

Kronik İmmobilizasyon Stresine Maruz Bırakılmış Sıçanlarda 7-Nitroindazolün Anksiyete ve Mekansal Bellek Üzerine Etkileri

The Effects of 7-Nitroindazole on Anxiety and Spatial Memory in Rats Exposed to Chronic Immobilization Stress

Altan EŞSİZÖĞLU, Ejder Akgün YILDIRIM*, Murat MENGİ**, Timuçin ORAL*, Ertan YURDAKOŞ**

Diyarbakır Devlet Hastanesi, Psikiyatri Kliniği, Diyarbakır

*Bakırköy Ord. Prof. Dr. Mazhar Osman Ruh Sağlığı ve Sinir Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Psikiyatri Bölümü, İstanbul

**İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

ÖZET

Amaç: Çalışmamızda nöronal nitrik oksit sentaz (nNOS) enziminin seçici inhibitörü olan 7-nitroindazolün (7-NI) kronik immobilizasyon stresine maruz bırakılan sıçanlarda anksiyete ve bellek üzerine etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Yöntemler: Çalışmamızda Wistar albino erkek sıçanlar kullanıldı. Deney hayvanları 3 gruba ayrıldı: 1) Kontrol grubu: Herhangi bir girişim ve madde enjeksiyonu yapılmayan, immobilizasyon stresine maruz bırakılmayan grup. 2) Yerfistiği yağı+kronik immobilizasyon grubu: 15 gün boyunca günde 30 dakika immobilizasyon stresine maruz bırakılan ve immobilizasyon kafesine konulmadan 30 dakika önce intraperitoneal (i.p.) yoldan 0.5 ml yerfistiği yağı uygulanan grup. 3) 7-NI+kronik immobilizasyon grubu: 15 gün boyunca günde 30 dakika immobilizasyon stresine maruz bırakılan ve immobilizasyon kafesine konulmadan 30 dakika önce i.p. yoldan 30 mg/kg 7-nitroindazol uygulanan grup. Tüm deney gruplarına açık alan testi, holeboard testi ve Morris su labirenti testi uygulandı. Sonuçlar tek yönlü varyans analizi-Tukey HSD testi ve student t testi ile değerlendirildi.

Bulgular: Holeboard testinde, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında yerfistiği yağı+kronik immobilizasyon grubunun immobilizasyon süresi anlamlı olarak uzadı, bakılan delik sayısı ve şahlanma sayısı anlamlı olarak azaldı. Yerfistiği yağı+kronik immobilizasyon grubu ile 7-NI+kronik immobilizasyon grubu arasında holeboard test değerlerinde anlamlı fark gözlenmedi. Açık alan testinde gruplar arasında anlamlı fark saptanmadı. Morris su labirenti testinde kontrol ve 7-NI+kronik immobilizasyon gruplarında, platforma çıkma sürelerinin bir önceki güne göre anlamlı olarak kısaldığı saptanmış, yerfistiği yağı+kronik immobilizasyon grubunda ise bir önceki güne göre anlamlı kısalma gözlenmemiştir.

Sonuç: Çalışmamızın sonuçları; 15 gün süresince, immobilizasyon stresinden 30 dakika önce, i.p. yoldan 30 mg/kg dozunda uygulanan 7-NI'ün anksiyete üzerine etkili olmadığını ancak kronik immobilizasyon nedeniyle bozulan mekansal belleği düzelttiğini göstermektedir. (*Nöropsikiyatri Arşivi* 2009; 46: 157-62)

Anahtar kelimeler: Sıçan, stress, kronik immobilizasyon, bellek, anksiyete, nitrik oksit

ABSTRACT

Objective: In this study, we aimed to investigate the effects of 7-nitroindazole (7-NI), selective inhibitor of neuronal nitric oxide synthase, on anxiety and memory of chronically immobilized rats.

Methods: We used Wistar albino strain mature male rats. Animals were divided into three groups: 1) Control group: The rats without any intervention, injection or immobilization. 2) Peanut oil+chronic immobilization group: The group was exposed to 30 minutes daily immobilization stress for 15 days and 0.5 ml peanut oil was administered intraperitoneally (i.p.) 30 minutes before immobilization. 3) 7-NI+Chronic immobilization group: The group was exposed to 30 minutes daily immobilization stress for 15 days and was given 30 mg/kg 7-NI, i.p. 30 minutes before immobilization. Open field, holeboard and Morris water maze tests were applied to all three groups. Results were analyzed by one way ANOVA-Tukey HSD test and Student's t-test.

Results: In holeboard test, the peanut oil+chronic immobilization group, showed a significant increase in the immobilization time, and a decrease in the number of rears and the squares crossed when compared with the control group. Comparison between 7-NI+chronic immobilization and peanut oil group did not yield any statistically significant result. In open field test, there was no significant difference among the groups. In Morris water maze test, the latency to find the platform was decreased in control and 7-NI+chronic immobilization groups, whereas in peanut oil+chronic immobilization group no significant shortening was found.

