmış ve ACTH hormon düzeyleri ölçülmüştür.

3.4. Morris Su Tankı testi (MST)

MST hipkampüs bağımlı öğrenme ve bellek performansını ölçmekte sıklıkla kullanılan ve bu amaca yönelik özgüllüğü kabul edilmiş bir testir. Protokol, tekrarlayan denemelerle, tanka yerleştirilmiş bir platformun yerinin öğrenilmesi ve daha sonra öğrenilen yerin hatırlanması esasına dayanır.

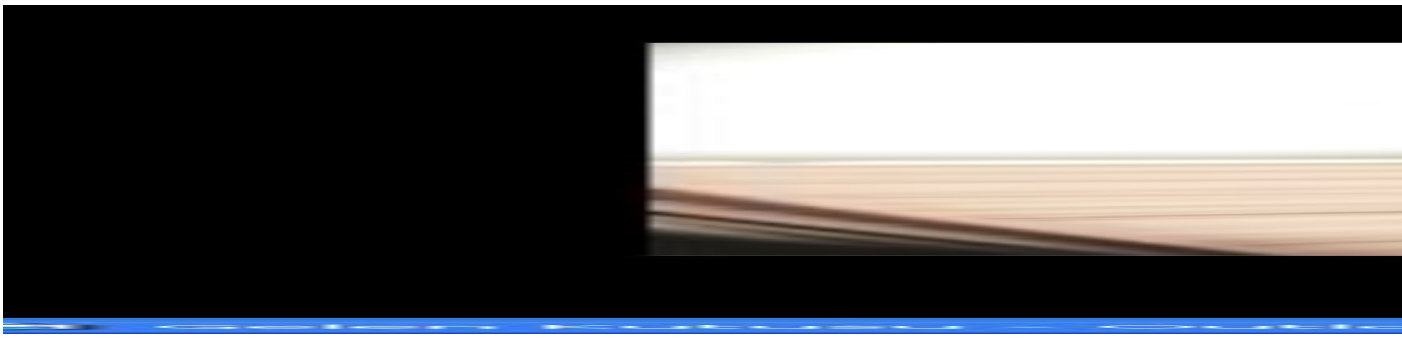
MST testi çapı 180 cm, derinliği 60 cm olan, mavi mürekkep ile boyanmış (hayvana zarar vermeyen bir boya seçildi) su ile dolu bir havuzda yapıldı. Suyun sıcaklığı 22±2 °C olacak şekilde ayarlandı ve kirli olmamasına özen gösterildi. Havuz hayali iki dik kesiçen çap ile 4 eşit kadrana ayrıldı ve kadranlardan birine, yüksekliği suyun 1-2 cm kadar altında olacak

şekilde 10 cm çapında ağır bir kaçma platformu yerleştirildi. Bu platformun havuz içinde bütün denemelerde bütün sıçanlar için aynı yerde olmasına dikkat edildi. Platform lifli yapıda bir kumaş ile kaplanarak sıçanın bu bölgede düşme tehlikesi yaşamadan, kendini güvende hissetmesi sağlandı. Sıçanın platformun yerini bulmayı öğrenmesine yardımcı olmak üzere havuzun çevresinde görsel ipuçları bırakıldı.

Her sıçan, 10 dakika ara ile günde 4 kez ve 4 ardıl gün öğrenme denemelerine tabii tutuldu; 5. gün ise probe denemesi gerçekleştirildi. Öğrenme denemelerinde, hayvanlar her gün farklı bir kutuptan bırakıldı ve platformu bulması için 1 dakika beklendi. Bu süre içinde platformu bulamaması durumunda hayvan platforma yönlendirilerek, zarar vermeden platform üzerine alındı ve 15 sn süresince beklemesi sağlandı. Daha sonra platform üzerinden alınıp kurulandı ve kafeslerine yerleştirildi.

Probe denemesinde ise platform kaldırıldı ve sıçanın 2 dakika süresince serbestçe yüzmesine izin verildi. Bu denemede sıçanın eskiden platformun bulunduğu kadranda diğer kadranlara göre daha fazla süre bulunması beklenir. Probe denemesi son öğrenme denemesinden 24 saat sonra yapıldı.

Tüm denemelerde tankın tamamını görecek şekilde, bir kamera tavana monte edildi ve görüntü NOLDUS izleme ve kayıt sistemine aktarıldı. Bu sistem ve uygun yazılımı kullanılarak sıçanın platforma kaçış süreleri, yüzme mesafesi, yüzme hızı ve her kadranda bulundukları süre kayıt altına alındı. Bir örnek deneme için kullanılan programın görüntüsü aşağıdaki resimde verildi

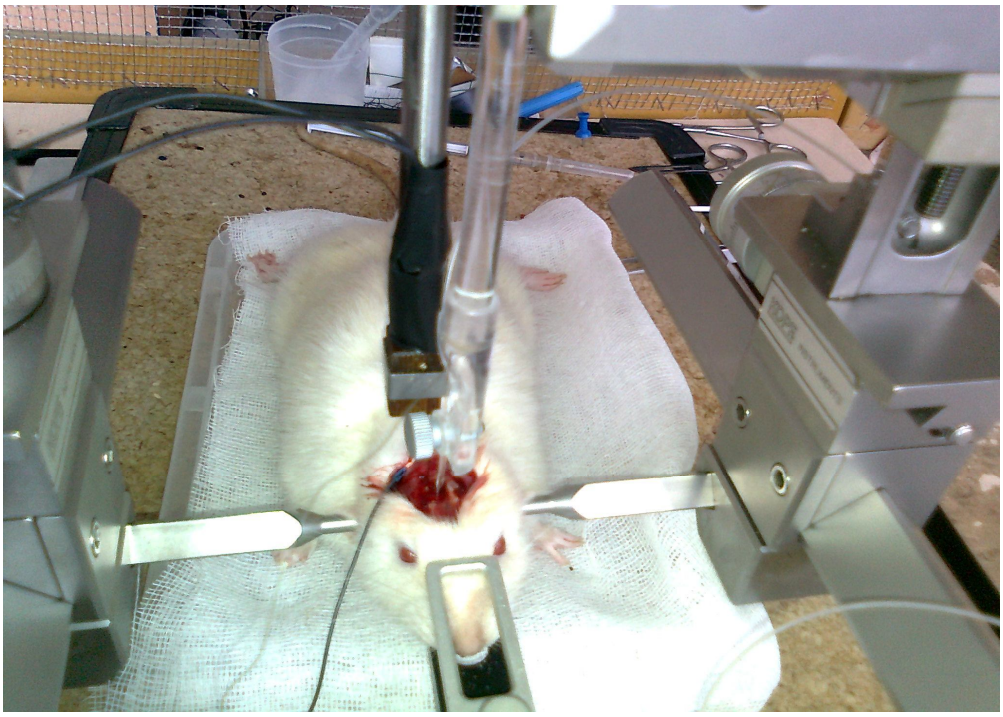


Şekil 1. Morris Su Tankının ilgili yazılım kullanılarak yapılan bir denemesindeki ekran görünümü

3.5. Uzun Dönemli Güçlenme

Probe denemesinden 1 saat sonra, sıçanlar üretan (1,2 g/kg, ip) ile anestezi edildi ve sonra stereotaksik çatıya (Kopf Instruments, Tujunga, CA, USA) yerleştirildi. Cerrahi prensiplere uygun olarak yapılan sağ kranyotomiden sonra bir bipolar elektrot (Teflon kaplı, paslanmaz çelik, 127 µm çaplı, ucu dışında izole edilmiş) vasıtasıyla medyal perforan yol (bregmaya göre mm; AP: -8.0, ML: 4.2) uyarıldı. Uyarıcı elektrotun iki kutbu düşük dirençli kablolar ile bir uyarım izolatörüne (A385, World Precision Instruments, USA,) bağlandı.

