

Erken Dönem Müdahalelerin Erişkin Wistar Sıçanlarında Davranışsal ve Nörogelişimsel Etkileri

Behavioral and Neurodevelopmental Effects of Early Interventions in Adult Wistar Rats

Melike KÜÇÜKKARAPINAR¹, Aslıhan DÖNMEZ², Selçuk CANDANSAYAR¹, Aruz BOZKURT³, Elif AKÇAY⁴, Özlem GÜLBAHAR⁵, Hayrunnisa BOLAY BELEN⁶

¹Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, Psikiyatri Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

²Boğaziçi Üniversitesi Psikoloji Bölümü, İstanbul, Türkiye

³Ağrı Devlet Hastanesi, Psikiyatri Kliniği, Ağrı, Türkiye

⁴Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, Çocuk ve Ergen Psikiyatrisi Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

⁵Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

⁶Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, Nöroloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

ÖZ

Amaç: Yaşamın erken döneminde yapılan müdahaleler erişkin dönemde bilişsel ve davranışsal değişikliklerle ilişkilidir. Erken dönem stresli bir yaşam olayına maruziyet veya çevre zenginleştirme gibi müdahalelerin bilişsel ve davranışsal gelişimi üzerine etkisi, üzerinde çalışılan alanlardır. Bu çalışmanın amacı yeni bir müdahale yöntemi geliştirmek; erken dönem müdahalelerin, erişkin dönemde sosyal etkileşim, anksiyete düzeyleri, bellek üzerine ve prefrontal korteks ve hipokampustaki NR2B (N-metil-D-aspartat reseptörü 2B alt ünitesi) düzeylerindeki etkilerini araştırmaktır. Çalışmanın hipotezi, ambivalan anneye maruziyetin, en az anneden bir saat ayrı kalmak kadar sıçanların davranış performanslarını erişkin dönemde olumsuz etkileyeceği ve prefrontal korteks ve hipokampusta NR2B düzeylerinde de değişikliğe neden olacağıdır.

Yöntem: Çalışmada Wistar sıçanlar kontrol grubu (12), anneden 15 dakika ayrı kalan grup (hafif stres) (12), anneden 60 dakika ayrı kalan grup (ağır stres) (14) ve ambivalan anne grubu (13) olmak üzere dört gruba ayrılmıştır. Erişkin dönemde sıçanların sosyal etkileşim testi, yükseltilmiş artı labirent ve yeni nesne tanıma testi performansları değerlendirilmiştir. Müdahalelerin prefrontal korteks ve hipokampus NR2B düzeyleri üzerine etkisini

değerlendirmek amacıyla, ELISA yöntemi kullanılmıştır.

Bulgular: Çalışmanın önemli bulguları, yeni nesne tanıma testinde anneden ayırmanın cinsiyet ayırt etmeksizin tanıma belleğini etkilemediği, ambivalan anne grubu dişilerinin kısa tanıma belleği iyi iken, hafif stres grubu erkeklerinin uzun süreli bellek performansının daha iyi olduğu idi. Ayrıca sosyal etkileşim testinde ambivalan anne grubunun ve ağır stres grubunun erkeklerinin daha agresif davranışlar sergilemesiydi. Hafif stres ve ambivalan anne grubu prefrontal korteks NR2B düzeyinin ağır stres grubuna göre daha fazla olduğu, tüm müdahale gruplarında kontrol grubuna kıyasla NR2B düzeyinin artmış olduğu saptanmıştır.

Sonuç: Bu çalışma sonuçları hipotezin aksine, ambivalan anne grubu sıçanlarının davranışlarının, ağır stres grubu sıçanlarından daha fazla olumsuz etkilenmediğini, oluşturulan modelin erken dönem stresli yaşam olayı maruziyetinden çok, çevre zenginleştirme modeli olabileceğini desteklemektedir.

Anahtar Kelimeler: Wistar sıçanları, davranışsal müdahaleler, NR2B, NMDA reseptörü, saldırganlık

ABSTRACT

Introduction: Interventions performed in the early period of life are associated with cognitive and behavioral changes in adulthood. The effects of interventions such as exposure to an early stressful life event or environmental enrichment on cognitive and behavioral development are the areas studied. The aim of this study is to develop a new intervention method, to investigate the effects of early interventions on social interaction, memory anxiety levels and NR2B (N-methyl-D-aspartate receptor subunit 2B) levels in prefrontal and hippocampus in adulthood. The hypothesis of the study is that exposure to the ambivalent mother will affect the behavioral performance of rats at least as much as one hour apart from the mother in the adult period and cause changes in the prefrontal cortex and hippocampus in the NR2B levels.

Method: In the study, the Wistar rats were divided into four groups as control group (12), group that remained 15 minutes apart from mother (Mild Stress) (12), group that remained 60 minutes apart from mother (Severe Stress) (14) and ambivalent mother group (13). In adulthood, the social interaction test, elevated plus maze and new object recognition test performances of rats were evaluated. ELISA method was used to evaluate the effect of interventions on the prefrontal cortex and hippocampus NR2B levels.

Results: The important findings of the study were that in the new object recognition test, separation from the mother did not affect the recognition memory regardless of gender, while the short-term recognition memory of the females of the ambivalent mothers group was good and the long-term memory performance of the mild stress groups was better. In addition, in the social interaction test, the males of the ambivalent group and the mild stress group showed more aggressive behavior. It was determined that the prefrontal cortex NR2B level was higher in mild stress and ambivalent mother group compared to the severe stress group, and NR2B level was increased in all intervention groups compared to the control group.

Conclusion: In contrast to the hypothesis, the results of this study support that the of the ambivalent mothers group rats are not more adversely affected than the severe group rats, and that the model created may be an environmental enrichment model rather than an early stressful life event exposure.

Keywords: Wistar rats, behavioral manipulations, NR2B, NMDA receptor, aggression

Cite this article as: Küçükkarapınar M, Dönmez A, Candansayar S, Bozkurt A, Akçay E, Gülbahar Ö, Bolay Belen H. Erken Dönem Müdahalelerin Erişkin Wistar Sıçanlarında Davranışsal ve Nörogelişimsel Etkileri. Arch Neuropsychiatry 2021;58:137-145.

GİRİŞ

Yaşamın erken dönemi bireyin gelişimi için en önemli ve dış etkenlere en açık olduğu dönemdir. Bu dönemde stresli yaşam olaylarına maruziyetin, erişkin dönemde artmış stres duyarlılığı, bilişsel ve davranışsal bozukluklarla ilişkili olduğu düşünülmektedir (1, 2). Maruz kalınan belirli bir stres etkeninin uzun dönem davranışsal etkilerini incelemek, insan çalışmalarından çok hayvan çalışmaları ile maruz kalınan etkeni kontrol etmek adına daha mümkündür.

Hofer, tipik ebeveyn ve yavru etkileşiminin bileşenleri olan sensorimotor, termal ve besleme temelli bir dizi hadisenin infant davranış ve fizyolojisi üzerinde uzun süreli düzenleyici etkilerinin olduğunu savunmuştur (3). Bu düzenleyici etkenlerden ebeveyn yoksunluk ve ya kaybına bağlı ortaya çıkan aksaklıklar; sirkadyen ritim, büyüme (beyin büyüme faktörleri dâhil) (4) ve hormon düzeylerinde (HPA aktivitesi dahil) (5) değişikliklere yol açmaktadır. Sıçanlarla yapılan çalışmalarda anneden yoksunluk süresi, 10 ile 60 dakikaya kadar ise kısa süreli, 60-480 dakika arasında değişen süreler ise uzun süreli anneden ayırma olarak sınıflandırılmaktadır (6). Zaman faktörünü dikkate almak önemlidir, çünkü bazı çalışmalar kısa ayırma sürelerinin yavruların gelişimini bozmadığını, ancak uzun süreli ayrılmanın gelişim için yetersiz bir ortam oluşturabileceğini bildirmektedir (7, 8). Ayrıca doğumda sıçan beyninin tam gelişmemiş olduğu sinaptogenezin yaşamın ilk 4-11. günlerde, hipokampal nöronal hücre gelişiminin ve dendritik gelişimin postnatal 5-7. günlerde maksimum düzeyde olduğu bilinmektedir. Bu nedenle erken dönem anneden ayırma müdahaleleri, yaşamın ilk iki haftasında yapılmaktadır.

Nörogelişim ile ilgili süreçte anahtar molekülün, sinaptik plastisite ve eksitatuvar nörotransmisyon için gerekli olan iyonotropik glutamat reseptörlerinden biri olan N-Metil-D-Aspartat (NMDA) olduğu bilinmektedir. NMDA reseptörleri NR1 ve NR2 alt ünitelerinin farklı oranlarda bir araya gelmesi ile oluşan yapılardır. Bu alt birimlerden biri de NR2B'dir. NR2B ifadesinin en yoğun olduğu bölgeler: korteks > olfaktör bulbus > hipokampustur (9). NR2B; duyuşal bellek, asosiyatif bellek, tanıma belleği ve sosyal bellek dâhil belleği ve belleğin bir çok formundaki bilişi artırılabilir (10). NR2B alt ünitesinin; koku öğrenme ve koku belleğinde görev alan olfaktör bulbus, amigdala, korteks ve hipokampüsün dâhil olduğu ön beyin bölgelerinde sosyal tanıma mekanizması ile ilişkili olarak yoğun miktarda ifade edildiği gösterilmiştir (11). Yaşamın erken döneminde anneden günlük 15 dakika süreyle ayrı kalan sıçanların erişkin dönem NR2B mRNA düzeyinin prefrontal kortekste ve dorsal hipokampüste arttığı gösterilmiştir (12). Bir çalışmada ağır strese maruz kalan erişkin erkek sıçanlarda hipokampüste NMDA NR2B mRNA ifadesinde azalma olduğu, prefrontal kortekste ise her hangi bir değişiklik olmadığı belirtilmiştir (13).