Conclusion: Our results suggest that 7-NI, in a dose of 30 mg/kg i.p. administration 30 minutes before immobilization stress for 15 days has no significant effect on anxiety, on the other hand, it could restore the spatial memory impaired by chronic immobilization. (*Archives of Neuropsychiatry* 2009; 46: 157-62)

Key words: Rat, stress, chronic immobilization, memory, anxiety, nitric oxide

Yazışma Adresi/Address for Correspondence: Dr. Altan Eşsizöğlü, Diyarbakır Devlet Hastanesi, Psikiyatri Kliniği, Diyarbakır, Türkiye

E-posta: altanessizoglu@yahoo.com **Geliş tarihi/Received:** 22.04.2009 **Kabul tarihi/Accepted:** 15.09.2009

© Nöropsikiyatri Arşivi Dergisi, Galenos Yayıncılık tarafından basılmıştır. Her hakkı saklıdır. / © *Archives of Neuropsychiatry*, Published by Galenos Publishing. All rights reserved.

Giriş

Vücutta birçok dokuda yaygın olarak bulunmakta olan nitrik oksit (NO), gaz formunda olan bir maddedir (1). NO, nitrik oksit sentaz (NOS) enziminin katalize ettiği bir reaksiyonla L-arjinin'den üretilir (2). NO, merkez sinir sisteminde (MSS) mesajcı olarak kabul edilmektedir (3). Labil membranlardan geçebilen NO, MSS'de önemli bir nöromodülatör işleve sahiptir. NO, nosisepsiyon, öğrenme ve bellek, nöbet aktivitesi, yeme ve içme davranışı, madde bağımlılığı ve nörotransmitterlerin salınımı ve geri alımı gibi birçok beyin işlevinde rol almaktadır (4,5). NOS enziminin inhibisyonu ile NO seviyesinin azalmasını sağlayan inhibitörler ile yapılmış çalışmalar, NOS inhibitörlerinin anksiyolitik etkiye sahip olduklarını göstermektedirler (6). Ancak NO' in stres ve stres ile ilişkili davranışlar üzerindeki etkisi tam olarak belirlenmemiştir (7).

Stres, fiziksel, psikolojik ve/veya çevresel uyarımlar yolu ile oluşabilen psikolojik homeostazisi etkileyebilecek bir faktördür. Organizmanın nörodavranışsal yapısını bozarak başta anksiyete bozuklukları olmak üzere birçok psikiyatrik hastalığa neden olabilir ya da yatkın hale getirebilir (7). Yaygın otonom ve merkezi etkilerinin yanında stres aynı zamanda bir takım emosyonel ve bilişsel işlevleri de bozmaktadır. Bu işlevlerin en çok etkilenenlerinden biri, hipokampusa bağımlı bir öğrenme biçimi olan mekansal (vizyospasial) bellektir (8). NOS inhibitörlerinin sistemik veya intrahipokampal verilmesi kemirgenlerin kullanıldığı birçok farklı deney düzenğinde öğrenme yetisi ve bellek üzerinde bozucu etkiye neden olduğu gösterilmiştir (9,10). Ancak strese maruz bırakılmış hayvanlarda kullanıldıklarında nasıl bir etki gösterdiklerine dair yeterli bilgi bulunmamaktadır.

Oldukça kısa yarılanma ömrüne sahip olan NO'nun (11), MSS üzerine olan etkileri NO donörü ve NOS enzim inhibitörü olan bileşikler kullanılarak incelenir (12). 7-nitroindazol (7-NI), nöronal NOS (nNOS) enziminin seçici ve güçlü bir inhibitörüdür (13). 7-NI, diğer indazol bileşiklerinden farklı olarak serebral korteks, serebellum ve hipokampus gibi beyin bölgelerinde seçici olarak daha güçlü bir NOS inhibisyonu sağlamaktadır (14).

Gelecekte psikiyatrik hastalıkların tedavisinde terapötik ajan olmaya aday olan nNOS inhibitörlerinin kronik stres ile ilgili olası etkileri ise şimdiye kadar oldukça sınırlı sayıda çalışmaya konu olmuş, daha çok sağlıklı hayvanlardaki etkilerine bakılmıştır. Bu çalışmada i.p. yoldan uygulanan 7-NI'nin, kronik immobilizasyon stresi ile anksiyete oluşturulmuş sıçanlarda, emosyonel aktivite ve mekansal bellek üzerine olan etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Yöntemler

Hayvanlar

Çalışmamızda ağırlıkları 250-300 gr arasında değişen Wistar albino erkek sıçanlar kullanıldı. Sıçanlar standart laboratuvar koşullarında 12 saat karanlık 12 saat aydınlıkta, 20-22 °C sabit ısıda, %45-%55 nem oranında tutuldular. Beslenmeleri, standart pelet yemi ve musluk suyu ile sağlandı. Sıçanlar genç erişkin dönemlerine kadar davranış testlerini uygulayacak araştırmacının çıplak el temasına alıştırdı. Böylece sıçanlarda test esnasında temastan doğacak huzursuzluğun en aza indirgenme-

sine olanak sağlanmış oldu. Bu çalışmada "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" prensipleri doğrultusunda hayvan hakları korunmuştur. Deneyler etik ve deney hayvanları konusunda sertifikalı araştırmacılar tarafından yürütülmüş, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Etik Kurulu'ndan onay alınmıştır.

Deney Grupları

Deney hayvanları 3 gruba ayrıldı. Deney grupları ve her bir gruptaki hayvan sayısı ve uygulanan prosedür aşağıdaki gibidir:

1- Kontrol Grubu: Herhangi bir girişim ve madde enjeksiyonu yapılmayan grup (n=9). Çalışma boyunca bu gruptaki sıçanlarda kayıp yaşanmamıştır.