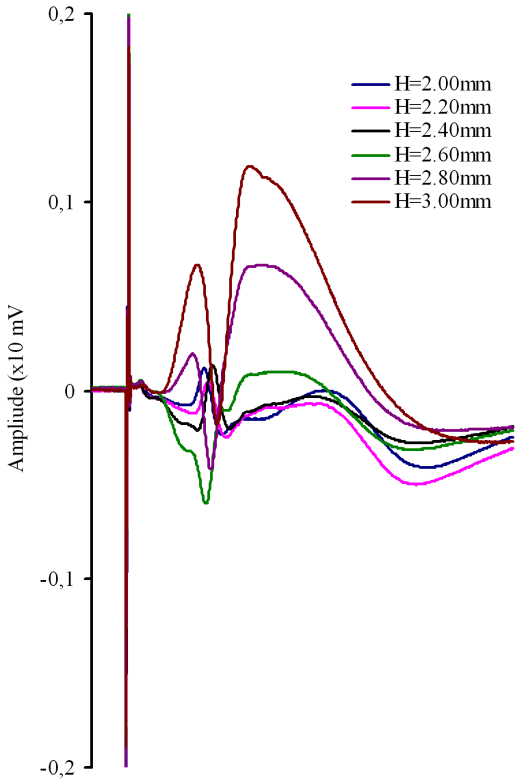
Dış çapı 1,5 mm ve uzunluğu 10 mm olan Borosilikate kapiller tüplerden (World Precision Instruments) dikey bir mikropipet çekici (P30, Sutter Instrument Co, USA) ile hazırlanan ve içi 3M NaCl ile doldurulan cam mikropipet (uç dürenci 2–10 MΩ) dentat girusun hilusuna (bregmaya göre mm: AP: -3.5, ML: 2.15) yerleştirildi. Bir Ag-AgCl disk elektrot boyun derisi altına kondu ve referans elektrot olarak kullanıldı. Kayıt elektrodunun içine yerleştirilern klorlanmış bir gümüş tel ve referans elektrodu bir head-stage kullanılarak tek kanal epitelyal voltaj/akım kıskaç yükseltecine (VCC600, Physiological Instruments) bağlandı. Bütün sistem bir Faraday kafesi kullanılarak topraklandı. Stereotaksik girişim ve sonrasında elektrotların yerleştirilmesi sırasında bir örnek görüntü aşağıda verilmiştir.



Şekil 2. Stereotaksik girişim ve sonrasında elektrotların yerleştirilmesi sırasında bir örnek görüntü.

Tipik Elektriksel Yanıtın Elde Edilmesi

Hem uyarıcı hem de kayıt elektrodu, pozitif yönlü bir sapmayı (EPSP) takip eden negatif yönlü bir sapma (PS) elde edilene kadar derin yapılara indirildi. Granül hücre tabakasının tipik yanıtı elde edilmeye başlandığında elektrotların derinlikleri 0,1 mm artırarak en büyük cevabın eldesi sağlandı. Bütün deneyler sonucu ortalama elektrot derinlikleri uyarıcı elektrot için 2,66 mm kayıt elektodu için 2,55 mm idi. Tipik kaydın eldesi sırasında örnek bir deneyde kaydedilen elektrik aktivite, aşağıdaki şekilde görülmektedir.



Şekil 3. Tipik kaydın eldesi sırasında örnek bir deneyde kaydedilen elektrik aktivite

Veri Kazanımı ve Uyarım

Veri kazanımı ve uyarım işleminin kontrolü "Scope" yazılımı (ADInstruments, Colorado Springs, CO, USA) ile yapıldı. Tek fazlı 10 V 0,175-ms süreli palslar A/D çevirici (Powerlab/8SP, ADInstruments, Colorado Springs, CO, USA) vasıtasıyla oluşturuldu ve uyarı izolatörünün tetiklenmesinde kullanıldı. Kaydedilen biyolojik sinyaller 0.1-10 kHz band-genişliğinde bir yükselticide 1000x kez yükseltildi. Aktivite 20 ms için 40 kHz hızında çevirim-içi olarak rakamsallaştırıldı.

Girdi-Çıktı Eğrileri "Input – Output (I/O) Curve"

Elektrotların yerleştirilmesinden 15 dakika sonra 175 µs süreli tek-fazlı sabit akım palsları her 20 sanoyede bir verilerek I/O eğrileri elde edildi. Bu sırada akım şiddeti 0,1 mA'den 1,5 mA'e kadar 0,2 mA adımlarla artırıldı. Her akım şiddeti için kaydedilen 3 ardıl

yanıtın ortalaması akım şiddetine karşı grafiklendi. En yüksek PS genliğinin yarısını oluşturan akım şiddeti test uyaran şiddeti olarak beirlendi ve deneyin sonrai aşamalarında bu akım şiddeti kullanıldı.

Uzun Erimli Güçlenme

Test uyaranı ile 30 sn'de bir uyarı verilerek 15 dakika süren bazal kayıt alındı. Bazal kaydın ardından 5'er dakika ara 100 Hz frekansında 1 sn süren yüksek frekanslı uyarım (HFS) ile UEG indüklendi. Son HFS uyarımını takiben toplam 90 dakika olacak şekilde 30 sn'de br test uyaranı ile uyarıma devam edildi.