Yaşamın erken döneminde anneden ayrı kalmanın, erişkin sıçanların davranışlarında değişikliklere yol açtığı çalışmalarda gösterilmiştir. Yaşamın erken döneminde kısa süreli anneden ayrı kalan erişkin sıçanların yeni bir çevreye girdiğinde daha az korku duydukları, daha az duyuşal oldukları ve daha çok keşfe yönelik davranışlar sergiledikleri gösterilmiştir. (14) Anksiyete davranışını değerlendirmek amacıyla yapılan yükseltilmiş artı labirentin açık kollarında daha fazla zaman geçirdikleri; sosyal öğrenme testinde yeni ve tanıdık cisimleri ayırt edebildikleri fakat öğrenme fazı boyunca daha az sosyal keşif yaptıkları; sosyal etkileşim testi boyunca koklama gibi katılımcı sosyal davranışlarının azaldığı, agresyon gibi katılımcı olmayan davranışların arttığı gözlenmiştir (15). Doğum sonrası ilk 3 hafta boyunca uzun süre anneden ayrılan sıçanların ise erişkin olduğunda, kontrol grubundan davranış bakımından her hangi bir farklılık sergilemedikleri sonucuna ulaşan çalışmalar olsa da yükseltilmiş artı labirentin açık kollarında az vakit geçirdiklerini, yeni nesne tanıma testinde kontrol grubuna göre başarısız olduklarını bildiren çalışmalar bulunmaktadır (10, 16, 17).

Literatür incelendiğinde erken dönem müdahalesi olarak annenin yokluğu strese maruziyet olarak değerlendirilirken, annenin olduğu halde yavruyu

beslemediği, yavruya bakım vermediği ambivalan durumların erişkin dönemde etkisine yönelik bilgiler kısıtlıdır. İnsanlarda annenin çocuğa bazen sevgi dolu, bazen de soğuk ve ilgisiz davranışlar sergilemesinin, çocuk erişkin döneme geldiğinde birçok psikiyatrik bozukluğun ortaya çıkmasında risk etkeni olabileceği düşünülmektedir. Erişkin dönemde, tek başına yaşamın erken döneminde bakım verenin ambivalan (ikircikli) davranışına maruziyetin davranışsal etkilerini insan çalışmalarında değerlendirmek güçtür. Çalışmalar o anki ebeveyn tutumunun geçmişte de ambivalan olduğu düşünülerek planlanabilmektedir. Elde edilen sonuçlar da pek çok karıştırıcı faktör nedeniyle güvenilir değildir.

Bu çalışmanın birincil amacı, var olduğu halde bakım vermeyen ve beslemeyen bir ambivalan anne ile sıçanlarda yeni bir erken dönem müdahale modeli geliştirmektir. İkinci amacı ise oluşturulan model dâhil erken dönem stresli yaşam olaylarının erişkin dönemde sosyal etkileşim, bellek, anksiyete düzeyleri, hipokampus ve prefrontal korteksin NR2B düzeyleri üzerine etkilerini incelemektir. Çalışmanın hipotezi, ambivalan anneye maruziyetin, en az anneden bir saat ayrı kalmak kadar sıçanların davranış performanslarını erişkin dönemde olumsuz etkileyeceğidir. Bu müdahalenin ayrıca tanıma belleği, sosyal bellek ve koku belleği ile ilişkili olduğu düşünülen NR2B'nin prefrontal korteks ve hipokampus düzeylerinde de değişikliğe neden olacağıdır.

Sıçanların Temini ve Çalışma

Bu çalışma, Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığı GÜ-ET-14069 sayılı kararıyla etik kurul onayı almıştır. Çalışmada yer alan sıçanlar, Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi'nden temin edilmiştir. Gazi Üniversitesi Etik kurul kuralları gereği her gruba iki gebe sıçan olmak üzere toplam sekiz gebe Wistar sıçan vermiştir. Bu sıçanlardan doğan 28 erkek ve 23 dişi toplam 51 sıçanla çalışma yapılmıştır. Doğumun olduğu gün 0. gün olarak kabul edilmiştir. Yavru sıçanlarla doğum sonrası 1. günden itibaren çalışmaya başlanmıştır. Kontrol grubunda altı erkek altı dişi; Hafif Stres grubunda altı erkek, altı dişi; Ağır Stres grubunda dokuz erkek, beş dişi ve Ambivalan Anne grubunda beş erkek ve sekiz dişi bulunmaktadır.

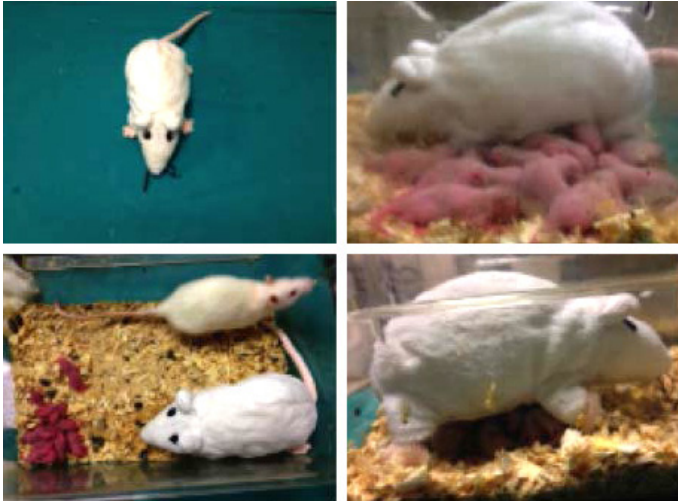
Postnatal 1-14. Günlerde Yavru Sıçanlara Müdahaleler

Kontrol grubundaki sıçanlar doğumdan sonra 1-14. günlerde annelerinin yanında herhangi bir müdahale olmadan büyümüştür. Bu dönem boyunca sadece üç günde bir su ve yiyecek ihtiyaçlarını gidermek için bulundukları ortama girilmiştir.

İkinci grup sıçanlar postnatal 1-14. günlerde, her gün, saat sabah 10,00'da önce anne kafesten çıkarılarak ayrı bir kafese konulmuştur. Daha sonra, eldivensiz elle yavrular birer birer kafesten çıkarılıp, altında 28-30°C'da ısıtıcı bulunan, içi talaş dolu plastik kaplara teker teker konulup, 15 dakika bu kap içinde bekletildikten sonra geri kafese konulmuştur. Bütün yavrularda bu işlem tamamlandıktan sonra en son anne kafese geri konulmuştur. Bu grup sıçanlar 'hafif stres grubu' olarak adlandırılmıştır

3. gruptaki sıçanlara postnatal 1-14. günlerde anneden 60 dakika süreyle ayrılmıştır. Her gün, sabah annenin yavruları beslemesinden hemen sonra yavrular kafesten çıkarılarak ayrı bir kafese konulmuştur. Altmış dakika boyunca yavrulardan ayrı bir kafeste bekletilmiştir. Bu süre zarfında odada bulunan ısıtıcı çalıştırılarak oda ısının 25-30°C arasında tutulmuş, 60 dakika bitince yavrular annenin bulunduğu kafese geri konulmuştur. Bu grup 'ağır stres grubu' olarak adlandırılmıştır

Dördüncü gruptaki sıçanlar da postnatal 1-14. günlerde daha önce bir çalışmada kullanılan ambivalan anne modeli geliştirilerek oluşturulmuş ambivalan anneye maruz kalmıştır (18). Bu düzenekte PN 1-14. günlerde, her gün, saat 10:00'da (sıçanlar gece siklusunda iken) önce gerçek anne kafesten çıkarılıp yerine "ambivalan anne" (AA) konulmuştur. AA, gebe sıçanların doğumuna 1 hafta kaladan itibaren ve sonrasında anne sıçanlarla birlikte kalmış, bu sürede üzerine annenin kokusunun, idrarının sindiği düşünülen, gerçek annenin aksine dokunma, yalama, emzirme



Şekil 1. Ambivalan anne grubunda kullanılan peluş sıçanlar

gibi anne işlevlerini yerine getiremeyen cansız, peluş bir nesnedir. Altmış dakikanın sonunda yavru sıçanlar “ambivalan anne” den ayrılıp, annelerini olduğu kafese geri konulmuştur. Şekil 1’de kullanılan peluş hayvan, anne ve yavru sıçanlar görülmektedir.

Yavruların gelişimleri dikkate alınarak postnatal 30. günde yavrular hem annelerinden ayrılmış hem de erkek ve dişi cinsiyetler birbirinden ayrılmıştır. Her kafese 3-4 adet aynı cinsiyetten sıçan konulmuştur. Her sıçana aynı bakım verilmiş haftada 1-2 defa talaş değişimi, üç günde bir yem-su değişimi dışında herhangi bir müdahalede bulunulmamıştır. Altmışıncı gün sıçanlar davranış deneylerinin yapılacağı merkeze götürülmüştür. Alışma ve gözlem süreci sonrası davranış deneyleri 67-79. günler arasında yapılmıştır.

Davranış Deney Bataryası

Deneyler loş ışık altında, 10:00-13:00 arasında yapılmıştır. Hayvanlar deney başlamadan yarım saat önce deney ortamına getirilerek, hayvanların ortama alışmaları sağlanmıştır. Çalışma takvimi ayrıntılı olarak Tablo 1’de gösterilmiştir.