2- Yerfistiği Yağı+Kronik İmmobilizasyon Grubu: 15 gün süresince günde 30 dakika immobilizasyon stresi uygulanıp, her immobilizasyon stresi uygulamasından 30 dakika önce i.p. yoldan 0.5 ml yerfistiği yağı uygulanan grup (n=8). Enjeksiyon uygulamaları sırasında bu gruptaki sıçanlardan bir tanesi ölmüştür.

3- 7-NI+Kronik İmmobilizasyon Grubu: 15 gün süresince günde 30 dakika immobilizasyon stresi uygulanan ve her immobilizasyon stresi uygulaması öncesinde 0.5 ml yerfistiği yağı içerisinde 30 mg/kg dozunda i.p yoldan 7-NI uygulanan grup (n=9). Çalışma boyunca bu gruptaki sıçanlarda kayıp yaşanmamıştır.

Stres Prosedürü

Çalışmada 2. ve 3. hayvan gruplarına anksiyete oluşturmak amacıyla kronik immobilizasyon stresi uygulandı. Kronik immobilizasyon stresi, erişkin sıçanların içinde hareket etmelerine olanak vermeyecek boyutlarda olan tel, pleksiglas gibi maddelerden yapılmış kafeslerde, gün içinde belirli bir süre tutulmaları ile oluşturulur. Çalışmamızda 7cm çapında 13 cm yüksekliğinde silindirik şekilde tel kafesler kullanıldı. Hayvanlara 15 gün süresince, günde 30 dakika immobilizasyon stresi uygulandı. Daha önce el temasına alıştırmış hayvanların kafeslere yerleştirme sırasında ek bir stres yaşamamalarına dikkat edildi.

İlaçlar

Çalışmada nNOS enzim inhibitörü olarak 7-NI (7-nitroindazole: sentetik, saflık %98; ALEXIS, USA) kullanıldı. 7-NI süspansiyonu, yerfistiği yağı (Peanut Oil, SIGMA CO. USA) içerisinde sonikatör yardımı ile hazırlandı.

Uygulanan Testler

1- Açık Alan Testi

Açık alan testi, yan duvarları 90x90 cm, yüksekliği 27 cm olan, 64 eşit kareye bölünmüş üstü açık tahta bir kutuda gerçekleştirilir. Bu testte sıçanların çevreyi araştırmaları (dolaşılan kare sayısı), immobilizasyon (donup kalma) süresi, şahlanma sayısı 6 dakika boyunca takip edilir. Çevreyi araştırmaları, 64 eşit parçaya bölünmüş alanda, içinden geçtikleri kareler 6 dakika boyunca sayılarak tespit edilir. Dolaşılan kare sayısı, çevreyi araştırmacılığın ölçüsü olarak değerlendirilir. İmmobilizasyon, sıçanın hiç bir hareket yapmadan donup kaldığı, çevresi ile ilişkisini kestiği durumdur. İmmobilizasyon süresi bir kronometre ile 6 dakika boyunca ölçülür. Şahlanma, sıçanların ön pençelerini kaldırıp arka bacakları üzerinde durdukları pozisyonudur. Çevreyi araştırmacının belirtisi olarak kabul edilir. Şahlanma sayısı 6 dakika boyunca sayılarak saptanır. Açık alan testi uygulanan sıçanlarda kontrol grubuna göre dolaşılan kare sayısındaki azalma, immobilizasyon süresindeki uzama, şahlanma sayısındaki azalma anksiyete belirtisi olarak kabul edilir (15).

2- Holeboard Testi

Holeboard testi, yan kenarları 47 cm yükseklikte, 66x56 cm ölçülerinde ve tabanında 3.8 cm çapında 16 delik bulunan üstü açık tahta kutuda gerçekleştirilir. Bu testte sıçanların 5 dakika boyunca deliklerin içine bakma sayısı, immobilizasyon süresi, şahlanma sayısı takip edilir. Deliklerin içine bakmada kriter, sıçanın deliklere göz hizasına kadar kafasını sokup deliğin içini araştırmasıdır. Deliklere bakma çevreyi araştırıcılığın belirtisi olarak kabul edilir. Deliklere bakma sayısı 5 dakika boyunca sayılarak saptanır. İmmobilizasyon, sıçanın hiçbir hareket yapmadan donup kaldığı, çevre ile ilişkisini kestiği durumdur. İmmobilizasyon süresi, bir kronometre ile 5 dakika boyunca ölçülerek saptanır. Şahlanma, sıçanların ön pençelerini kaldırıp arka bacakları üzerinde durdukları pozisyonudur. Çevreyi araştırmanın belirtisi kabul edilir. Şahlanma sayısı 5 dakika boyunca sayılarak saptanır. Deliklere bakma sayısındaki azalma, immobilizasyon süresindeki uzama ile şahlanma sayısındaki azalma anksiyete belirtisi olarak kabul edilir (16).