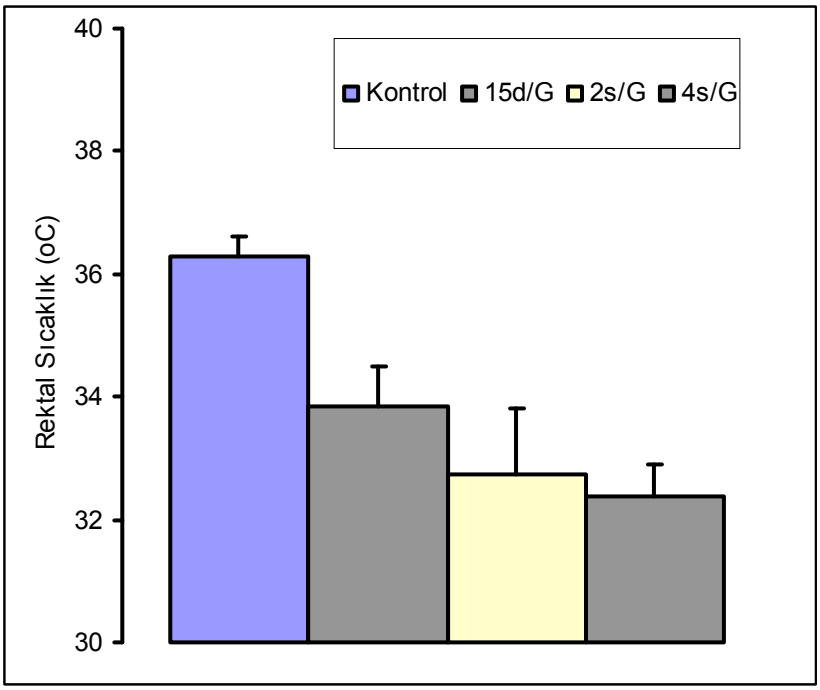
3.6. Veri Analizi ve İstatistik

EPSP dalgsının eğimi, dalganın başlangıcı ve PS dalgasının başlangıcı arasındaki voltaj farkının %20–80 arasında hesaplandı. PS genliği ilk pozitif yükseltiden sonraki negatif yükselti arasındaki farktan hesaplandı. Başlangıçtaki 15 dakikalık sürede tetiklenen 30 alan potansiyelinin EPSP ve PS'larından oluşan ortalama eğim ve genlik değerleri 100 kabül edildi; YFU sonrasındaki her EPSP ve PS bunun yüzdesi cinsinden hesaplandı. UEG'nin indüksiyonu için YFU sırasında oluşan eğim ve genliklerin; idame dönemi için ise son YFU'dan deney sonuna kadarlık bölümde oluşan eğim ve genlik değerlerinin ortalamaları alındı. İstatistik karşılaştırmalar için, uygun olduklarında Mann-Whitney U testi, unpaired Student *t*-testi ve Tek Yollu ANOVA testi kullanıldı. Anlamlılık düzeyi $p<0,05$ olarak seçildi.

4. BULGULAR

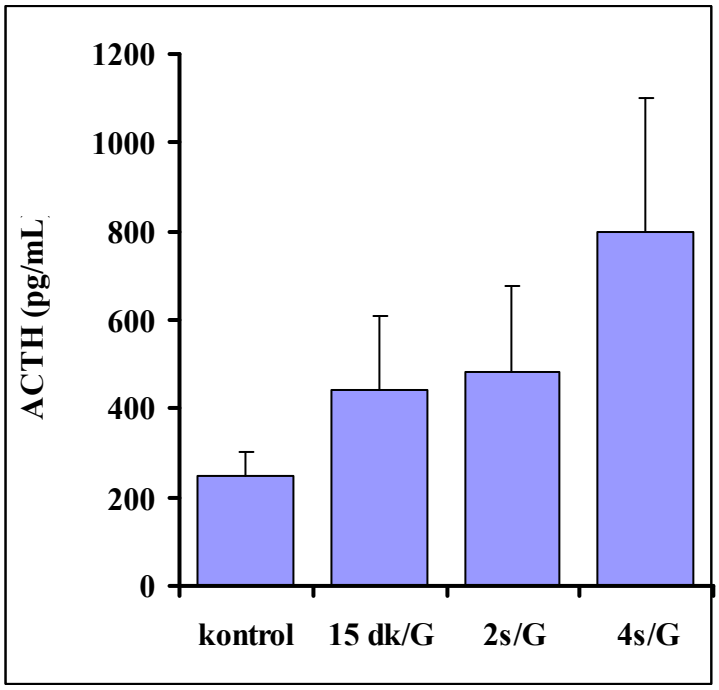
4.1. Soğuk stresin rektal sıcaklığa etkisi:

Şekil 4'den de görülebileceği gibi soğuk stres, sıçanların rektal sıcaklıklarında uygulandıkları süreyle orantılı bir hipotermiye neden olmuştur. Bütün grupların kontrol grubuna göre gösterdikleri azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$).



Şekil 4. Soğuk stres ugulamasının rektal sıcaklık değerlerine etkisi.

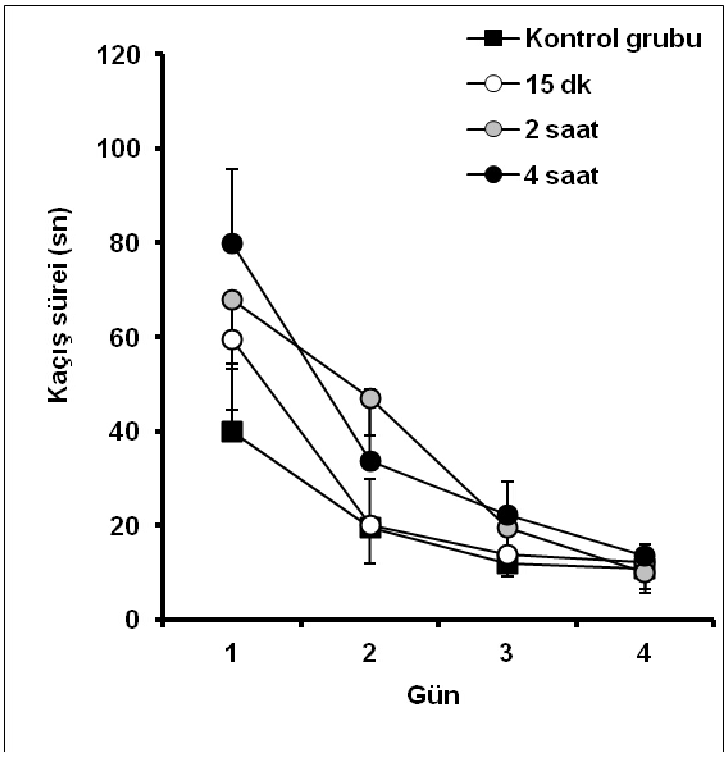
4.2. Soğuk stresin ACTH düzeyleri üzerine etkisi.



Şekil 5. Kontrol grubu ve soğuk stres uygulanan gruplarda ACTH düzeyleri. Soğuk stres, ACTH düzeyini kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yükseltirken, bu yükselme en fazla 4 saat stres uygulanan grupta görülmüştür.