Sosyal Etkileşim Testi

File ve Hyde tarafından 1978 yılında anksiyolitik ilaçların etkisini değerlendirmek amacıyla geliştirilmiş bir modeldir. Aynı zamanda azalmış sosyal etkileşim; Kay SR (1987) ve Sams-Dodd (1997) tarafından şizofrenide negatif semptomların potansiyel hayvan modeli olarak da gösterilmiştir. Sosyal etkileşim testi pek çok çalışmada çalışmanın yöntemine göre uyarlanmıştır. Daha önceki çalışmalarda yüksek ışık altında ve tanıdık olmayan bir ortamda sıçanların kaygı düzeyinin arttığı, plazma kortikosteron düzeylerinin yükseldiği gözlenmiştir. Bu nedenle de test başlamadan iki gün önce 4 dk/gün 100×100×50 cm boyutlarında açık alan kutusunda bırakılarak ortama alışması sağlanmıştır. Test başladığında birbirine yabancı, kilo farkları 15 g’dan daha fazla olmayan iki rat deney ortamına yerleştirilmiştir. On dakika boyunca davranışları kaydedilmiştir. Sosyal etkileşim verilerini değerlendirmek için veriler; aktif sosyal davranış (yakınlaşma, takip, koklama ve sosyal tımarlama, kaçma, sakınma, aşağı-yukarı tırmanma), aktivite (gezme ve inceleme) ve stresle ilişkili davranış (kendini tımarlama ve donma) şeklinde gruplandırılmıştır. Her test bitiminde alan %10 alkol ile temizlenmiştir. Sosyal etkileşim testi, sıçanlar 67 günlükken yapılmıştır.

Yükseltilmiş Artı Labirent Testi

Bu testin yapılandırılması ve test prosedürü Pellow ve File tarafından (1986) geliştirilmiştir. Bu aygıt, 50 cm yükseklikte, iki açık (50×10 cm),

iki kapalı (50×10 cm ve 38 cm yükseklikte duvarları olan) koldan oluşan ve farklı tiplerdeki kolların birbirlerinin karşısında bulunacak şekilde ayarlanmış olan, artı şeklinde pleksiglastan yapılmış bir platformdur. Sıçanlar, yüzü kapalı kollardan birine dönük olacak şekilde aygıtın tam ortasına yerleştirilmiş ve 5 dakika süreyle hayvanların davranışları izlenmiştir. Normalde deney hayvanı kendini kapalı kollarda daha güvenli hisseder ve zamanının çoğunu kapalı kol ya da kollarda geçirir. Anksiyolitik etkili ilaçların açık kollara giriş sayısını veya kollarda kalma süresini arttırdığı gösterilmiştir. Bu deneyde hayvanların kollara giriş sayısı, kollarda geçirdikleri süre ve kollarda kat ettikleri mesafe Webcam bağlı Video Tracking System ile izlenmiş ve kaydedilerek ve şu parametreler hesaplanmıştır:

Açık kola girme yüzdesi = (Açık kola girme sayısı / Toplam kollara girme sayısı)×100

Açık kolda geçirilen süre yüzdesi = (Açık kollarda geçirilen süre [saniye] / Kollarda geçirilen toplam süre [saniye])×100

Bu çalışmada yükseltilmiş artı labirent testi sıçanlar 72 günlükken yapılmıştır.

Yeni Nesne Tanıma Testi

Sıçanlarda görsel tanıma belleği ile ilgili hazırlanmış birçok model bulunmaktadır. Bu çalışmada ilk defa Ennaceur ve Delacour tarafından 1988 yılında tanımlanan test protokolü uygulanmıştır. Bu test için 100×100×50 cm boyutlarında, tabanı kendinden küçük karelere bölünmüş mat beyaz açık alan (*open field*) kutusu kullanılmıştır. Tahtadan yapılmış farklı renk ve şekillerde üçer kopyası bulunan nesneler kullanılmıştır. (A1, A2, A3, B1, B2, B3, C1, C2, C3). Bu nesneler sıçan tarafından hareket ettirilememesi amacıyla zemine takılıp çıkarılabilecek şekilde sabitlenmiştir. Yeni nesne tanıma testi 76-79. Günlerde yapılmıştır. Öncelikle her hayvan için 10’ar dakika süren iki seans şeklinde, ortama alıştırma testi yapılarak yeni bir ortama girmeye bağlı oluşabilecek kaygının önüne geçilmesi hedeflenmiştir. Son alışma seansından 24 saat sonra test başlatılmıştır. Tüm testler video kamerasına kaydedilmiştir. Önce kutunun içine A1 ve A2 (iki aynı nesne) nesneleri, birbirine yakın (yaklaşık 10 cm) uzaklıkta, iki komşu kenara denk gelecek şekilde yerleştirilmiştir (tanıma seansı). Daha sonra kutuya sıçan konulup 10 dakika kutuda tutulmuştur. Sonra sıçan çıkarılıp, nesnelerin her ikisi de çıkarıldıktan sonra yerlerine bir aynı nesne (A3) ve yeni bir nesne (B) konmuştur. (diğerleriyle aynı yere). Kısa süreli bellek için tanıma seansından 1 saat sonra sıçan tekrar kutuya konmuş ve 5 dk kutuda tutulmuştur. Bu arada her iki test durumunda da sıçan nesneleri inceleme için geçirdiği süreyi kaydedilmiştir. Nesneyi inceleme davranışı burnunu nesneye 2 cm kadar yaklaştırma ve nesneye dokunma olarak tanımlanır. Uzun süreli bellek için tanıma seansından 24 saat sonra aynı nesne (A4) ve yeni bir nesne (C) konarak (diğerleriyle aynı yere), sıçan 5 dakika kutuda tutulmuş ve nesnelerin incelenme davranışı kaydedilmiştir. Tanıma belleği iyi olan bir sıçanın yeni nesnelerle (B ve C) eski nesnelere göre (A3 ve A4) daha fazla zaman geçirmesi beklenmektedir.

Yeni Nesne Tanıma Belleği Testi ile sıçanların tanıdık nesne ile geçirdikleri zaman (TF), yeni nesne ile geçirdikleri zaman (TN) ve nesnelerle geçirdikleri toplam süre saniye cinsinden kaydedilmiştir. Bu veriler kullanılarak iki indeks hesaplanmıştır. Tanıma indeksi (*Recognition Index - RI*) hatırlamanın temel göstergesi olarak görülür ve yeni nesneyi inceleme süresinin toplam nesne inceleme süresine bölünmesi ile hesaplanır:

$$RI = TN / (TN + TF)$$

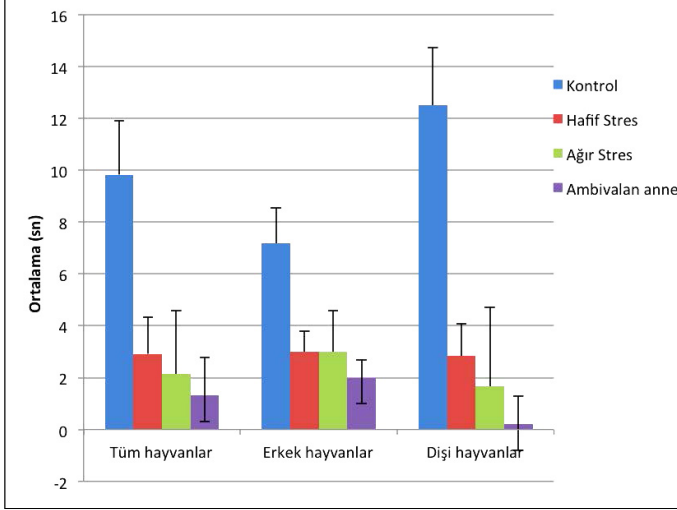
Diğer hesaplanan indeks Ayırma İndeksi (*Discrimination Index- DI*)’dir. Yeni ve tanıdık nesneleri ayırma becerisini gösterir. Bu değer +1 ile -1 arasında bir değerdir. Pozitif bir skor yeni nesne ile daha fazla vakit geçirildiğini, negatif bir skor tanıdık nesne ile daha fazla zaman geçirildiğini, sıfır değeri her iki nesneye de eşit zaman geçirildiğini gösterir. Bu indeks şu şekilde hesaplanır:

$$DI = (TN - TF) / (TN + TF)$$

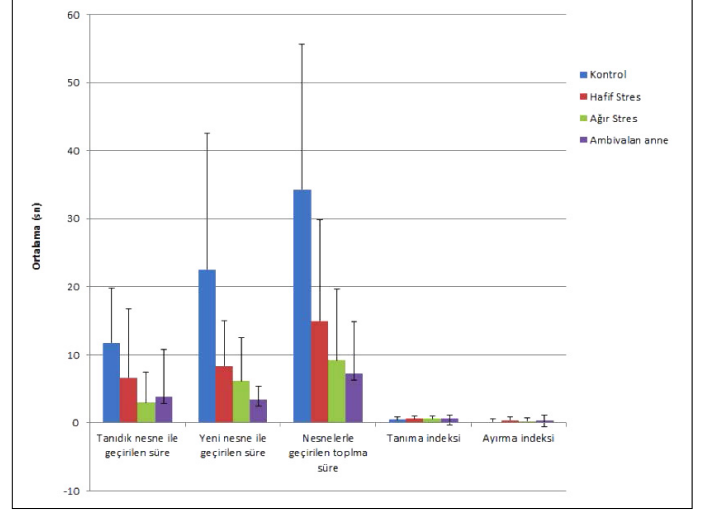
Hayvanların Öldürülmesi, Gövde Kanlarının Alınması ve Beyin Dokularının Çıkarılması

Yeni nesne tanıma belleği uzun bellek değerlendirme seansından 2 saat sonra Gazi Üniversitesi Deney Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezin'de hayvanlara letal dozda (30 mg/kg) tiyopental

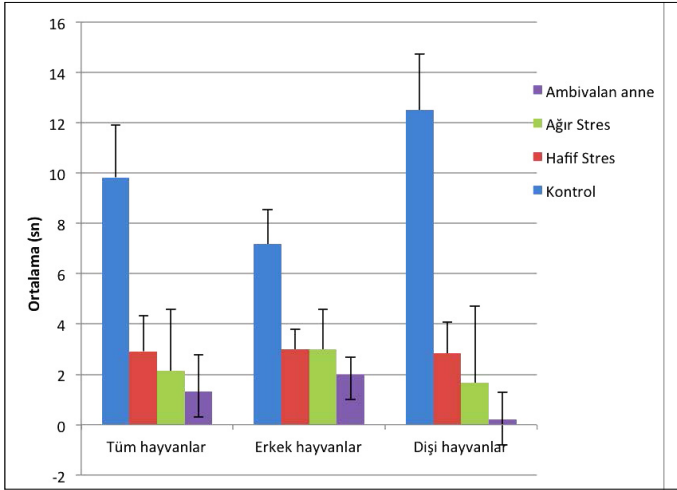
sodyum verildikten sonra kardiyak arresti takiben sıçanların beyin dokuları çıkarılmıştır. Prefrontal korteks ve hipokampus rat beyin atlasına uygun bir şekilde beyinden ayrılmıştır. Her bir doku örneği epandorflara kodlanarak yerleştirilmiş ve sıvı azottan geçirilerek Elisa analizine kadar -80°C'e yerleştirilmiştir.