3- Morris Su Labirenti Testi

Pleksiglastan yapılmış silindir şeklinde, çapı 150 cm, derinliği 60 cm olan havuz kullanılır. Havuzun içi 25 cm'ye kadar su ile doldurulur. Suyun sıcaklığı 23 °C'de sabit tutulur. Havuz dört kadrana bölünür, gelişigüzel seçilen bir kadranın içinde 23 cm yüksekliğinde ve 15 cm çapında pleksiglastan yapılmış silindir bir platform bulunur ve bu platformun yeri testin uygulandığı süreye içerisinde değiştirilmez. Havuzun dibinde bulunan siyah örtü hayvanın rahatça görülebilmesini sağlar. Odaya, hayvanın platformu bulurken yararlanacağı bir takım sabit ipuçları konur. Sıçanlar, platformun bulunduğu kadrana hariç tutularak, diğer kadrantlardaki 3 noktadan yüzü havuzun duvarına dönük biçimde sırayla suya bırakılır. Bu sıra her gün farklı bir dizgeyi izlemektedir. Sıçanın ödevi çeşitli ipuçlarını kullanarak gizli platformu bulmaktır. Platformu bulana kadar geçen süre kaydedilir. Eğer sıçan 60 saniye içinde platformu bulamamışsa deneyi uygulayan tarafından platforma çıkarılır. Sıçan, platformda 15 saniye bekledikten sonra kafesine alınır. Bu işlem her hayvan için günde 5 deneme olmak üzere 3 ardışık gün boyunca yapılır. Denemeler süresince hayvanların platformu bulma süreleri kısalır. Bu da mekansal belleğin oluştuğunu göstermektedir (17).

İstatistiksel Analiz

İstatistiksel değerlendirmeleri için spss 13.0 istatistik programı kullanıldı. İstatistiksel değerlendirmede açık alan, hole-board testlerindeki parametrelerin gruplar arası ilişkisini değerlendirmede tek yönlü varyans analizini takiben tukey HSD testi, Morris su labirenti testinde parametrelerin aynı grup içinde değişiminin istatistiksel incelemesinde bağımlı serilerde T-testi kullanıldı. Olasılık düzeyi olarak 0.05 istatistiksel anlamlılık değeri olarak kabul edildi. Açık alan ve holeboard testi sonuçları homojenite açısından değerlendirilmiş ve sadece açık alan testinde kronik immobilizasyon süresi ile ilgili sonuçların normal dağılıma uymadığı saptanmıştır. Bu nedenle bu parametre için Kruskal-Wallis testi uygulanmış ve istatistiksel anlamlılık saptanmamıştır ($p>0.05$).

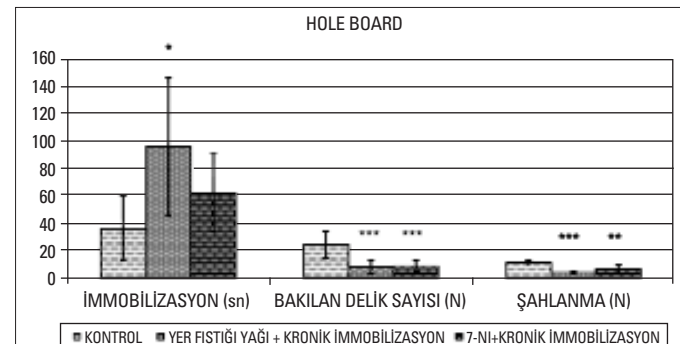
Bulgular

Çalışmamızda, holeboard testinde, kontrol grubu ile yerfıstığı yağı+kronik immobilizasyon grubu karşılaştırıldığında, yerfıstığı yağı+kronik immobilizasyon grubunun immobilizasyon süresinin istatistiksel olarak anlamlı uzadığı ($F:4.476$, $p<0.05$), bakılan

delik sayısının ve şahlanma sayısının ise anlamlı olarak azaldığı bulunmuştur (sırasıyla $F:13.217$, $p<0.001$, $F:15.254$, $p<0.001$). Kontrol grubu ile 7-NI+kronik immobilizasyon grubu karşılaştırıldığında, 7-NI+kronik immobilizasyon grubunun bakılan delik sayısı ve şahlanma sayısındaki azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu (sırasıyla $F:13.217$, $p<0.001$, $F:15.254$, $p<0.01$), immobilizasyon süresinin uzadığı ancak bu farkın anlamlı olmadığı saptanmıştır. Holeboard testinde yerfıstığı yağı+kronik immobilizasyon grubu ile 7-NI+kronik immobilizasyon grubu karşılaştırıldığında ise; her iki grup arasında üç parametre açısından da anlamlı farklılık saptanmamıştır (Grafik 1).

Açık alan testinde ise; kontrol ve yerfıstığı yağı+kronik immobilizasyon grupları ortalamaları karşılaştırıldığında, holeboard testine benzer şekilde yerfıstığı yağı+kronik immobilizasyon grubunun immobilizasyon süresinin uzadığı, dolaşılacak kare sayısı ve şahlanma sayısının azaldığı ancak bu farkların anlamlı olmadığı saptanmıştır. 7-NI+kronik immobilizasyon ve yerfıstığı yağı+kronik immobilizasyon grupları karşılaştırıldığında, 7-NI+kronik immobilizasyon grubunun immobilizasyon süresinin kıaldığı, dolaşılacak kare sayısı ve şahlanma sayısının arttığı ancak bu farkların anlamlı olmadığı bulunmuştur. Kontrol ve 7-NI+kronik immobilizasyon grupları karşılaştırıldığında ise; 7-NI+kronik immobilizasyon grubunda immobilizasyon süresinin kıaldığı ancak bu farkın anlamlı olmadığı, dolaşılacak kare sayısı ve şahlanma sayısı ortalama değerlerinin birbirine yakın olduğu görülmüştür (Grafik 2, Tablo 1).