4.3. Soğuk stresin Platforma kaçış süresi üzerine etkisi.

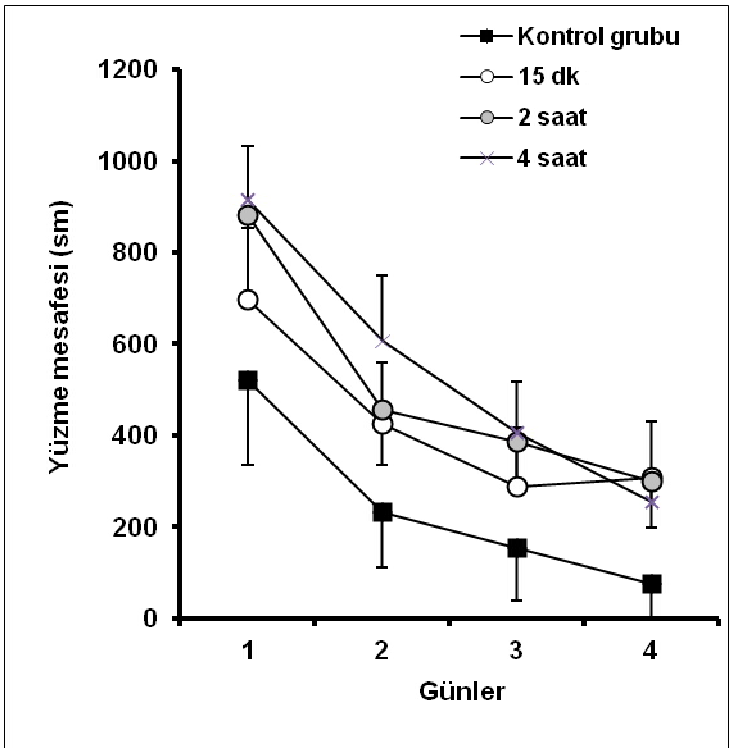
Her gün 30'ar dakika aralar ile yapılan dört denemeden elde edilen kaçış süresi değerlerinin ortalaması o günün kaçış süresi değeri olarak alınmış ve bu değerler Gün, grup içi faktör olmak üzere tekrarlayan ölçümler ile ANOVA testine tabii tutulmuştur. İstatistik test sonuçlarına göre 4 saat/gün ve 2 saat/gün soğuk stres uygulanan gruplar, kontrol grubuna göre anlamlı derecede daha uzun sürede kaçış platformunun yerini bulmuşlardır ($p<0,05$). Diğer günlerde gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p>0,05$). Grupların deneme günlerindeki ortalama kaçış süreleri Şekil 5'de görülmektedir.



Şekil 6. Kontrol grubunda ve 15 dk/gün, 2 saat/gün ve 4 saat/gün soğuk stres uygulamasından hemen sonra deney gruplarında, Morris Su Tankında kaçış platformunu bulma sürelerinin deneme günlerine göre değişimi.

4.4. Soğuk stresin Platformu bulmak için yüzülen mesafe üzerine etkisi.

Her gün 30'ar dakika aralar ile yapılan dört denemeden elde edilen yüzme mesafesi değerlerinin ortalaması o günün yüzme mesafe değeri olarak alınmış ve bu değerler Gün, grup içi faktör olmak üzere tekrarlayan ölçümler ile ANOVA testine tabii tutulmuştur. İstatistik test sonuçlarına göre 4 saat/gün ve 2 saat/gün soğuk stres uygulanan gruplar, kontrol grubuna göre anlamlı derecede daha uzun sürede kaçış platformunun yerini bulmuşlardır ($p<0,05$). Diğer günlerde gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p>0,05$). Grupların deneme günlerindeki ortalama kaçış süreleri Şekil 6'da görülmektedir.

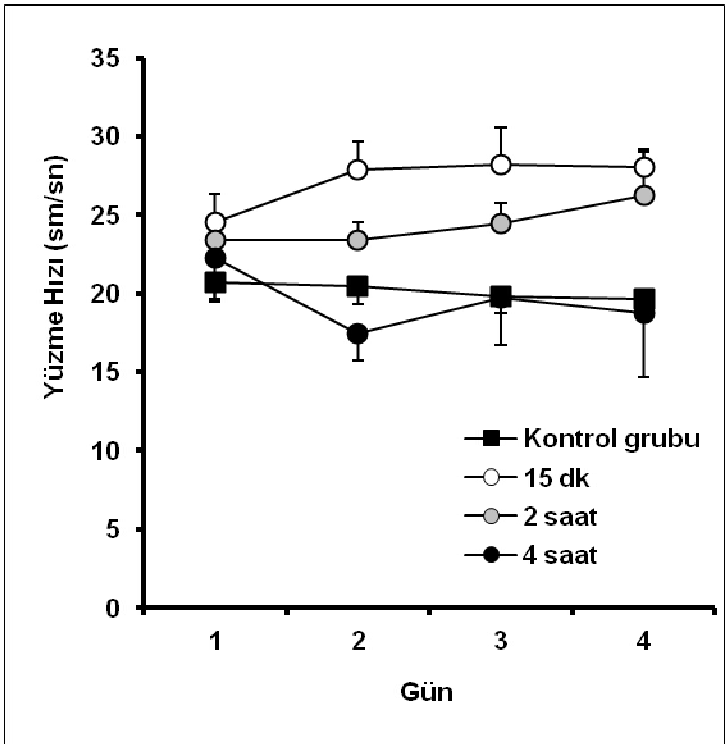


Şekil 7. Kontrol grubunda ve 15 dk/gün, 2 saat/gün ve 4 saat/gün soğuk stres uygulamasından hemen sonra deney gruplarında, Morris Su Tankında kaçış platformuna ulaşmak için yüzülen mesafe değerlerinin deneme günlerine göre değişimi.

4.5. Soğuk stresin Platformu bulma denemelerinde ortalama yüzme hızı değerleri üzerine etkisi.

Her gün 30'ar dakika aralar ile yapılan dört denemeden elde edilen ortalama yüzme hızı değerlerinin ortalaması o günün yüzme hızı değeri olarak alınmış ve bu değerler Gün, grup içi faktör olmak üzere tekrarlayan ölçümler ile ANOVA testine tabii tutulmuştur. İstatistik test sonuçlarına göre 4ncü günde 15 dk/gün ve 2 saat/gün soğuk stres uygulanan gruplar, kontrol ve 4 saat/gün stres uygulanan gruplardan göre anlamlı derecede daha hızlı yüzerek kaçış platformunun yerini bulmuşlardır ($p<0,05$). Diğer günlerde gruplar arasında anlamlı bir

farklılık bulunmamıştır (p>0,05). Grupların deneme günlerindeki ortalama yüzme hızları Şekil 7'de görülmektedir.

