

## Koşullu Çevre İtinmesinde Yüksek Doz D-Cycloserine'nin NMDA Reseptörüne Etkisi

Sezen Kışlal<sup>1</sup>

### Özet

Koşullu çevre itilmesi (KÇİ) klasik koşullanmanın bir örneği olup, çevrenin hastalıkla ilişkilendirildiği durumlarda bağlamdaki uyarılara karşı oluşan isteksizlik olarak tanımlanmaktadır. İlişkisel öğrenme bağlamında düşünüldüğünde KÇİ öğrenmesi için, N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptörünün aktivasyonu ile sinaptik bağlantıların güçlenmesi gerektiği düşünülmektedir. Fakat KÇİ öğrenmesinde NMDA reseptörünün rolü ile ilgili yeterli çalışma bulunmamaktadır. D-cycloserine'nin (DCS), NMDA reseptör bölgelerinden biri olan glisine bağlanarak nörotransmisyonu arttıran bir NMDA kısmi agonisti olduğu bilinmesinin yanı sıra; yüksek veya sık dozlarının tersi etki yaratıp antagonist olarak işlev gördüğü çalışmalar da bulunmaktadır. Bu çalışmamızda DCS'nin hayvanlara sistemik olarak verilmesinin, KÇİ öğrenmesi üzerinde olan etkisi CD1 erkek fareler üzerinde araştırılmıştır. Bu amaçla, koşullanma başlangıcından 15 dakika önce hayvanlara 320 mg/kg dozunda DCS enjeksiyonu uygulanmıştır. Koşullama başladıktan 5 dakika sonra ise hastalık oluşturmak amacıyla deney grubundaki hayvanlara lityum klorür (LiCl) enjeksiyonu yapılmıştır. Kontrol grubuna ise sodyum klorür (NaCl) enjeksiyonu yapılmıştır. Koşullanmadan 2 gün sonra yapılan bellek testinde, hayvanların su tüketimi göz önüne alınarak KÇİ öğreniminin gerçekleşip gerçekleşmediği değerlendirilmiştir. Sonuçlarda, 320 mg/kg dozunda DCS enjeksiyonu alan hayvanların KÇİ geliştirmediği görülmüştür. Bu sonuçlar, yüksek doz DCS'nin NMDA reseptör antagonisti gibi davrandığı deneyimizle desteklenmiştir.

<sup>1</sup> Dr. Öğrt. Üyesi, Orta Doğu Teknik Üniversitesi, sezenkislal@gmail.com, 0000-0001-5169-2404

## Giriş

### 1. Klasik Koşullanma

Klasik koşullanma ilişkisel öğrenmenin iki çeşidinden biridir. En temel halinde iki farklı uyaran vardır. Bunlardan ilki koşulsuz uyarandır (Ksuz U) ve koşulsuz tepkiye (Ksuz T) sebep olur. Diğer bir uyaran ise normalde hayvan için hiçbir tepkiye neden olmayacak nötr uyarandır. Nötr uyaran ile Ksuz U ilişkisi güçlendikçe nötr uyaran koşullu uyarana (Klu U) evrilir ve koşullu tepkiyi (Klu T) meydana çıkartır (Clark, 2004).