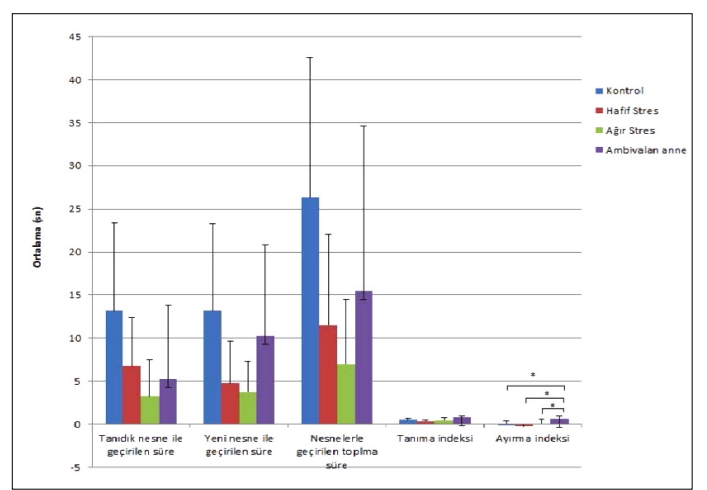
Grafik 1. Grupların açık kollara girme yüzdesi sonuçları



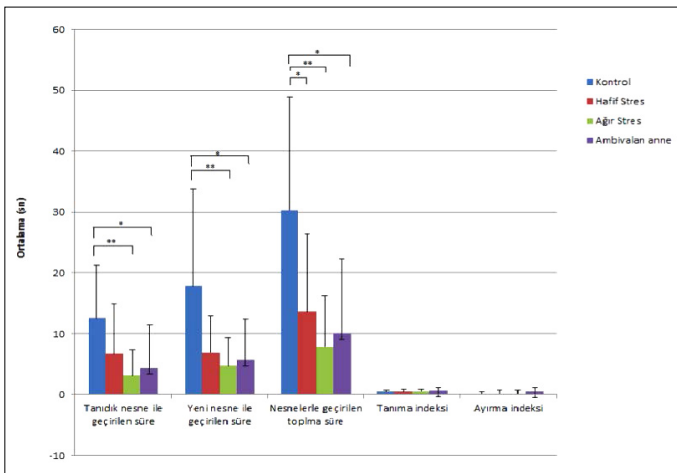
Grafik 4. Erkek hayvanların yeni nesne tanıma belleği - Kısa süreli bellek sonuçları



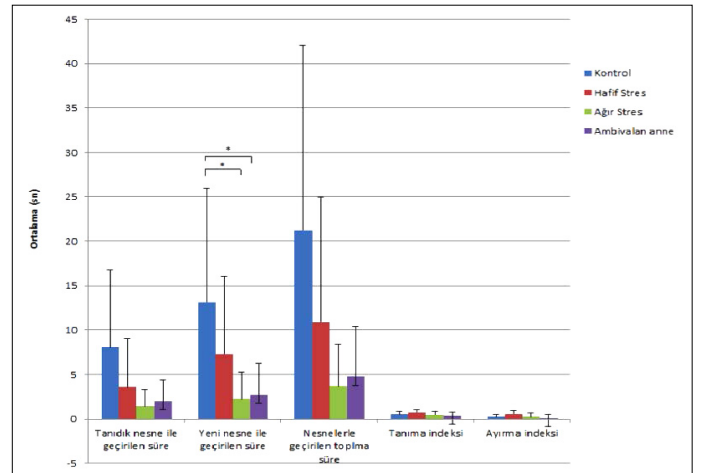
Grafik 2. Grupların açık kollarda vakit geçirme yüzdesi sonuçları



Grafik 5. Dişi hayvanların yeni nesne tanıma belleği - Kısa süreli bellek sonuçları (*p<0,05)



Grafik 3. Tüm grupların yeni nesne tanıma belleği - Kısa süreli bellek sonuçları (*p<0,05, **p<0,01)

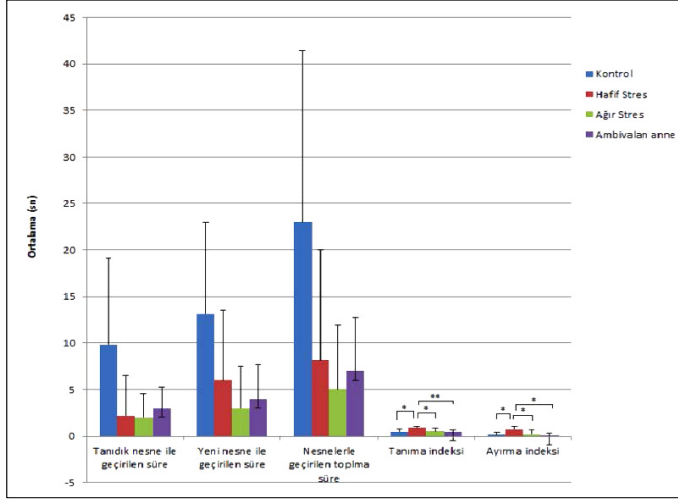


Grafik 6. Tüm hayvanların yeni nesne tanıma belleği - Uzun süreli bellek sonuçları (*p<0,05)

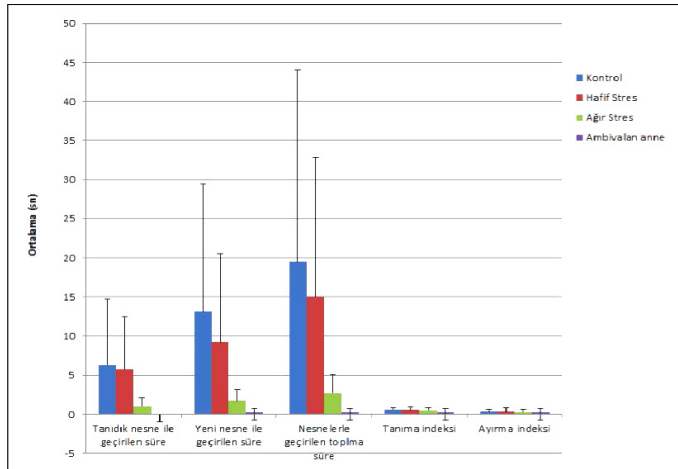
Elisa

Dokular homojenizasyon tamponunda homojenize edildikten sonra elde edilen homojenatlar 14000 g'de 30 dakika süreyle santrifüje edilmiştir. Oluşan NR2B analiz edildi. NR2B düzeyleri bir sandviç EIA (enzyme immunoassay) yöntemi ile hazır kit (NR2B, Eastbiopharm) kullanılarak ölçülmüştür. NR2B tahlil aralığı 0,5-10 ng/mL, duyarlılığı 0,02 ng/mL idi.

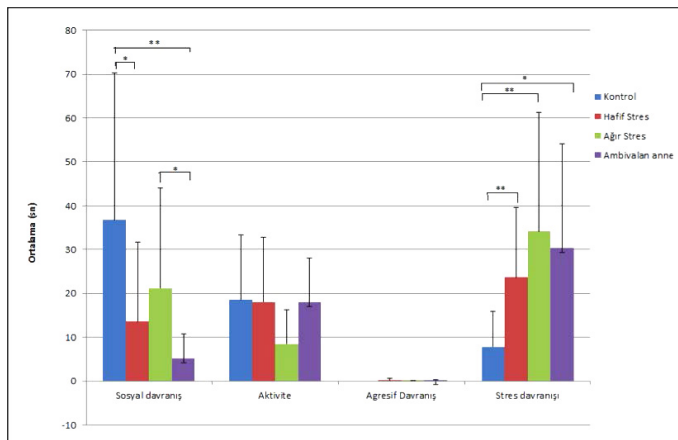
Gruplara göre deneyler süresince cinsiyet dağılımı ve siçan sayıları Tablo 1'de gösterilmiştir.



Grafik 7. Erkek hayvanların yeni nesne tanıma belleği - Uzun süreli bellek sonuçları (* $p<0,05$, ** $p<0,01$)



Grafik 8. Dişi hayvanların yeni nesne tanıma belleği - Uzun süreli bellek sonuçları



Grafik 9. Tüm hayvanların sosyal davranış performans sonuçları (* $p<0,05$, ** $p<0,01$)

İstatistik Analizler

İstatistik değerlendirmeler *Statistical Packages for the Social Sciences* (SPSS) 21.0 paket programı kullanılarak yapılmıştır. Tüm değerlendirmelerde non-parametrik testler kullanılmıştır. Gruplar arası karşılaştırma yaparken *Kruskal-Wallis* analiz, hangi grubun fark yarattığını anlamak için *Mann-Whitney U* analiz yöntemleri kullanılmıştır.