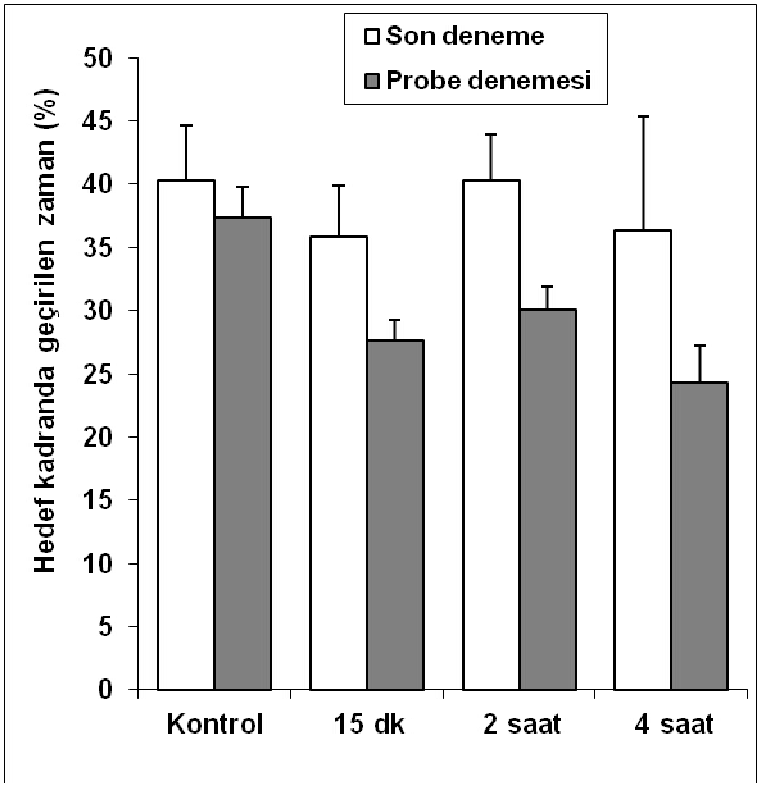


Şekil 8. Kontrol grubunda ve 15 dk/gün, 2 saat/gün ve 4 saat/gün soğuk stres uygulamasından hemen sonra deney gruplarında, Morris Su Tankında ortalama yüzme hızı değerlerinin deneme günlerine göre değişimi.

4.6. Soğuk stresin probe denemesinde hedef kadranda geçirilen zamanın yüzdesine etkisi.

İki dakika süren Probe denemesinde, hayali dört kadranın her birinde gecirilen sürelerin toplam süreye oranı hesaplandı. Hedef kadranda geçirilen sürenin %25'den çok olması, sıçanın platformun bulunduğu yeri hatırlamasının bir ölçüsü olarak ele alındı. Probe denemesinde her üç stres grubunda hedef kadranda geçirilen süre kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük bulunda (p<0,05). Stres grupları arasındaki farklılık istatistiksel

olarak anlamlı değildir (p> 0,05). Grupların probe denemesinde hedef kadranda geçirdikleri zamanın yüzde değerleri Şekil 8'de görülmektedir.

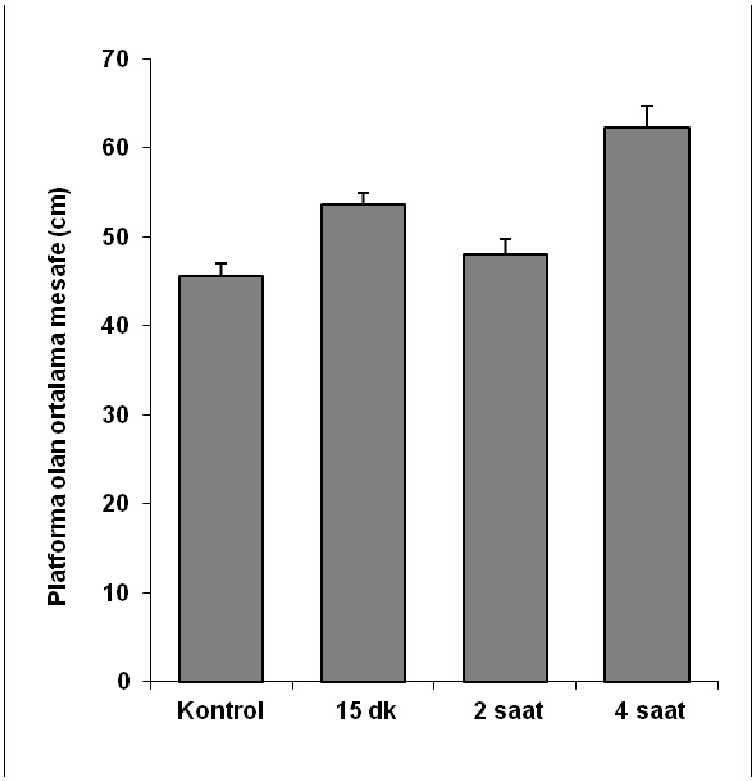


Şekil 9. Grupların probe denemesinde hedef kadranda geçirdikleri zamanın yüzde değerleri

4.7. Soğuk stresin probe denemesinde platforma olan ortalama uzaklığa etkisi.

İki dakika süren Probe denemesinde, sıçanların platformun yerini hatırlama güçlerinin bir ölçüsü olarak, platformun olduğu yere ne kadar yakın yüzdükleri de dikkate alındı. Probe denemesi bounca sıçanın platformun olduğu yere yakın yüzmesi hatırladığının göstergesi olarak değerlendirildi. Probe denemesinde 15 dk/gün ve 4 saat/gün soğuk strese maruz bıraklan grupların kontrol grubuna göre anlamlı derecede platforma yakın olarak yüzdükleri

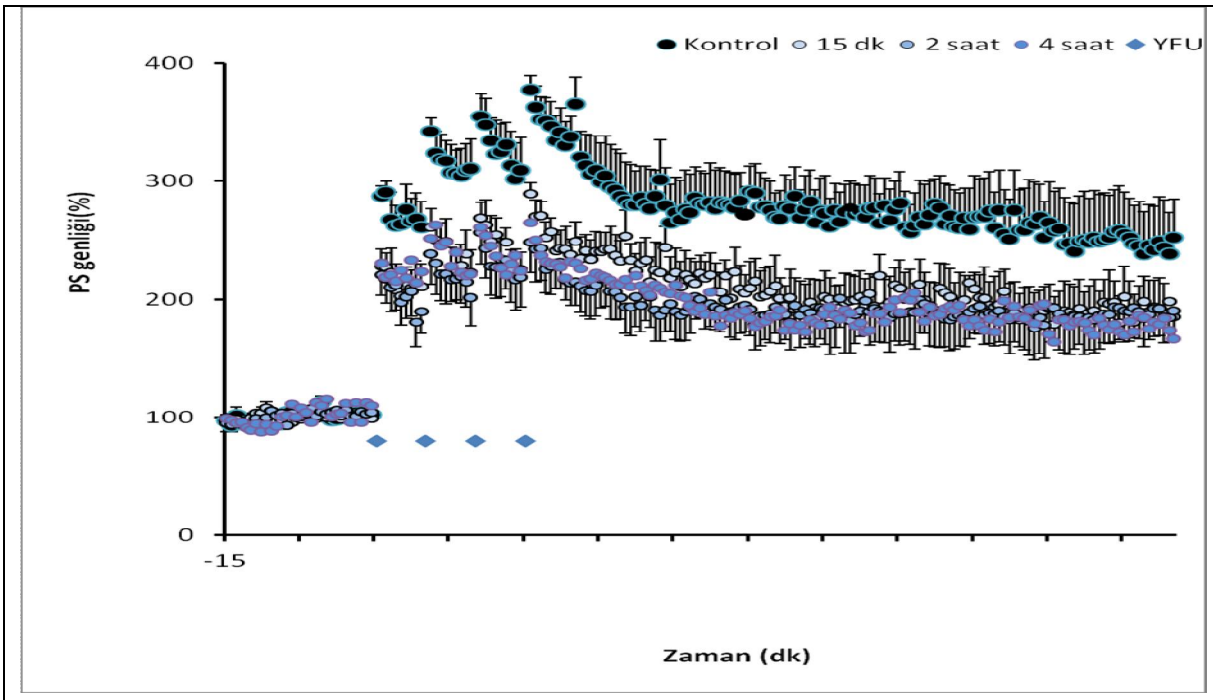
izlendi ($p<0,05$). Grupların probe denemesinde platformun olduğu yere olan ortalama değerleri Şekil 9'de görülmektedir.