Koşullu çevre itinimi (KÇİ) ise klasik koşullanmanın bazı temel mekaniklerini barındıran bir örnektir. Tarihsel olarak incelendiğinde, klasik koşullandırma prosedürü yoluyla elde edilen tepkilerin bağlama bağlı olabileceğinden bahsedilen ilk çalışmalardan biri Garcia ve arkadaşları (1955) tarafından yürütülmüştür. Sıçanlar ile yapılan bu çalışmada amaç; sıçanların radyasyona maruz kaldıkları süre boyunca tükettikleri ayırt edici bir tada sahip olan sıvının, daha sonra radyasyonsuz bir ortamda sunulduğunda sıvı tüketimi davranışını ne yönde değiştirdiğini incelemektir. Bu doğrultuda, çalışmada üç farklı dozda radyasyona (0, 30, 57  $\chi$ ) maruz kalan ve her doz için, bu maruz kalma sırasında musluk suyu veya sakarin çözeltisinden içmek üzere toplam altı farklı grup kullanılmıştır. Radyasyona maruz bırakıldıktan iki gün sonrasında sıçanlara aynı anda hem musluk suyu hem de sakarin çözeltisi verilmiştir ve sakarin tüketimleri ölçülmüştür. Radyasyona maruz bırakıldıkları süre boyunca musluk suyu verilen üç grubun radyasyon sonrası sakarin çözeltisi tüketimi neredeyse aynı olup yaklaşık %95'tir. Maruz bırakma esnasında sakarin çözeltisini alan grupta ise radyasyon sonrası sakarin çözeltisi alım miktarı, radyasyon dozu arttıkça azalmıştır (Garcia ve ark., 1955). Bunun nedeni ise sıçanlar radyasyona maruz kalma sırasında, radyasyondan kaynaklı rahatsızlıklar ile sakarin çözeltisi eşleştirilmiştir. Bu nedenle Ksuz T; gastrointestinal fonksiyonların ışınlama sırasında bozulmasından kaynaklı olarak sıçanların yaşadığını düşünülen mide-bağırsak rahatsızlıklarıdır (Garcia ve ark., 1955). Sonrasında sakarin çözeltisi Klu U olarak tanımlanırken, çözeltinin tüketiminden kaynaklı yaşanacak olası mide rahatsızlıkları Klu T olarak tanımlanır. Bu çalışmada sıçanların sakarin çözeltisi ile ilişkilendirdikleri mide rahatsızlıkları kaynaklı tattan kaçınma davranışları, koşullu itinme olarak adlandırılır. Çalışmanın sonunda bu kaçınma davranışının sadece tat alma ile sınırlı kalmayıp diğer uyarılara karşı da bir kaçınma davranışının hayvanlar tarafından geliştirilebileceği belirtilir (Garcia ve ark., 1955).

Bu alanda yapılan çalışmalardan biri ise Boakes ve ark. (1997) tarafından yürütülür. Çalışmalarındaki amaç, bağlama bağlı olarak sıçanların suya karşı

bir kaçınma davranışı sergileyip sergilemeyeceklerini incelemektir. Bunun için öncelikle birbirinden farklı özelliklere sahip, hedef olarak adlandırılan 1. bağlam ve nötr olarak adlandırılan 2. bağlam oluşturulmuştur. Test sıvısı olarak ekşi bir tada sahip olan hidroklorik asit çözeltisi kullanılmıştır. Bunun nedeni ise alışılmış bir tatken bile su ile karşılaştırıldığında hidroklorik asit çözeltisi nispeten hoş olmayan bir tada sahiptir (Boakes ve ark., 1997). Deneyin ilk iki günü sıçanların hidroklorik asit çözeltisi tadına aşinalık kazanması adına çözelti musluk suyuna karıştırılarak hayvanlara verilmiştir. Daha sonraki altı gün ise belli aralıklar ile ikinci bağlama yerleştirilmişlerdir. Dokuzuncu günde 20 dakika birinci bağlamda durduktan hemen sonra Lityum Klorür (LiCl) enjeksiyonu almışlardır ki bu hayvanda hastalık oluşturmaktadır. 10. ve 11. günlerde ise sıçanların ikinci bağlamda 20 dakikalık su erişimine izin verilmiştir. Bu döngü 3 kere daha tekrar edildikten sonra 20. ve 21. günlerde, sıçanlar her iki bağlamda da birinde su diğerinde ise hidroklorik asit çözeltisi bulunan iki şişe tercihi testine 20 dakika tabi tutulmuşlardır. Deneyin sonuçları sıçanların birinci bağlamda koşullanma sırasındayken su içme miktarlarının her döngüde azaldığını göstermiştir. Koşullanma sonrası iki günde ikinci bağlamdayken ise su içme miktarları her döngüde artmıştır. Son iki gün yapılan iki şişe testinde ise hayvanlar birinci bağlamdayken suya kıyasla ekşi tadı tercih ederken, ikinci bağlamda su tüketimleri daha fazla olmuştur. Bu deney sıçanlarda bağlama özgülü olarak suya karşı oluşan isteksizliği yansıtmakta olup, koşullu çevre itinininin sadece çevresel değişikliklere karşı olabileceğini göstermektedir (Boakes ve ark., 1997). Bu ve benzeri çalışmalardan yola çıkarak, klasik koşullanma modeli temeline dayanan KÇİ, çevrenin bir hastalıkla ilişkilendirildiğinde takdirde bağlamdaki uyaranlara karşı ortaya çıkan isteksizlik olarak tanımlanmaktadır (Ishii ve ark., 2006; Rodriguez ve ark., 2000). Koşullu çevre itinimi üzerine yapılan çalışmalar genellikle sıçanlar ve fareler gibi laboratuvar hayvanlarında modellenmiştir (Rodriguez ve ark., 2000; Kislal & Blizard, 2016). Hayvanlarda yapılan çalışmalarda hastalık oluşturmak yaygın olarak kullanılan ajanlardan biri lityum klorürdür (Puente ve ark., 1988; Boakes ve ark., 1997). LiCl'nin sistemik enjeksiyonu; hayvanlarda mide bulantısı ve halsizlik ile ilişkilendirilen hipofaji, mide boşalması ve karın üzerine yatma davranışlarına neden olan gastrointestinal rahatsızlıklar yaşatmaktadır. Ayrıca mide bulantısı ve halsizlik ile ilişkilendirilen hipofaji, mide boşalması ve karın üzerine yatma davranışlarına neden olur (Symonds ve ark., 1998; McCann ve ark., 1989; Meachum ve Bernstein, 1992).