BULGULAR

Çalışmaya dâhil edilen hayvanların cinsiyet açısından karşılaştırmaları Tablo 2'de gösterilmiştir.

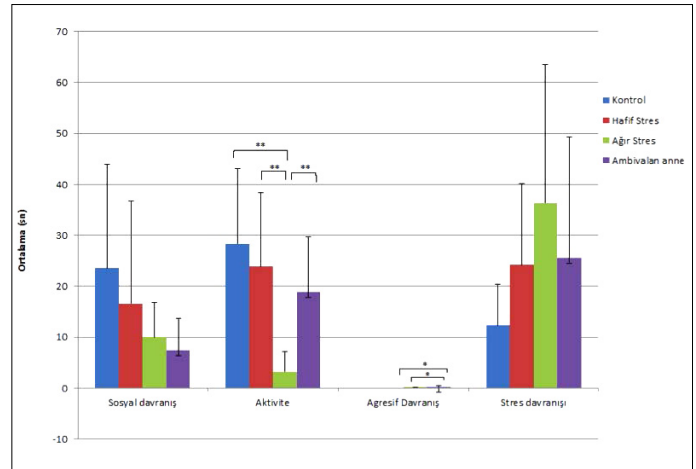
Yükseltilmiş Artı Labirent

Gruplar genel olarak ve cinsiyete göre Yükseltilmiş Artı Labirent'te göstermiş oldukları performansları karşılaştırılmış ve hem genel olarak hem de cinsiyetler bakımından Yükseltilmiş Artı Labirent'te göstermiş oldukları performanslar açısından gruplar arasında anlamlı bir fark olmadığı saptanmıştır.

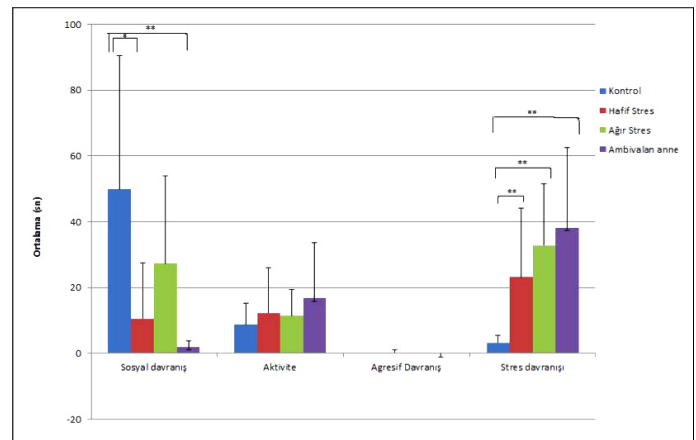
Yeni Nesne Tanıma Belleği Testi

Kısa süreli bellek

Cinsiyet ayırmadan yapılan değerlendirmede; kısa süreli bellek için yapılan testte grupların tanıdık nesne ($X^2=10,601$, $p<0,05$), yeni nesne ($X^2=9,044$, $p<0,05$) ile geçirdikleri süre ve her iki nesneyle geçirdikleri toplam süre ($X^2=10,619$, $p<0,05$) açısından gruplar arasında anlamlı bir fark olduğu saptanmıştır. Ayırma indeksi ($X^2=4,285$, $p=0,232$) ve Tanıma indeksi ($X^2=3,969$, $p=0,265$) açısından ise gruplar arasında fark olmadığı



Grafik 10. Erkek hayvanların sosyal davranış performans sonuçları (* $p<0,05$, ** $p<0,01$)



Grafik 11. Dişi hayvanların sosyal davranış performans sonuçları (* $p<0,05$, ** $p<0,01$)

Tablo 1. Çalışma Takvimi

	Kontrol Grubu	Hafif Stres Grubu	Ağır Stres Grubu	Ambivalan Anne Grubu
D1-14	Standart Bakım	MS15	MS60	Ambivalan Anne Yöntemi
D14-30	Standart Bakım			
D31	Annelerden ayırma, erkek/dişi sıçanların birbirinden ayırımı			
Cinsiyet Dağılımı	E: 6 D: 6	E: 6 D: 6	E: 9 D: 5	E: 5 D: 8
D32-60	Standart Bakım			
D61	Hayvanların Nörobilim Laboratuvarına getirilmesi			
D62-D64	Standart Bakım			
D65-D66	Sosyal Etkileşim Testi için günlük 5 dakikalık alıştırma			
D67	Sosyal Etkileşim Testi			
D68-71	Standart Bakım			
D72	Yükseltilmiş Artı Labirent			
D72-75	Standart Bakım			
D76-D77	Yeni Nesne Tanıma Testi için 10 dakikalık ortama alıştırma			
D78	Yeni Nesne Tanıma Testi - Kısa Süreli Bellek			
D79	Yeni Nesne Tanıma Testi - Uzun süreli Bellek, Beyin Dokularının Çıkarılması			

bulunmuştur. Tanıdık nesne ile geçirdikleri süre açısından ortaya çıkan farkın kaynağını anlamak için yapılan analiz sonucunda, kontrol grubundaki hayvanlar ($12,5 \pm 4,72$), MS60 ($3,15 \pm 4,16$, $Z = -2,872$, $p < 0,01$) ve ambivalan anne ($4,33 \pm 7,09$, $Z = -2,505$, $p < 0,05$) grubundaki hayvanlardan anlamlı olarak daha fazla tanıdık nesne ile zaman geçirmişlerdir. Yeni nesne ile geçirdikleri süre açısından ortaya çıkan farkın kaynağını anlamak için yapılan analiz sonucunda, kontrol grubundaki hayvanlar ($17,83 \pm 15,92$), ağır stres ($4,69 \pm 4,68$, $Z = -2,785$, $p < 0,01$) ve ambivalan anne ($5,67 \pm 6,65$, $Z = -2,401$, $p < 0,05$) grubundaki hayvanlardan anlamlı olarak daha fazla yeni nesne ile zaman geçirmişlerdir. Son olarak her iki nesneyle geçirdikleri toplam süre açısından bakıldığında, kontrol grubundaki hayvanların ($30,33 \pm 18,54$), hafif stres ($13,6 \pm 12,75$, $Z = -2,080$, $p < 0,05$), ağır stres ($7,85 \pm 8,38$, $Z = -2,942$, $p < 0,01$) ve ambivalan anne ($10 \pm 12,36$, $Z = -2,340$, $p < 0,05$) grubundaki hayvanlardan anlamlı olarak daha fazla her iki nesneyle ile zaman geçirdikleri saptanmıştır.

Erkek hayvanlar için yapılan değerlendirmede; gruplar arası tanıdık nesne ($X^2 = 3,838$, $p = 0,279$) ve yeni nesne ($X^2 = 6,233$, $p = 0,101$) ile geçirdikleri süre ile her iki nesneyle geçirdikleri toplam süre ($X^2 = 5,286$, $p = 0,152$), Ayırma İndeksi ($X^2 = 1,241$, $p = 0,43$) ve Tanıma İndeksi ($X^2 = 1,277$, $p = 0,735$) açısından anlamlı bir fark olmadığı bulunmuştur.

Dişi hayvanlar için yapılan analiz sonucunda, gruplar arasında Ayırma İndeksi ($X^2 = 8,307$, $p < 0,05$) açısından anlamlı bir fark varken, tanıdık nesne ($X^2 = 6,791$, $p = 0,079$) ve yeni nesne ($X^2 = 5,651$, $p = 0,130$) ile geçirdikleri süre ile her iki nesneyle geçirdikleri toplam süre ($X^2 = 5,601$, $p = 0,133$) ve Tanıma İndeksi ($X^2 = 7,125$, $p = 0,068$) açısından anlamlı bir fark yoktur. Ayırma İndeksi açısından ortaya çıkan farkın kaynağını anlamak için yapılan *Mann-Whitney U* analizi sonucunda; ambivalan anne grubundaki dişi hayvanlar ($0,59 \pm 0,34$), kontrol ($-0,03 \pm 0,37$, $Z = -2,132$, $p < 0,05$), hafif stres ($-0,24 \pm 0,22$, $Z = -2,309$, $p < 0,05$) ve ağır stres ($0,1 \pm 0,43$, $Z = -1,970$, $p < 0,05$) grubundaki dişi hayvanlardan anlamlı olarak daha fazla puan almıştır.

Uzun süreli bellek

Cinsiyet ayrımı olmaksızın yapılan değerlendirmede; uzun süreli bellek için yapılan testte gruplar arasında yeni nesne ($X^2 = 8,710$, $p < 0,05$) ile geçirdikleri süre açısından anlamlı bir fark olduğu bulunmuştur. Tanıdık nesne ($X^2 = 5,759$, $p = 0,124$) ve her iki nesneyle geçirdikleri toplam süre ($X^2 = 7,655$, $p = 0,054$), Ayırma İndeksi ($X^2 = 7,216$, $p = 0,065$), Tanıma İndeksi ($X^2 = 6,819$, $p = 0,078$) açısından ise gruplar arasında anlamlı bir fark olmadığı saptanmıştır. Yeni nesne ile geçirdikleri süre açısından ortaya çıkan farkın kaynağını anlamak için yapılan analiz sonucunda, kontrol grubundaki hayvanlar ($13,17 \pm 12,78$), ağır stres ($2,25 \pm 3,02$, $Z = -2,501$, $p < 0,05$) ve ambivalan anne ($2,75 \pm 3,47$, $Z = -2,243$, $p < 0,05$) grubundaki hayvanlardan daha fazla yeni nesne ile zaman geçirdikleri tespit edilmiştir.