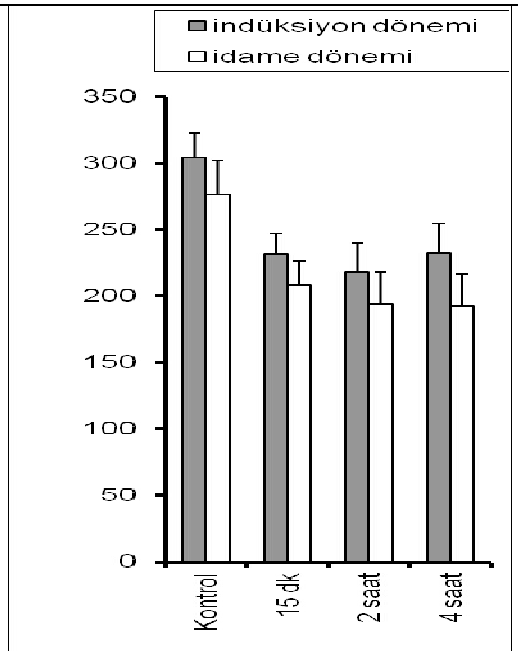
Şekil 10. Grupların probe denemesinde platformun olduğu yere olan ortalama değerleri

4.8. Soğuk stresin UDG'de populasyon spile genliğindeki artışa etkisi.

Hipokampusun dentat girusundan kayıt edilen alan potansiyellerinin populasyon spike bileşeninin genliği, YFU'dan sonra 1 saat süreyle gösterdiği ortalama artış oranı, kontrol grubunda bütün stres gruplarından anlamlı derecede yüksek bulunmuştur.

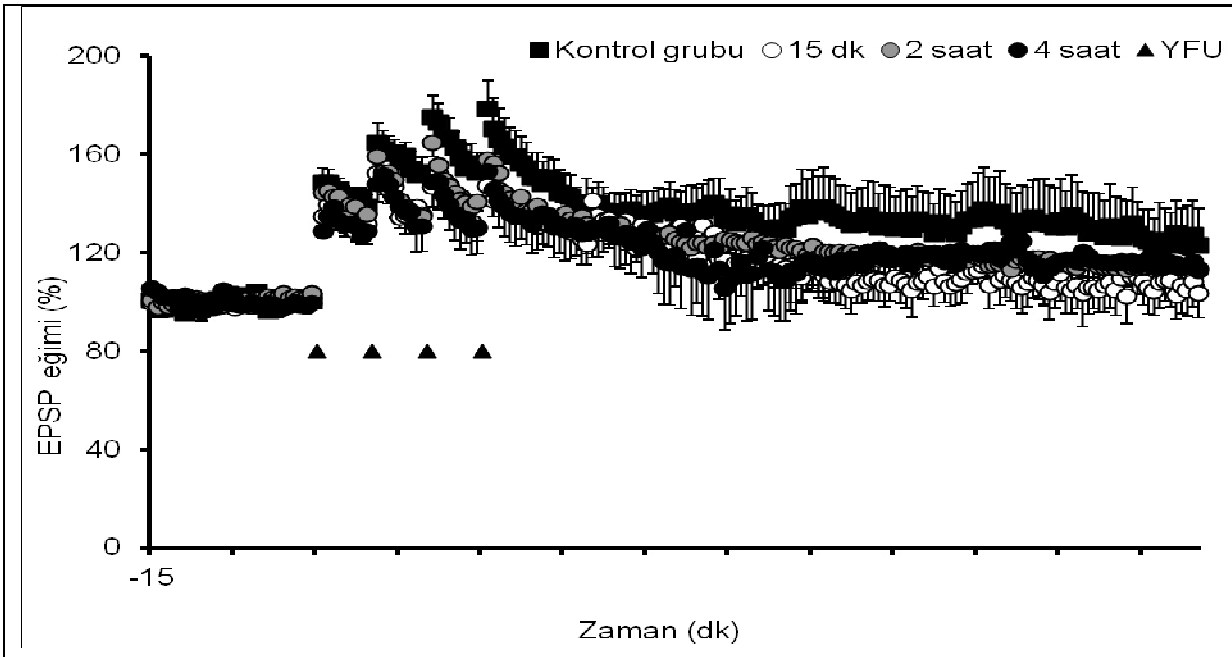


Şekil 11. Populasyon spike genliklerinde yüksek frekanslı uyarımla tetiklenen uzun dönemli güçlenme.

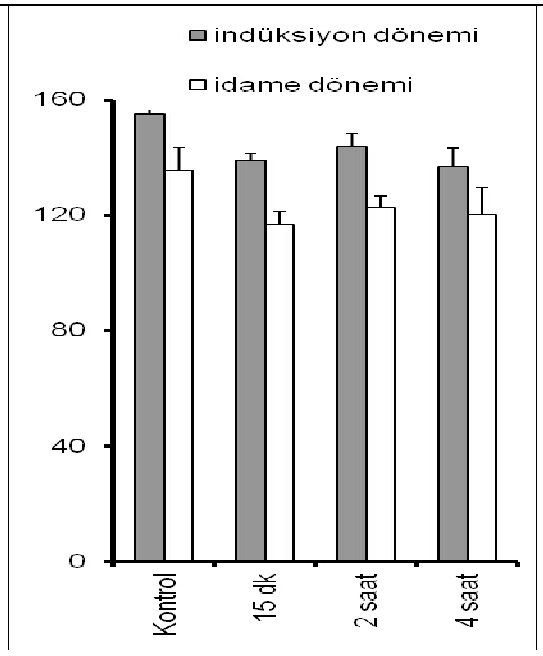


4.7. Soğuk stresin UDG'de EPSP eğimindeki artışa etkisi.

Hipokampusun dentat girusundan kayıt edilen alan potansiyellerinin EPSP bileşeninin eğimi, YFU'dan sonra 1 saat süreyle gösterdiği ortalama artış oranı, kontrol grubunda bütün stres gruplarından anlamlı derecede farklı bulunmamıştır.