## 2. N-metil-D-aspartik asit (NMDA) Reseptörlerinin Öğrenme Üzerindeki Etkisi

Daha önce de bahsedildiği gibi koşullanma ilişkisel öğrenmenin bir çeşididir. Uzun dönem kuvvetlendirme gibi sinaptik güçteki değişikliklerin ise öğrenme ve hafızanın temelini oluşturduğu düşünülmektedir (Bliss ve Collingridge, 1993). Bu tür bir öğrenme uzun dönem kuvvetlendirmeyi gerektirir. Sıçanlarla yapılan korku koşullandırması çalışmaları da uzun dönem kuvvetlendirmenin öğrenmeye aracılık ettiğine dair bulgular içermektedir (Maren,1999; Sigurdsson ve ark., 2007). Çoğu durumda uzun dönem kuvvetlendirmenin indüklenmesi uyarılması, N-metil-D-aspartik asit (NMDA) reseptörlerinin aktivasyonunu gerektirmektedir (Collingridge ve ark., 1991).

İyonotropik reseptörler, merkezi sinir sisteminin uyarılmayı tetikleyen ana nörotransmitteri olan glutamatın iki önemli reseptöründen biridir. Bu reseptörler kimyasal kapılı katyonik kanallardır ve aktive olduklarında uyarıcı postsinaptik potansiyeller üreterek nöronal depolarizasyona neden olmaktadır. Bu reseptörler, fizyolojik olmayan glutamat analoglarına duyarlılıklarına göre sınıflandırılmaktadır. Bunlardan biri N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptörüdür (Michaelis, 1998). NMDA reseptörü, glutamaterjik nörotransmisyonun araçlarından biridir. Dinlenim membran potansiyelinde (-70 mV), NMDA reseptörü glutamatın varlığında bile inaktiftir. Bunun sebebi hücre dışı  $Mg^{++}$  iyonların reseptöre bağlanıp daha fazla iyon hareketini bloke etmesidir. NMDA reseptörü kanalının açılması için iki koşulun sağlanması gerekmektedir. Bunlardan ilki presinaptik salınım ile glutamatın NMDA reseptörüne bağlanmasıdır. İkincisi ise  $Mg^{++}$  blokajının kalkmasına sebep olacak yeterince güçlü postsinaptik membran depolarizasyonudur. Bu iki koşulun sağlanmasıyla NMDA reseptör kanalı açılmaktadır (Wu ve Zhuo, 2009). Böylece, kalsiyum ( $Ca^{++}$ ) ve sodyum ( $Na^{+}$ ) gibi pozitif yüklü iyonların postsinaptik nörona akışı gerçekleşmiş olmaktadır. Kalsiyum akışı postsinaptik hücrede protein kinaz ve protein fosfataz gibi molekül aktivasyonlarına yol açarak sinaptik proteinlerin sentezini etkilemektedir. Bu da sinaptik güçte uzun vadeli değişikliklere ve dolayısıyla nöroplastisitenin indüklenmesine yol açmaktadır (VanDongen, 2008).

NMDA reseptörünün insan beyinde çeşitli süreçlerde farklı görevleri vardır. Erken beyin gelişimi sürecinde NMDA reseptörünün rolü, sinapsların yapısını ve işlevini düzenleyen süreçlerde yer almaktır. Daha ileriki süreçlerde ise NMDA reseptörü sinaptik plastisiteyi, sinaptik gelişimi ve sinaptik bağlantıların işleyişini geliştirmekte rol oynadığı bilinmektedir. Bu sebeple

bu reseptörlerin öğrenme, hafıza oluşumu ve hafızanın güçlenmesinde etkili olduğu düşünülmektedir (Gonda, 2012; Jiménez ve Tapia, 2004).