Morris su labirent testinde üç gün üst üste hayvanların platforma çıkma süreleri ölçülmüş, her gün için yapılan beş denemenin ortalaması o günün ortalama süresi olarak saptanmıştır. Bu deney modelinde kontrol grubunda, platforma çıkma sürelerindeki kısalma 1. gün ile 2. gün ortalamaları arasında ($p<0.01$) ve 2. gün ile 3. gün ortalamaları arasında ($p<0.05$) bir önceki güne göre anlamlı olarak saptanmıştır. Yerfıstığı yağı+kronik immobilizasyon grubunda ise 1. ve 2. gün arasında anlamlı fark varken ($p<0.01$) 2. ve 3. günler arasında anlamlı fark gözlenmemiştir. 7-NI+kronik immobilizasyon grubunda, platforma çıkma sürelerindeki kontrol grubuna benzer şekilde 1. gün ile 2. gün arasında ($p<0.01$) ve 2. gün ile 3. gün arasında ($p<0.05$) bir önceki güne göre anlamlı olarak kısalma saptanmıştır (Grafik 3, Tablo 2).



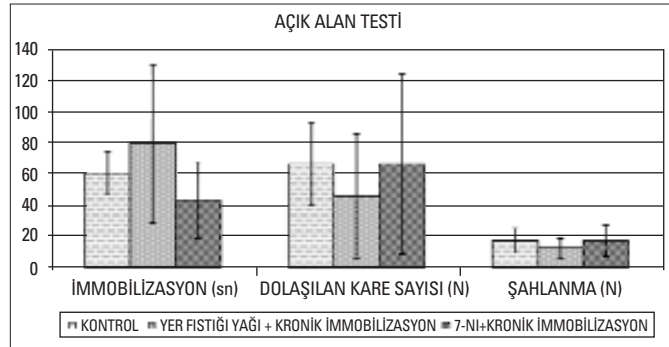
Grafik 1. Holeboard testinde, belirtilen deney gruplarında immobilizasyon süresinin (sn), bakılan delik sayısının (N) ve şahlanma sayısının (N) gruplar arasındaki değişimin istatistiksel olarak incelenmesi. Dikey çizgiler ortalama (M)'nin standart sapmasını (SS) göstermektedir. (Kontrol grubuna göre anlamlılık, * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ ANOVA-Tukey HSD). Gruplardaki hayvan sayıları (n), kontrol grubu: 9, yerfıstığı yağı+kronik immobilizasyon: 8, 7-NI+kronik immobilizasyon: 9.

7-NI: 7-nitroindazol

Tartışma

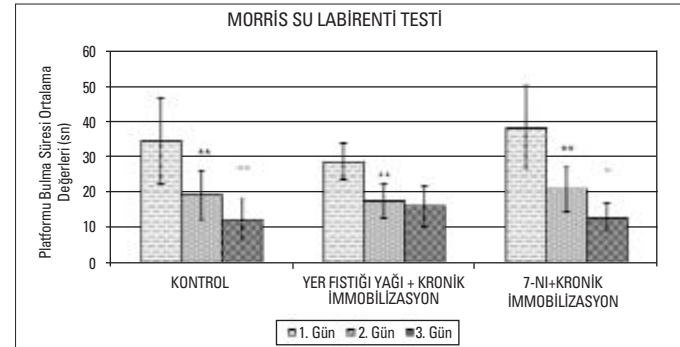
Çalışmamızda 30 mg/kg dozunda 7-NI kullanılmış ve uygulama 15 gün süresince immobilizasyon stresi öncesi yapılmıştır. Holeboard testinde kronik immobilizasyon uygulanan gruplarda bakılan delik sayısı ve şahlanma sayıları azalmış, immobilizasyon süreleri ise uzamıştır. Açık alan testinde ise gruplar arasında anlamlı fark saptanmamakla birlikte ortalama değerler holeboard testi sonuçlarına benzer bulunmuştur. Her iki deney modelinin sonuçları beraber değerlendirildiğinde bulgular yerfistiği yağı+kronik immobilizasyon grubu ve 7-NI+kronik immobilizasyon grubunun anksiyetede olduğunu göstermektedir. Diğer taraftan yerfistiği yağı+kronik immobilizasyon grubu ve 7-NI+kronik immobilizasyon grubu değerleri arasında anlamlı

farkın olmaması 15 gün boyunca, immobilizasyon stresinden 30 dakika önce, i.p. yoldan 30 mg/kg dozunda uygulanan 7-NI'nin kronik immobilizasyonun oluşturduğu anksiyete üzerine etkili olmadığını göstermektedir. Masood ve arkadaşlarının hem sağlıklı hem de akut strese maruz bırakılan sıçanlarda, 7-NI'nin anksiyete üzerine olan etkilerini araştırdıkları çalışma (7) dışında diğer tüm çalışmalar sağlıklı sıçanlarla yapılmıştır. 7-NI'nin sağlıklı sıçanlarda anksiyete üzerine etkilerini inceleyen çalışmalarda 30 mg/kg dozunda anksiyolitik etkiye neden olduğu bildirilmiştir (6,18). Bununla birlikte Volke ve arkadaşlarının yaptığı ve yükseltilmiş artı labirenti testi kullanılan çalışmada 7-NI'nin anksiyolitik etkisinin doza bağlı olduğu ve minimal etkin dozunun 40 mg/kg olduğu öne sürülmüştür (19). Masood ve arkadaşları tarafından yükseltilmiş artı labirenti testi ve açık alan testi