Şekil 12. Eksitatör postsinaptik potansiyel eğiminde yüksek frekanslı uyarımla tetiklenen uzun dönemli güçlenme.



5. Tartışma

Çalışmamızın sonuçları, aralıklarla uygulanan soğuk stresin erkek sıçanlarda uzamsal öğrenme ve bellek süreçlerini olumsuz etkilediğini göstermektedir. Bu bulgu daha önceden hareketsizlik stresi uygulanmış sıçanlarda bildirilenlere benzerdir (Conrad *et al.*, 2004).

Uzamsal işteki performans uygulanan soğuk stresin ağırlığıyla paralel olan hipotermi ile de ilşkilidir. Uzamsal belleğin geri çağrılması performansının orta şiddetteki hipotermide (30oC) bozulmadığı ama 25 oC'ın altında şiddetli bir bozulma gösterdiği bildirilmiştir (Panakhova *et al.*, 1984). Biz de çalışmamızda soğuk stres uygulaması ile benzer şiddette hipotermi oluşturduğumuzdan hedef kadranda geçirilen zaman yüzde değerinde bulunan azalmalar hipotermiye direnci destekler niteliktedir.

Yüzme hızındaki farklılıklar uzamsal öğrenmenin bir ölçüsü olarak kaçış süresi parametrelerinin kullanılmasını sınırlar, bu durumda platforma ulaşmak için katedilen mesafe daha doğru bir değerlendirme ölçütü olur (Lindner, 1997). Bu nedenle artış yüzme hızlarının gözlendği günlerde kaçış süresi yerine yüzme mesafesi değerlerinin dikkate alınması önerilebilir.

Suyun sıcaklığı Morris Su Tankı testinde performansı etkileyen bir değişken olarak her zaman akılda tutulmalıdır (Morris, 1984). Bu nedenle soğuk stres uygulamasının suyun sıcaklığını değiştirmek yerine öncesinde kapalı bir ortamda soğuk ortama maruz bırakarak yapılmasını tercih ettik. Su sıcaklığının 19oC olduğu ortamda uzamsal öğrenme performansı ölçülen

sıçanlar 35 oCde denenelere göre daha hızlı bir performans göstermişlerdir (Sandi *et al.*, 1997).

Bazı çalışmalarda 2°Clik ortama maruz bırakmanın rektal sıcaklığı azaltmadığı bildirilmiştir (Ahlers et al., 1991; Thomas et al., 1989; Thomas et al., 1991). Bununla beraber bizim çalışma bulgularımız daha uzun süreli 4°C'lık bir ortama maruziyetinefektif bir hipotermi oluşturabileceğini göstermektedir. Her ne kadar direk olarak ölçülmese de çalışmamızda oluşan hipoterminin hipokampal bellek performansını azaltmasında hipokampal sıcaklıkdaki düşmenin de etkil olabileceği düşünülebilir çünkü merkezi sinir sisteminin soğutulmasının performans azalmasından sorumlu olabileceğine dair bulgular vardır (Ahlers *et al.*, 1991). Beyin sıcaklığındaki bir azalmanın hipokampal sinaptik plastisiteyi etkileyerek uzamsal belleği bozabileceği ileri sürülmüştür (Moser and Andersen, 1994). Bu nedenle soğuk strese bağlı oluşan performans azalması hipoterminin de bir sonucu olablir. Bununla beraber, bazı durumlarda, strese nörohumoral sistemin verdiği yanıt hipokampüste hipoterminin depresif etkisini yenebilir ve performastaki bozulmaı maskeleyebilir.

Bu çalışmada yapılan input-output deneyleri ile perforan yol- dentta girus sinapslarının elektrofizyolojik özellikleri de çalışılmıştır. Bunun için perforan yol 0,1 mA'den başlayarak 1,5 mA'e kadar 0,2 mA adınlarla artan tarzda uyarılmış ve EPSP eğimi ve PS genliğine karşı grafiklenmiştir. Her ne kadar akut kısa stres uygulamalarının bile denta girusta yeni oluşan nöron popülasyonunu azalttığı bildirilmiş ise de (Wolf, 2003) 4 saat süreyle 4°C derecede uygulanan soğuk stresin serbest gareketli sıçanlarda dentat girusta sinaptik etkinliği değiştirmedi de bildirilmiştir (Bramham *et al.*, 1998). Bizim çalışmamızda da EPSP eğim ilişkisi kontrol ve soğuk uygulanan gruplar arasında farklı bulunmamıştır. Bu nedenle soğuk

stresin perforant yol dentat girus sinapslarında sinaptik etkinliği değiştirmediği sonucuna ulaşılmıştır.

Çalışmamızda soğuğa maruz bırakılan bütün gruplarda, benzer input-output ilişkisine rağmen populasyon spike -UDG'sinde belirgin bir bozulma izlendi. Davranış verileri ile bielikte ele alındığında soğuk stresle oluşturulan bellek ğerformansındaki bozulmanın temelinde UDG'de gözlenen bu baskılanmanın yattığı söylenebilir. Ancak bozulmanın şiddetiuygulanan stresin şiddeti ile doğrusal ilişkili olmaktan çok ”U” şeklinde bir ilişkiyi götermektedir. Bununla birlikte UDG ile Morris su tankı performansını ilişkilendirmek zor olabilir çünkü çalışmanın elektrofizyolojik kısmı anestezi altında yapılmıştır. Bir kez saat 4C ve 90 dakika soğuk strese maruziyet kortikosteron seviyesini anlamlı bir şekilde yükseltmiş ama serbest dolaşan sıçanlarda dentta girus UDG yanıtlarını bozmamıştır (Bramham *et al.*, 1998). Bu çalışma ve bizim çalışmamız arasında soğuğa maruz bırakma süreleri arasındaki farklılık bulgular arasındaki uyumsuzluğu açıklar düşüncesindeyiz. Her ne kadar çalışmamızda ölçülmemiş olsa da daha uzun süre soğuğa maruz bırakmanın kortikosteron seviyesini daha fazla yükseltmesi beklenir. Yeterli kortikosteronn seviyesinin tip II glukokortikoid reseptörlere bağlanarak UDG'de azalma meydana getirdiği bilinmektedir. BU azalma DHEA uygulaması ile önlenmektedir (Kaminska *et al.*, 2000). Her ne kadar soğuğa maruziyetin Dentat Girus histolojisi zerine olan etkisi bu çalışmada araştırılmadıysa da kronik olarak yükselmiş kortikosteroid seviyelerinin hipokampal formasyonun dentat girusunda nörogenezi azalttığı gösterilmiştir (Karishma and Herbert, 2002; Wong and Herbert, 2006).