Erkek hayvanlar için yapılan analiz sonucunda, gruplar arasında Ayırma İndeksi ($X^2 = 8,220$, $p < 0,05$) ve Tanıma İndeksi ($X^2 = 8,666$, $p < 0,05$) açısından anlamlı bir fark varken, tanıdık nesne ($X^2 = 5,589$, $p = 0,133$), yeni nesne ($X^2 = 4,529$, $p = 0,210$) ile geçirdikleri süre ve her iki nesneyle geçirdikleri toplam süre ($X^2 = 4,713$, $p = 0,194$) açısından gruplar arasında anlamlı bir fark yoktur. Ayırma İndeksi açısından ortaya çıkan farkın kaynağını anlamak için yapılan *Mann-Whitney U* analizi sonucunda; hafif stres grubundaki erkek hayvanlar ($0,73 \pm 0,33$), kontrol ($0,17 \pm 0,24$, $Z = -2,262$, $p < 0,05$), MS60 ($0,22 \pm 0,47$, $Z = -1,967$, $p < 0,05$) ve ambivalan anne ($0,07 \pm 0,25$, $Z = -2,560$, $p < 0,05$) grubundaki erkek hayvanlardan anlamlı olarak daha fazla puan aldığı saptanmıştır. Benzer şekilde, Tanıma İndeksi açısından da, hafif stres grubundaki erkek hayvanlar ($0,87 \pm 0,16$), kontrol ($0,5 \pm 0,27$, $Z = -2,262$, $p < 0,05$), ağır stres ($0,51 \pm 0,36$, $Z = -1,967$, $p < 0,05$) ve ambivalan anne ($0,48 \pm 0,23$, $Z = -2,786$, $p < 0,01$) grubundaki erkek hayvanlardan anlamlı olarak daha fazla puan almıştır.

Dişi hayvanlar için yapılan değerlendirmede; tanıdık nesne ($X^2 = 5,954$, $p = 0,114$) ve yeni nesne ($X^2 = 6,624$, $p = 0,085$) ile geçirdikleri süre ve her iki nesneyle geçirdikleri toplam süre ($X^2 = 6,669$, $p = 0,083$), Ayırma İndeksi ($X^2 = 1,092$, $p = 0,779$) ve Tanıma İndeksi ($X^2 = 1,688$, $p = 0,640$) açısından gruplar arasında anlamlı bir fark olmadığı bulunmuştur.

Tablo 2. Gruplar arası cinsiyet karşılaştırılması

Değişkenler	Gruplar (N/Sütun yüzdesi)				X ²	P
Cinsiyet	Kontrol	Hafif stres	Ağır stres	Ambivalan anne		
Erkek	6 (50)	6 (50)	5 (35,7)	8 (61,5)	1,816	0,611
Dişi	6 (50)	6 (50)	9 (64,3)	5 (38,5)		

Gruplar arasında cinsiyet dağılımı açısından anlamlı bir fark olmadığı bulunmuştur ($X^2 = 1,816$, $p = 0,611$).

Tablo 3. Grupların NMDAR2B protein düzeyleri için yapılan ELISA test sonuçlarının karşılaştırılması (ng/mL)

Değişkenler	Gruplar (Ortalama ± Standard hata)				X ²	p
	Kontrol	Hafif stres	Ağır stres	Ambivalan anne		
Prefrontal korteks	1,61±0,5	1,9±0,49	1,62±0,44	1,89±0,47	4,219	0,239
Hipokampus	1,88±0,42	4,65±1,71	3,36±1,08	4,57±1,41	31,416*	0,000

*p<0,001

Tablo 4. Erkek grupların NMDAR2B protein düzeyleri için yapılan ELISA test sonuçları

Değişkenler	Gruplar (Ortalama ± Standard hata)				X ²	p
	Kontrol	Hafif stres	Ağır stres	Ambivalan anne		
Prefrontal korteks	1,5±0,51	1,84±0,56	1,79±0,54	1,81±0,5	1,429	0,699
Hipokampus	1,8±0,45	4,68±1,71	2,99±0,58	5,07±1,3	18,986*	0,000

*p<0,001

Sosyal Etkileşim Testi

Cinsiyet ayrımı olmadan yapılan sosyal davranış performansı değerlendirmesinde; sosyal davranış ($X^2=12,505$, $p<0,01$) ve stres davranışı ($X^2=13,508$, $p<0,01$) açısından gruplar arasında anlamlı bir fark olduğu bulunmuştur. Aktivite ($X^2=6,634$, $p=0,085$) ve agresif davranış ($X^2=6,936$, $p=0,074$), açısından ise gruplar arasında anlamlı bir fark olmadığı bulunmuştur. Sosyal davranış açısından ortaya çıkan farkın kaynağını anlamak için yapılan analiz sonucunda, hafif stres grubundaki hayvanlar ($13,56\pm18,08$), kontrol ($36,75\pm33,56$, $Z=-2,310$, $p<0,05$); ambivalan anne grubundaki hayvanlar ise ($5,14\pm5,56$) hem kontrol ($36,75\pm33,56$, $Z=-3,466$, $p<0,01$) hem de ağır stres ($21,19\pm22,90$, $Z=-2,034$, $p<0,05$) grubundaki hayvanlardan anlamlı olarak daha az sosyal davranış performansı göstermişlerdir. Kontrol grubundaki hayvanlar ($7,75\pm8,18$), hafif stres ($23,68\pm16$, $Z=-3,176$, $p<0,01$), ağır stres ($34,12\pm27,08$, $Z=-3,292$, $p<0,01$) ve ambivalan anne ($30,38\pm23,78$, $Z=-2,369$, $p<0,05$) gruplarındaki hayvanlardan anlamlı olarak daha az stres davranış performansı gösterdikleri gözlenmiştir.

Erkek hayvanlar için yapılan analiz sonucunda, sosyal davranış ($X^2=2,967$, $p=0,397$) ve stres davranışı ($X^2=2,264$, $p=0,519$) performansları açısından gruplar arasında anlamlı bir fark yokken, aktivite ($X^2=11,986$, $p<0,01$) ve agresif davranış ($X^2=11,079$, $p<0,05$) açısından gruplar arasında anlamlı bir fark olduğu görülmüştür. Aktivite açısından ortaya çıkan farkın kaynağını anlamak için yapılan analiz sonucunda, ağır stres grubundaki erkek hayvanlar ($3,23\pm3,97$), kontrol ($28,33\pm14,7$, $Z=-2,745$, $p<0,01$), hafif stres ($23,89\pm14,46$, $Z=-2,745$, $p<0,01$) ve ambivalan anne ($18,79\pm10,83$, $Z=-2,684$, $p<0,01$) grubundaki erkek hayvanlardan anlamlı olarak daha az aktivite performansı göstermişlerdir. Ambivalan anne grubundaki erkek hayvanlar ($0,24\pm0,23$), kontrol (0 ± 0 , $Z=-2,102$, $p<0,05$) MS15 (0 ± 0 , $Z=-2,102$, $p<0,05$) grubundaki erkek hayvanlardan anlamlı olarak daha fazla agresif davranış performansı göstermişlerdir.

Dişi hayvanlar için yapılan değerlendirmede; sosyal ($X^2=9,370$, $p<0,05$) ve stresli davranış ($X^2=14,818$, $p<0,01$) performansları bakımından

gruplar arasında anlamlı bir fark olduğu bulunmuştur. Aktivite ($X^2=1,963$, $p=0,580$) ve agresif davranış ($X^2=1,739$, $p=0,628$) bakımından gruplar arasında anlamlı bir fark olmadığı saptanmıştır. Ortaya çıkan farkın kaynağını anlamak için yapılan analiz sonucunda kontrol grubundaki dişi hayvanların ($49,94\pm40,59$), hafif stres ($10,53\pm17,07$, $Z=-2,085$, $p<0,05$) ve ambivalan anne ($2\pm1,84$, $Z=-2,739$, $p<0,01$) grubundaki dişi hayvanlardan anlamlı olarak daha fazla sosyal davranış sergiledikleri saptanmıştır. Stres davranışı performansı açısından değerlendirildiğinde kontrol grubundaki dişi hayvanlar ($3,22\pm2,34$), hafif stres ($23,17\pm21,13$, $Z=-2,882$, $p<0,01$), ağır stres ($32,89\pm18,53$, $Z=-3,182$, $p<0,01$) ve ambivalan anne ($38,23\pm24,24$, $Z=-2,739$, $p<0,01$) gruplarındaki dişi hayvanlardan anlamlı olarak daha az stres davranış performansı sergiledikleri gözlenmiştir.

ELISA

Sıçanların prefrontal korteks ve hipokampuslarından elde edilen NR2B proteini düzeylerinin ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) yöntemi ile analizinin tüm gruplar için sonuçları Tablo 3'te verilmektedir. Bu sonuçlara göre, hafif stres, ağır stres ve ambivalan anne gruplarının, kontrol grubuna göre; ambivalan anne grubunun ise ağır stres grubuna göre hipokampus beyin bölgesinde anlamlı olarak daha yüksek NR2B düzeyi saptanmıştır ($X^2=31,416$, $p<0,001$).

Erkek hayvanların prefrontal korteks ve hipokampuslarından elde edilen NR2B proteini düzeylerinin ELISA yöntemi ile analizinin sonuçları Tablo 4'de verilmektedir. Bu sonuçlara göre hafif stres, ağır stres ve ambivalan anne gruplarının, kontrol grubuna göre; ambivalan anne grubunun ise ağır stres grubuna göre hipokampus beyin bölgesinde anlamlı olarak daha yüksek NR2B düzeyi saptanmıştır ($X^2=18,986$, $p<0,001$).