Grafik 2. Açık alan testinde, belirtilen deney gruplarında immobilizasyon süresinin (sn), dolaşılacak kare sayısının (N) ve şahlanma sayısının (N) gruplar arasındaki değişimin istatistiksel olarak incelenmesi. Dikey çizgiler ortalama (M)'nin standart sapmasını (SS) göstermektedir. Gruplardaki hayvan sayıları (n), kontrol grubu: 9, yerfistiği yağı+kronik immobilizasyon: 8, 7-NI+kronik immobilizasyon: 9

7-NI: 7-nitroindazol



Grafik 3. Morris su labirenti testinde grupların 1., 2. ve 3. günlerdeki platforma çıkma sürelerinin bir önceki güne göre istatistiksel olarak incelenmesi. Dikey çizgiler ortalamanın (M) standart sapmasını (SS) göstermektedir (1.gün ve 2.gün arasındaki anlamlılık*, 2.gün ve 3.gün arasındaki anlamlılık* ile gösterilmiştir. *p<0.05, ** veya °p<0.01)

7-NI: 7-nitroindazol

Tablo 1. Grupların açık alan ve holeboard testlerinde ortalama dolaşılacak kare, bakılan delik ve şahlanma sayıları, ortalama immobilizasyon süreleri ve karşılaştırılması

	Kontrol (n:9) N/sn±SS	Yerfistiği yağı+Kronik İmmobilizasyon (n:8) N/sn±SS	7-NI+Kronik İmmobilizasyon (n:9) N/sn±SS	p1	p2	p3
Açık alan						
Dolaşılacak kare sayısı (N)	66.14±26.87	45.50±39.82	66.14±58.21	0.290	1.000	0.479
İmmobilizasyon süresi (sn)	60.00±14.05	79.33±51.46	43.14±24.50	0.357	0.140	0.124
Şahlanma sayısı (N)	16.85±7.98	12.00± 6.13	17.00 ± 10.26	0.250	0.977	0.320
Holeboard						
Bakılan delik sayısı (N)	23.71±9.75	7.16±4.57	8.14±3.57	<0.001	<0.001	0.674
İmmobilizasyon süresi (sn)	35.71±24.01	95.66±50.70	61.71±28.32	0.017	0.088	0.156
Şahlanma sayısı (N)	10.14±1.86	3.50±1.04	5.85±3.07	<0.001	0.008	0.102

N: Dolaşılacak kare sayısı, bakılan delik sayısı ve şahlanma sayısı, sn: Immobilizasyon süresi (saniye), SS: Standart sapma, n: Hayvan sayısı, 7-NI: 7-nitroindazol, p1: Kontrol grubu ile yerfistiği yağı+kronik immobilizasyon grubu karşılaştırılması, p2: Kontrol grubu ile 7-NI+kronik immobilizasyon grubu karşılaştırılması, p3: Yerfistiği yağı+kronik immobilizasyon grubu ile 7-NI+kronik immobilizasyon grubu karşılaştırılması

Tablo 2. Morris su labirenti testinde grupların ortalama platform bulma süreleri ve karşılaştırılması

	1. gün platformu bulma süresi sn±SS	2. gün platformu bulma süresi sn±SS	3. gün platformu bulma süresi sn±SS	p1	p2
Kontrol	34.64±12.17	19.11±6.98	12.16±6.15	0.001	0.001
Yerfistiği yağı+Kronik immobilizasyon	28.65±5.19	17.38±4.79	15.88±5.85	0.001	0.300
7-NI+Kronik immobilizasyon	38.18±11.93	20.89±6.47	12.76±4.16	0.001	0.010

sn: Platform bulma süresi (saniye), SS: Standart sapma, 7-NI: 7-nitroindazol, p1: 1. ve 2. gün platform bulma sürelerinin karşılaştırılması, p2: 2. ve 3. gün platform bulma sürelerinin karşılaştırılması

kullanarak yapılan çalışmada ise sağlıklı ve akut immobilizasyon stresine maruz bırakılmış sıçanlara davranışsal testlerden 30 dakika önce i.p. yoldan 10 ve 50 mg/kg dozlarında 7-NI uygulanmış ve anksiyete üzerine etkisiz olduğunu bildirilmiştir. Çalışmada kullanılan ve bir diğer NOS inhibitörü olan L-NAME'in ise düşük doz (10 mg/kg i.p.) uygulandığında akut immobilizasyon stresine maruz bırakılan sıçanlarda anksiyolitik etkiye neden olduğunu, yüksek dozda (50 mg/kg i.p.) uygulandığında ise akut immobilizasyon stresinin sıçanlarda yarattığı anksiyojenik etkiyi ortadan kaldırmadığını göstermişlerdir. Masood ve arkadaşları stres modeli ile ortaya çıkan bu bulguların NO ile stres arasındaki ilişkide nNOS enzimi dışındaki enzimler aracılığıyla üretilen NO'nun rol oynuyor olabileceğini öne sürmüşlerdir (7). Çalışmamızın anksiyete ile ilgili bulguları Masood ve arkadaşlarının bildirdikleri bulguları destekler niteliktedir. Bulgularımız, kronik immobilizasyon stresine maruz bıraktığımız sıçanlarda, stres öncesi 30 mg/kg 7-NI dozunun, kronik immobilizasyon stresi nedeni ile ortaya çıkan anksiyete üzerine etkisini ortaya koyabilmemiz için yeterli olmayabileceğini veya Masood ve arkadaşlarının ifade ettiği gibi (7), stres sırasında nNOS enzimi dışındaki enzimler aracılığıyla üretilen NO'nun rol oynadığını gösteriyor olabilir.