Sonuç olarak sunulan çalışmanın bulguları, soğuk strese maruz bırakılan sıçanlarda uzamsal öğrenme performansının bozulduğu, sinaptik plastisitenin bir göstergesi olan alan potansiyellerinin populasyon spike bileşeninin, yüksek frekansla uyarılan güçlenmesinin

azaldığını göstermektedir. Bozulmanın şiddeti, stres hormonlarının uzamsal bellek performansı üzerine olan ters “U” şeklindeki etkisini desteklemektedir. Etki mekanizmasının ortaya konabilmesi açısından detaylı moleküler çalışmalara ihtiyaç vardır.

6. Kaynaklar

1.Conrad CD. A critical review of chronic stress effects on spatial learning and memory. Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry, 2010; 34: 742–755.

2.Shors TJ. Learning during stressful times, . Learn. Mem., 2004; 11:137–144.

3.Bowman RE, Beck KD, Luine VN. Chronic stress effects on memory: Sex difference in performance and monoaminergic activity. Horm. Behav. 2003; 43: 48–59

4.Zhang YM, Yang Q, Xu CT, Li KS, Li WQ. Effects of phenytoin on morphology and structure of hippocampal CA3 pyramidal neurons of rats in chronic stress. Acta Pharmacol. Sin. 2003; 24: 403–407.

5. Park CR, Campbell AM, Woodson JC, Smith TP, Fleshner M, Diamond DM. Permissive influence of stress in the expression of a U-shaped relationship between serum corticosterone levels and spatial memory errors in rats. Dose Response, 2006; 4: 55–74

6. Shors TJ. Learning during stressful times, . Learn. Mem. 2004; 11: 137–144.

7.Lashgari R, Motamedi F, Zahedi S, Shahidi-Asl S, Komaki A. Behavioral and electrophysiological studies of chronic oral administration of L-type calcium channel blocker verapamil on learning and memory in rats. Behav. Brain Res. 2006; 171: 314–328.

8. Kim JJ, Diamond DM. The stressed hippocampus, synaptic plasticity and lost memories. Behav Neurosci. 1996;110(4):661-72. Nat Rev Neurosci. 2002;3(6):453–62.

9.Diamond DM, Fleshner M, Ingersoll N, Rose GM. Psychological stress impairs spatial working memory: relevance to electrophysiological studies of hippocampal function. Hippocampus. 1999;9(5):542-52.

10.Diamond DM, Park CR, Heman KL, Rose GM. Exposing rats to a predator impairs spatial working memory in the radial arm water maze. Learn Mem. 2003 Sep-Oct;10(5):326-36.

11.Kim JJ, Diamond DM.The stressed hippocampus, synaptic plasticity and lost memories. Eur Neuropsychopharmacol. 2004 Dec;14 Suppl 5:S491-5.

12.Diamond DM, Campbell A, Park CR, Vouimba RM.Preclinical research on stress, memory, and the brain in the development of pharmacotherapy for depression.

13.Loscertales M, Rose SP, Sandi C. The corticosteroid synthesis inhibitors metyrapone and aminoglutethimide impair long-term memory for a passive avoidance task in day-old chicks. Brain Res. 1997;769:357–361.

14.Lupien SJ, McEwen BS. The acute effects of corticosteroids on cognition: integration of animal and human model studies. Brain Research - Brain Research Reviews. 1997;24:127.

15.Diamond DM, Bennett MC, Fleshner M, Rose GM. Inverted-U relationship between the level of peripheral corticosterone and the magnitude of hippocampal primed burst potentiation. Hippocampus. 1992; 2(4):421-30.

16.Kerr DS, Huggett AM, Abraham WC. Modulation of hippocampal long-term potentiation and long-term depression by corticosteroid receptor activation. Psychobiol. 1994;22:123–133.

17.McEwen BS. The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. Brain Res. 2000; 886(1-2): 172-189.

18.Korte SM. Corticosteroids in relation to fear, anxiety and psychopathology. Neurosci. Biobehav. Rev. 2001; 25: 117–142.

19.McEwen BS. Stress and hippocampal plasticity. Annu. Rev. Neurosci. 1999; 22: 105–122.

20.Kirschbaum C, Wolf OT, May M, Wippich W, Hellhammer DH. Stress- and treatment induced elevations of cortisol levels associated with impaired verbal and spatial declarative memory in healthy adults. Life Sci. 1996; 58: 1475–1483.

21.McEwen BS and Sapolsky RM, Stress and cognitive function. Curr. Opin. Neurobiol. 1995; 5: 205–216.

22.Reagan LP and McEwen BS. Controversies surrounding glucocorticoid-mediated cell death in the hippocampus. J. Chem. Neuroanat. 1997; 13: 149–167.

23.Sonino N and Fava GA. Psychiatric disorders associated with Cushing's syndrome. Epidemiology, pathophysiology and treatment. CNS Drugs 2001; 15: 361–373.

24.Magarinos AM, McEwen BS. Stress-induced atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3 neurons: involvement of glucocorticoid secretion and excitatory amino acid receptors. Neuroscience. 1995; 69: 89–98.

25.Trollope AF, Gutièrrez-Mecinas M, Mifsud KR, Collins A, Saunderson EA, Reul JM. Stress, epigenetic control of gene expression and memory formation Exp Neurol. 2011. [Epub ahead of print]

26. Fanselow and Kim, 1994 M.S. Fanselow and J.J. Kim, Acquisition of contextual Pavlovian fear conditioning is blocked by application of an NMDA receptor antagonist D, L-2-amino-5-phosphonovaleric acid to the basolateral amygdala. Behav. Neurosci., 1994;108:210–212.

27. Atkins et al., 1998 C.M. Atkins, J.C. Selcher, J.J. Petraitis, J.M. Trzaskos and J.D. Sweatt, The MAPK cascade is required for mammalian associative learning. Nat. Neurosci., 1998;1: 602–609

28. Impey et al., 1999 S. Impey, K. Obrietan and D.R. Storm, Making new connections: role of ERK/MAP kinase signaling in neuronal plasticity. Neuron, 1999; 23:11–14.

29. Orchinik M, Murray TF, Moore FL. A corticosteroid receptor in neuronal membranes. Science. 1991; 252(5014):1848-51.

30. Roozendaal et al., 2006a B. Roozendaal, S. Okuda, D.J. de Quervain and J.L. Mcgaugh, Glucocorticoids interact with emotion-induced noradrenergic activation in influencing different memory functions. Neuroscience, 2006; 138: 901–910.

31.Yakamura T, Shimoji K. Subunit and site spesific pharmacology of the NMDA receptor channel. Progress in Neurobiology 1999: 59: 279–298.