Son olarak, dişi hayvanların prefrontal korteks ve hipokampuslarından elde edilen NR2B proteini düzeylerinin ELISA yöntemi ile analizinin sonuçları Tablo 5'te verilmektedir. Bu sonuçlara göre ağır stres grubundaki dişi sıçanların; hem hafif stres grubundaki, hem de ambivalan anne

Tablo 5. Dişi grupların NMDAR2B protein düzeyleri için yapılan ELISA test sonuçları

Değişkenler	Gruplar (Ortalama ± Standard hata)				X ²	p
	Kontrol	Hafif stres	Ağır stres	Ambivalan anne		
Prefrontal korteks	1,73±0,49	2,05±0,29	1,48±0,31	2,12±0,28	7,869*	0,049
Hipokampus	1,97±0,39	4,62±1,96	3,61±1,32	3,45±0,99	12,503**	0,006

*p<0,05, **p<0,01

grubundaki dişi hayvanlara göre prefrontal korteks beyin bölgesinde anlamlı olarak daha düşük NR2B düzeyi saptanmıştır ($X^2=7,869$, $p<0,05$). Hafif stres, ağır stres ve ambivalan anne gruplarının ise kontrol grubuna göre hipokampus beyin bölgesinde anlamlı olarak NR2B düzeyinin daha yüksek olduğu saptanmıştır. ($X^2=12,503$, $p<0,01$).

TARTIŞMA

Çevresel şartlar; beyin gelişimi, nöroplastisite ve davranış üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Yaşamın erken döneminde çeşitli stresörlere maruziyet, yaşamın her döneminde ortaya çıkabilecek mental hastalıklar için artmış bir risk nedenidir. Erken dönemde yeni doğan yavruyu anneden ayırmak, sıçanlarla yapılan çalışmalarda en çok kullanılan müdahale yöntemidir. Bu çalışmanın birincil amacı insanlarda anne-bebek etkileşimi ve bağlanma sürecini olumsuz etkilediği bilinen ambivalan annenin karşılığı olarak sıçanlarda bir müdahale modeli oluşturmaktır. Çalışmanın ikincil amacı ise yavrularının yanında olmasına rağmen zaman zaman bakım vermeyen, beslemeyen bu anne ile büyüyen sıçanların erişkin dönemde anneden ayrı kalan sıçanlardan davranışsal farklılıkları olup olmadığını araştırmaktır. Bu bağlamda oluşturulan manipülasyonun stres yanıtı, öğrenme/bellek, sosyal etkileşim tipi ve NMDA reseptör alt tipi olan NR2B'nin hipokampus ve prefrontal kortekste ifadesi üzerine etkisini inceledik.

Anksiyete benzeri davranışların değerlendirilmesi amacıyla, pratikte en çok kullanılan davranış testi olan yükseltilmiş artı labirent testi kullanıldı. Pek çok çalışma anneden ayrı kalan sıçanların, anne bakımının kısıtlanması nedeniyle daha anksiyöz davranışlar sergilediği bu nedenle de yükseltilmiş artı labirentin açık kollarında daha az zaman geçirdiğini göstermiştir (19). Ambivalan anne grubu sıçanlarının ve anneden ayrı kalan sıçanların anksiyete davranış sergilediğini destekler şekilde açık kollarında kontrol grubuna kıyasla daha az vakit geçirmesi beklenirken; veriler kapalı ve açık kollarında vakit geçirme süreleri değerlendirildiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı yönündeydi. Fakat postpartum erken dönem anneden ayrılan sıçanlarla yapılan bazı çalışmalarda da, günlük anneden ayrı kalma süresi daha uzun bile olsa anneden ayrı kalan sıçanların yükseltilmiş artı labirent performanslarının bu çalışmada olduğu gibi kontrol grubu sıçanlarından farklı olmadığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır (20).

Literatürde erken dönem olumsuz yaşam olaylarının yeni nesne tanıma testindeki performans üzerine etkisine yönelik farklı veriler bulunmaktadır. Yeni nesneyi ayırt etme olarak ölçülen bilişsel fonksiyon, anneden ayrı kalan sıçanlarda etkilenmemiş veya bozulmuş olarak gösterilmiştir (21).

Bizim verilerimiz de anneden ayırmanın, cinsiyet ayırt etmeksizin değerlendirildiğinde tanıma belleğini etkilemediği fikrini desteklemektedir. Ancak anneden ayrı kalma süresinin görece daha kısa olması (1 saat) belleğin etkilenmemesine sebep olmuş olabilir. Çünkü literatürde anneden ayrı kalma süresi daha da uzun olduğunda (3 saat) tanıma belleğinin bozulduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır (22). Bununla birlikte cinsiyetler ayrı değerlendirildiğinde gruplar arası tanıma belleği performansında farklılıklar olduğu da gösterilmiştir. Kısa süreli tanıma belleği değerlendirmesinde ambivalan anne grubu dişilerinin yeni nesneyi, tanıdık nesneden daha iyi ayırt edebildiği, hafif stres grubu erkek sıçanlarının ise uzun süreli tanıma belleği değerlendirmesinde diğer grup sıçanlara göre yeni nesneyi tanıma ve ayırt etme performansının daha iyi olduğu bulunmuştur.

Erken dönem müdahalelerin erişkin dönemde sıçanların sosyal etkileşim üzerine etkisini değerlendirmek amacıyla sosyal etkileşim testi yapıldı. Bu davranış deneyinde sıçanların performansları (sosyal davranış, stresle ilişkili davranış ve agresyon olmak üzere üç farklı davranış tipi) ve ayrıca cinsiyetin performanslar üzerine etkisi değerlendirildi. Sosyal etkileşim testi cinsiyet ayrımı yapılmaksızın değerlendirildiğinde; hafif

stres grubundaki hayvanların kontrol grubuna kıyasla, ambivalan anne grubundaki hayvanların da kontrol grubu ve ağır stres grubuna göre daha az sosyal davranış performansı sergilediği saptandı. Ayrıca manipülasyon gruplarının tamamı kontrol grubuna göre daha fazla stresli davranışta bulunduğu gösterildi. Tek başına erkek sıçanlar kıyaslandığında ise ağır stres grubundaki hayvanların, diğer gruplara göre daha az aktivite sergilediği bulundu. Ambivalan anne grubundaki hayvanlar kontrol ve hafif stres grubundaki hayvanlara kıyasla daha agresifken, ağır stres grubundan agresif davranış sergileme bakımından farklı değildi. Dişi sıçanlar grupları arasında sosyal etkileşim testi performansı bakımından kıyaslandığında, kontrol grubu dişilerinin hafif stres ve ambivalan anne grubu dişilerinden daha fazla sosyal davranış sergilerken, ağır stres grubu ile fark saptanmamıştır. Yine kontrol grubundaki dişiler, müdahale gruplarındaki dişilere kıyasla daha az stresle ilişkili davranış sergilediği saptanmıştır. Daha önce yapılan çalışmalar da gösteriyor ki strese neden olabilecek manipülasyonlara maruz kalmak sosyal etkileşim testi performanslarını azaltırken (23) çevresel zenginleştirme ile yapılan müdahaleler kemirgenlerde agonistik sosyal etkileşimin azalmasına, artmış agresyona ve yeni nesne tanıma testinde tanıma belleği fonksiyonunda artışa neden olmaktadır (24). Davranış deney verileri değerlendirildiğinde ambivalan anne modelinde kullanılan peluş sıçan, kafes ortamında bir zenginleştirici obje olmuş olabilir. Bu zenginleştirici nesneye maruziyet, dişi ve erkek sıçanlarda farklı davranışsal etkilere neden olmuş olabilir.

Çalışmalar NR2B alt birimleri erişkin serebral kortikal ve hipokampal uyarıcı nöronlarda seçici olarak eksprese edildiğini ve seksüel olgunluk ve yaşlanmanın başlangıcı ile de ekspresyonun ön beyin bölgesinde azaldığını göstermektedir (25). Bu, bazı öğrenme ve hafıza fonksiyon biçimlerinin, bir hayvan üreme aşamasına girdiğinde ilk önce düşüş belirtileri göstermeye başladığı genel görüşü ile tutarlı görünmektedir. Bu nedenle NR2B, NMDA reseptörünün tesadüf tespit özelliklerini manipüle etmek için idealdir (26).

Ön beyindeki NR2B ekspresyonundaki artış, erişkin beyindeki öğrenme ve bellek işlevini geliştirir (27). Ayrıca daha kaygılı sıçanlarda, duygusal davranış kontrol eden NR2B alt ünitesinin frontal korteks ve limbik yapılarda ifadesinin arttığı gösterilmiştir (28). Bu çalışmada ise NMDA reseptör alt tipi olan NR2B düzeyleri incelendiğinde hafif stres ve ambivalan anne grubu dişilerinin NR2B düzeylerinin ağır stres grubuna göre daha fazla olduğu, gruplar genel olarak değerlendirildiğinde tüm manipülasyon gruplarında kontrol grubuna kıyasla, NR2B düzeyinin hipokampus beyin bölgesinde anlamlı olarak daha yüksek olduğu, prefrontal korteks NR2B düzeylerinin ise gruplar arası farklılık göstermediği saptanmıştır. Literatürdeki çalışmalar incelendiğinde NR2B alt ünitesinin, erken dönem anneden ayırmaya maruziyet sonrasında erişkin dönemde prefrontal korteks ve hipokampusteki düzeylerindeki değişimi ile ilgili sonuçlar tutarsızdır. Prefrontal korteks ve hipokampüste NR2B ifadesinin arttığını veya (29), prefrontal korteks düzeyi değişmezken sadece hipokampüste arttığını gösteren çalışmalar vardır (12). Çevresel zenginleştirmeye maruziyet sonrası erişkin dönemde NR2B alt ünitesinin hipokampüste ifadesi erkeklerde artarken, dişilerde azaldığını gösteren bir çalışma bulunmakla birlikte erken dönem çevresel zenginleştirmeye maruziyetin erişkin dönemde NR2B ekspresyonuna etkisine yönelik çalışma sayısı ise kısıtlıdır (30). Bu çalışma erken dönem müdahalelerin özellikle hipokampus NR2B düzeyinin artmasına neden olduğunu destekleyerek kısıtlı literatüre katkıda bulunmaktadır.