Çalışmamızda kullandığımız diğer bir deney modeli olan Morris su labirenti testinde kontrol ve 7-NI+kronik immobilizasyon grubunda, platforma çıkma sürelerindeki kısalma 1. gün ile 2. gün ortalamaları arasında ve 2. gün ile 3. gün ortalamaları arasında bir önceki güne göre anlamlı olarak saptanmıştır. Yerfıstığı yağı+kronik immobilizasyon grubunda ise 1. ve 2. gün arasında anlamlı fark varken 2. ve 3. günler arasında anlamlı fark gözlenmemiştir. Bu bulgular strese bağlı ortaya çıkan mekansal bellek bozukluğunun 7-NI uygulaması ile ortadan kalktığını göstermektedir. Çalışmamızın bu sonucu, sağlıklı hayvanların kullanıldığı ve NOS inhibitörlerinin bellek üzerine etkilerini inceleyen çalışmaların sonuçlarını (9,10) desteklememektedir. Kronik immobilizasyon stresinin, sıçanlarda hipokampusun CA3 piramidal nöronlarının apikal dendritlerinde yapısal değişikliklere neden olduğu bilinmektedir (20,21). Sözü edilen yapısal değişiklikler hipokampusun önemli işlevlerinden olan mekansal belleğin bozulması ile sonuçlanır (22,23). Magariños ve McEwen yaptıkları çalışmada kronik immobilizasyon stresi uyguladıkları sıçanlarda, N-metil-D-aspartat (NMDA) ve α -amino-3-hidroksi-5-metilsoksazol-4-propiyonik asit (AMPA) reseptör antagonistlerinin, hipokampus CA3 bölgesindeki nöronların apikal dendritlerindeki atrofi üzerine etkilerini incelemişlerdir. Bu çalışmada NMDA reseptör blokajı yapan CGP 43487'nin kronik immobilizasyon stresi sonucu sıçan hipokampusunun CA3 bölgesinde bulunan nöronlarda apikal dendritik atrofi gelişmesini engellediği, AMPA reseptör blokajı yapan 2,3-dihidroksi-6-nitro-7-sülfamoyil-benzo'nun (NBQX) ise atrofiyi engellemediği ortaya konulmuştur (24). NMDA reseptörlerinin uyarılması NO sentezinin artmasına neden olmaktadır (18,19). Echeverry ve arkadaşları yaptıkları çalışmada kronik immobilizasyon stresine maruz bırakılan sıçanların hipokampuslarında nNOS ekspresyonunun arttığını ortaya koymuşlardır (25). Law ve arkadaşları yaptıkları çalışmada yaşlı sıçanlara Morris su labirenti testi uygulanmış ve bu testte mekansal bellek işlevleri bozuk olduğu saptanan sıçanların hipokampuslarında nNOS ekspresyonunun, bu işlevle-

ri yeterli olan sıçanlara göre anlamlı derecede yüksek olduğunu saptamışlardır (26). NOS enzim inhibitörleri ile yapılan çalışmalar düşük doz NOS enzim inhibitörlerinin nörotoksisteye karşı koruyucu etki gösterdiğini ortaya koymuştur (27). NOS enzim ekspresyonunun artması NO üretiminin artmasıyla ve nörotoksik hasar oluşmasıyla sonuçlanabilir. Hipokampusta meydana gelen nörotoksik hasar mekansal bellek işlevinin bozulması ile sonuçlanması olasıdır. Çalışmamızda seçici nNOS inhibitörü olan 7-NI'nin kronik immobilizasyon stresi sonucu bozulan mekansal belleği düzeltmiş olması, NMDA reseptör antagonistlerinin yaptığı gibi, kronik immobilizasyon stresine artan NO üretimini engellemesiyle ve böylece hipokampal yapıları kronik immobilizasyon stresine meydana gelen atrofiden koruyor olması ile açıklanabilir. Bu durumun açıklığa kavuşturulabilmesi için benzer deneysel modalitelerde hipokampus morfolojisinin detaylı değerlendirildiği çalışmalar planlanmalıdır.

Çalışmamıza sham grubunun (ağrı enjeksiyonunun etkilerinin değerlendirilmesi açısından) dahil edilmemiş olması ve histolojik değerlendirmelerin yapılmamış olması bu yazının kısaltılıklarını oluşturmaktadır.

Kaynaklar

1. Majlessi N, Kadhodae M, Parviz M et al. Serotonin depletion in rat hippocampus attenuates L-NAME-induced spatial learning deficits. *Brain Res* 2003; 963:244-51. (Abstract) / (PDF)
2. Dawson TM, Dawson VL. Nitric oxide: Actions and pathological roles. *The Neuroscientist* 1995; 1:7-18. (Abstract) / (PDF)
3. Telegdy G, Kokavszky R. The role of nitric oxide in passive avoidance learning. *Neuropharmacology* 1997; 36:1583-7. (Abstract) / (PDF)
4. Li SM, Yin LL, Shi J et al. The effect of 7-nitroindazole on the acquisition and expression of D-methamphetamine-induced place preference in rats. *Eur J Pharmacol* 2002; 435:217-23. (Abstract) / (PDF)
5. Uzbay IT, Lal H. Effects of NG-nitro-L-arginine methyl ester, 7-nitroindazole, and agmatine on pentylentetrazol-induced discriminative stimulus in Long-Evans rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2002; 26:567-73. (Abstract) / (PDF)
6. Dunn RW, Reed TAW, Copeland PD et al. The nitric oxide synthase inhibitor 7-nitroindazole displays enhanced anxiolytic efficacy without tolerance in rats following subchronic administration. *Neuropharmacology* 1998; 37:899-904. (Abstract) / (PDF)
7. Masood A, Banejee B, Vijayan VK et al. Modulation of stress-induced neurobehavioral changes by nitric oxide in rats. *Eur J Pharmacol* 2002; 458:135-9. (Abstract) / (PDF)
8. Watanebe Y, Gould E, Daniels DC et al. Tianeptine attenuates stress-induced morphological changes in the hippocampus. *Eur J Pharmacol* 1992; 222:157-62. (Abstract)
9. Huang AM, Lee EH. Role of hippocampal nitric oxide in memory retention in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 1995; 50:327-32. (Abstract)
10. Oimo M, Yamamoto T, Watanabe S. Deficits in working memory following inhibition of hippocampal nitric oxide synthesis in the rat. *Brain Res* 1993; 632:36-40. (Abstract) / (Full Text) / (PDF)
11. dos Reis EA, de Oliveira LS, Lamers ML et al. Arginine administration inhibits hippocampal Na⁺, K⁺ ATPase activity and impairs retention of an inhibitory avoidance task in rats. *Brain Res* 2002; 951:151-7. (Abstract) / (PDF)
12. Prast H, Philippu A. Nitric oxide as modulator of neuronal function. *Prog Neurobiol* 2001; 64:51-68. (Abstract) / (PDF)
13. Babbidge RC, Bland-Ward PA, Hart SL et al. Inhibition of rat cerebellar nitric oxide synthase by 7-nitroindazole and related substituted indazoles. *Br J Pharmacol* 1993; 110:225-8. (Abstract) / (PDF)
14. Manzenedo C, Aguilar MA, Rodriguez-Arias M et al. 7-Nitroindazole blocks conditioned place preference but not hyperactivity induced by morphine. *Behav Brain Res* 2004; 150:73-82. (Abstract) / (PDF)

15. Carli M, Prontera C, Samanin R. Effect of 5-HT_{1A} agonists on stress-induced deficit in open field locomotor activity of rats: evidence that this model identifies anxiolytic-like activity. *Neuropharmacology* 1989; 28:471-6. ([Abstract](#))
16. Johnston AL, Baldwin HE, File SE. Measures of anxiety and stress in the rat following chronic treatment with yohimbine. *J Psychopharmacol* 1988; 2:33-8. ([Abstract](#)) / ([PDF](#))
17. D'Hooge R, De Deyn P. Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Res Rev* 2001; 36:60-90. ([Abstract](#)) / ([PDF](#))
18. Yıldız F, Ulak G, Erden BF et al. Anxiolytic-like effects of 7-nitroindazole in the rat plus-maze test. *Pharmacol Biochem Behav* 2000; 65:199-202. ([Abstract](#)) / ([PDF](#))
19. Volke V, Soosaar A, Köks S et al. 7-nitroindazole, a nitric oxide synthase inhibitor, has anxiolytic-like properties in exploratory models of anxiety. *Psychopharmacology* 1997; 131:399-45. ([Abstract](#)) / ([PDF](#))
20. Magariños AM, McEwen BS, Flügge G et al. Chronic psychosocial stress causes apical dendritic atrophy of hippocampal CA3 pyramidal neurons in subordinate three shrews. *J Neurosci* 1996; 16:3534-40. ([Abstract](#)) / ([Full Text](#)) / ([PDF](#))
21. Watanabe Y, Gould E, McEwen BS. Stress induces atrophy of apical dendrites of hippocampus CA3 pyramidal neurons. *Brain Res* 1992; 588:341-4. ([Abstract](#)) / ([PDF](#))
22. Conrad CD, Galea LAM, Kuroda Y et al. Chronic stress impairs rat spatial memory on the Y-Maze and this effect is blocked by tianeptine pre-treatment. *Behav Neurosci* 1996; 110:1321-34. ([Abstract](#))
23. Luine V, Villegas M, Martinez C et al. Repeated stress causes reversible impairments of spatial memory performance. *Brain Res* 1994; 639:167-70. ([Abstract](#)) / ([PDF](#))
24. Magariños AM, McEwen BS. Stress-induced atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3c neurons: involvement of glucocorticoid secretion and excitatory amino acid receptors. *Neuroscience* 1995; 69:89-98.
25. Echeverry MB, Guimrães FS, Del Bel EA. Acute and delayed restraint stress-induced changes in nitric oxide producing neurons in limbic regions. *Neuroscience* 2004; 125:981-93. ([Abstract](#)) / ([PDF](#))
26. Law A, Dore S, Blackshaw S et al. Alteration of expression levels of neuronal nitric oxide synthase and haem oxygenase-2 messenger RNA in the hippocampi and cortices of young adult and aged cognitively unimpaired and impaired long-evans rats. *Neuroscience* 2000; 100:769-75. ([Abstract](#)) / ([PDF](#))
27. Carreau A, Duval D, Poignet H et al. Neuroprotective efficacy of N omega-nitro-L-arginine after focal cerebral ischemia in the mouse and inhibition of cortical nitric oxide synthase. *Eur J Pharmacol* 1994; 256:241-9. ([Abstract](#))