SONUÇ

Ambivalan anne modeli oluşturmak amacıyla, sıçanlar anneden ayrıldıktan sonra annenin boyutlarında, peluş bir oyuncak sıçan konmuştu. Bundaki amaç, yaşamın erken döneminde ortamda olmasına rağmen bakım gösterme davranış sergilemeyen anneye maruz kalan sıçanların, en az anneden ayrı kalan sıçanlar kadar herhangi müdahalede

bulunulmayan sıçanlara kıyasla emosyonel, bilişsel ve sosyal iletişim bakımından farklılık göstereceğiydi. Veriler değerlendirildiğinde beklenenin aksine peluş oyuncak varlığı çevresel zenginleştirme müdahalesi olabilir. Ayrıca anneden ayırma süresinin –olabilecek en kısa– uzun süreli anneden ayırma süresi olması, etik kurul ilkeleri nedeniyle kısıtlı sayıda anneden elde edilen yine az sayıda hem dişi ve hem de erkek sıçanların çalışmaya dâhil edilmesi, çalışma sonuçlarını yorumlamayı zorlaştırmaktadır. Etik ilkeleri nedeniyle daha çok sayıda sıçan ile çalışma tekrarlanamayacağından tek cinsiyetli grupların oluşturularak, anneden ayrı kalma süresi uzatılarak tasarlanan çalışmalar ile sonuçların geçerliliği ve güvenilirliği artacaktır.

Etik Komite Onayı: Bu çalışma, Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığı GÜ-ET-14069 sayılı kararıyla etik kurul onayı almıştır.

Hakem Değerlendirmesi: Dış Bağımsız.

Yazar Katkıları: Fikir - MK, AD, SC; Tasarım - MK, AD, SC, HBB; Denetleme - MK; Kaynaklar - ÖG, HBB; Malzemeler- MK, ÖG; Veri Toplanması ve/veya İşlemesi - MK, AB, EA; Analiz ve/veya Yorum - MK; Literatür Taraması - MK; Yazıyı Yazan - MK; Eleştirel İnceleme - AD, SC, HBB.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Finansal Destek: Bu çalışma Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi 01/2015-09 proje numarasıyla desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

- Heim C, Binder EB. Current research trends in early life stress and depression: Review of human studies on sensitive periods, gene-environment interactions, and epigenetics. *Exp Neurol* 2012;233:102-111. [CrossRef]
- Loman MM, Gunnar MR. Early experience and the development of stress reactivity and regulation in children. *Neurosci Biobehav Rev* 2010;34:867-876. [CrossRef]
- Hofer MA. Hidden Regulators in Attachment, Separation, and Loss. *Monogr Soc Res Child Dev* 1994;59(2-3):192-207. [CrossRef]
- Cirulli F, Alleve E, Antonelli A, Aloe L. NGF expression in the developing rat brain: Effects of maternal separation. *Dev Brain Res* 2000;123:129-134. [CrossRef]
- Rosenfeld P, Suchecki D, Levine S. Multifactorial regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis during development. *Neurosci Biobehav Rev* 1992;16:553-568. [CrossRef]
- Tractenberg SG, Levandowski ML, De Azeredo LA, Orso R, Roithmann LG, Hoffmann ES, Brenhouse H, Oliveira RG. An overview of maternal separation effects on behavioural outcomes in mice: evidence from a four-stage methodological systematic review. *Neurosci Biobehav Rev* 2016;68:489-503. [CrossRef]
- Macri S, Chiarotti F, Würbel H. Maternal separation and maternal care act independently on the development of HPA responses in male rats. *Behav Brain Res* 2008;191:227-234. [CrossRef]
- Azevedo MSD, Souza FLD, Donadio MVF, Lucion AB, Giovenardi M. Interventions in the neonatal environment in rats and their relationship to behavior in adulthood and maternal behavior. *Psychol Neurosci* 2010;3:73-78. [CrossRef]
- Goebel DJ, Poosch MS. NMDA receptor subunit gene expression in the rat brain: A quantitative analysis of endogenous mRNA levels of NR1(Com), NR2A, NR2B, NR2C, NR2D and NR3A. *Mol Brain Res* 1999;69:164-170. [CrossRef]
- Faure J, Uys JDK, Marais L, Stein DJ, Daniels WMU. Early maternal separation alters the response to traumatization: Resulting in increased levels of hippocampal neurotrophic factors. *Metab Brain Dis* 2007;22:183-195. [CrossRef]
- Jacobs SA, Tsien JZ. Genetic overexpression of NR2B subunit enhances social recognition memory for different strains and species. *PLoS One* 2012;7. [CrossRef]
- Levine S. Infantile experience and resistance to physiological stress. *Science* 1957;126:405. [CrossRef]
- 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;1099:101-108. [CrossRef]
- Levine ES, Kolb JE. Brain-derived neurotrophic factor increases activity of NR2B-containing N-methyl-D-aspartate receptors in excised patches from hippocampal neurons. *J Neurosci Res* 2000;62:357-362. [CrossRef]
- Fernández-Teruel A, Escorihuela RM, Castellano B, González B, Tobeña A. Neonatal handling and environmental enrichment effects on emotionality, novelty/reward seeking, and age-related cognitive and hippocampal impairments: Focus on the roman rat lines. *Behav Genet* 1997;27:513-526. [CrossRef]
- Todeschin AS, Winkelman-Duarte EC, Jacob MHV, Fernandes MC, Ribeiro MFM, Sanvito GL, Lucion AB. Effects of neonatal handling on social memory, social interaction, and number of oxytocin and vasopressin neurons in rats. *Horm Behav* 2009;56:93-100. [CrossRef]
- Aisa B, Elizalde N, Tordera R, Lasheras B, Del Río J, Ramírez MJ. Effects of neonatal stress on markers of synaptic plasticity in the hippocampus: Implications for spatial memory. *Hippocampus* 2009;19:1222-1231. [CrossRef]
- Dönmez RA, Candansayar S, Derinöz O, Gülbahar Ö, Bolay H. Adulthood behavioral and neurodevelopmental effects of being raised by an ambivalent mother in rats: What does not kill you makes you stronger. *Turkish J Med Sci* 2016;46:1546-1560. [CrossRef]
- Boccia ML, Razzoli M, Prasad Vadlamudi S, Trumbull W, Caleffie C, Pedersen CA. Repeated long separations from pups produce depression-like behavior in rat mothers. *Psychoneuroendocrinology* 2007;32:65-71. [CrossRef]
- Aguggia JP, Suárez MM, Rivarola MA. Early maternal separation: Neurobehavioral consequences in mother rats. *Behav Brain Res* 2013;248:25-31. [CrossRef]
- Aisa B, Tordera R, Lasheras B, Del Río J, Ramírez MJ. Effects of maternal separation on hypothalamic-pituitary-adrenal responses, cognition and vulnerability to stress in adult female rats. *Neuroscience* 2008;154:1218-1226. [CrossRef]
- Aisa B, Tordera R, Lasheras B, Del Río J, Ramírez MJ. Cognitive impairment associated to HPA axis hyperactivity after maternal separation in rats. *Psychoneuroendocrinology* 2007;32:256-266. [CrossRef]
- Haller J, Bakos N. Stress-induced social avoidance: a new model of stress-induced anxiety? *Physiol Behav* 2002;77:327-332. [CrossRef]
- Mesa-Gresa P, Pérez-Martínez A, Redolat R. Environmental enrichment improves novel object recognition and enhances agonistic behavior in male mice. *Aggress Behav* 2013;39:269-279. [CrossRef]
- Sheng M, Cummings J, Roldan LA, Jan YN, Jan LY. Changing subunit composition of heteromeric NMDA receptors during development of rat cortex. *Nature* 1994;368:144-147. [CrossRef]
- Tang YP, Wang H, Feng R, Kyin M, Tsien JZ. Differential effects of enrichment on learning and memory function in NR2B transgenic mice. *Neuropharmacology* 2001;41:779-790. [CrossRef]
- Cao X, Cui Z, Feng R, Tang YP, Qin Z, Mei B, Tsien JZ. Maintenance of superior learning and memory function in NR2B transgenic mice during ageing. *Eur J Neurosci* 2007;25:1815-1822. [CrossRef]
- Lehner M, Wislowska-Stanek A, Skorzevska A, Maciejak P, Szyndler J, Turzynska D, Sobolewska A, Krzascik P, Plaznik A. Expression of N-methyl-D-aspartate (R)(GluN2B)- subunits in the brain structures of rats selected for low and high anxiety. *J Physiol Pharmacol* 2011;62:473-482. http://www.jpp.krakow.pl/journal/archive/08_11/pdf/473_08_11_article.pdf
- Liu C, Hao S, Zhu M, Wang Y, Zhang T, Yang Z. Maternal Separation Induces Different Autophagic Responses in the Hippocampus and Prefrontal Cortex of Adult Rats. *Neuroscience* 2018;374:287-294. [CrossRef]
- Kokras N, Sotiropoulos I, Besinis D, Tzouveka EL, Almeida OFX, Sousa N, Dalla C. Neuroplasticity-related correlates of environmental enrichment combined with physical activity differ between the sexes. *Eur Neuropsychopharmacol* 2019;29:1-15. [CrossRef]