NMDA reseptörlerinin koşullanmada aracı bir rol oynaması bu reseptörlere yapılan farmakolojik manipülasyonunun deney hayvanlarında koşullanma edinimini ve bellek testlerini etkilediği görülmüştür. Örneğin, bu reseptör bölgesinin antagonistlerinin öğrenme üzerinde olumsuz etkileri varken (Kim ve ark., 1991), agonistlerinin öğrenme üzerinde pekiştirici etkisi vardır (Land ve Riccio, 1997).

Örneğin, Escobar ve ark. (1998) tarafından sıçanlarla yapılan çalışmada, bir NMDA reseptörü antagonisti olan 3-(2-carboxypiperazin-4-yl)propyl-1-phosphonic acid (CPP)'nin koşullu tat kaçınması öğrenimi sırasında tat korteksine enjekte edildiğinde tat kaçınması öğrenimi bloke ettiği gösterilmiştir (Escobar ve ark., 1998). Sıçanlarla yapılan bir başka çalışmada, bir NMDA reseptör antagonisti olan DL-2-amino-5-phosphonovaleric acid (APV) kullanılmıştır. Sıçanlar elektrik şoku alacakları kafese alındıklarında APV ya da izotonik sodyum klorür infüzyonu gerçekleştirilmiş, ardından 3 kere elektrik şokuna maruz bırakılmışlardır. Bir gün sonra gerçekleşen test gününde ise aynı işlem tekrarlanmış fakat bu sefer elektrik şoku uygulanmamıştır. Donma tepkisi korku koşullanmasının göstergesi olarak değerlendirilmiş olup APV uygulanan gruptaki sıçanlarda daha az gözlemlenmiştir (Kim ve ark., 1991). Ayrıca Rosenblum ve ark. (1997) tarafından sıçanlarla yapılan başka bir çalışmada ise NMDA reseptörünün tat öğrenimine de dahil olduğu, böylece koşullu tat kaçınmasında rol oynadığı belirtilmiştir. Bu çalışmada da NMDA reseptör antagonisti APV kullanılmıştır. Sıçanların bir kısmına 10 dakika sürecek olan sakarin çözeltisi erişimine izin verilmeden önce insular korteksi bölgesine APV mikroenjeksiyonu uygulanmıştır. Sakarin çözeltisi tüketiminden 50 dakika sonra ise sıçanlara LiCl enjeksiyonu uygulanmıştır. 3 gün sonra yapılan testte sıçanların hem suya hem de sakarin çözeltisine aynı anda erişimine izin verilmiştir. Çıkan sonuçlarda, APV mikroenjeksiyonuna maruz kalan sıçanların sakarin çözeltisi tüketimi daha fazla iken, APV mikroenjeksiyonu uygulanmayan sıçanların su tüketiminin daha fazla olduğu görülmüştür (Rosenblum ve ark., 1997).

### 3. Agonistlerin Özellikleri

Agonistlerin iki belirgin özelliği olduğu bilinmektedir. Bunlardan ilki reseptörle birleşme kapasitesi olarak tanımlanan reseptör afinitesiyken, diğeri reseptör aktivasyonuna neden olma yeteneğini simgeleyen içsel aktivitedir. Tam agonistler, hem reseptör afinitesine hem de maksimum içsel aktiviteye sahip olmaktadır. Bu nedenle sistemin yapabileceği maksimum

yanıtı ürettikleri bilinmektedir. Antagonistler ise reseptör afinitesine sahip olmakla birlikte içsel aktiviteye sahip olmadığından biyolojik bir yanıtı sebep olmamaktadırlar. Kısmi agonsitler, reseptör afinitesine ve antagonistlere göre daha fazla ama tam agonistlere göre ise daha az içsel aktivitesi olduğu bilinmektedir. Bunun sonucu olarak kısmi agonistler kullanıldıkları koşula bağlı olarak agonist veya antagonist etkiler üretebilmektedirler (Calvey ve Williams, 2009). Fakat, D-serin gibi rekabetçi NMDA agonistlerinin, eksitotoksositeye yol açarak hücrel apoptozu başlatma olasılıkları olduğu bilinmektedir (Bardaweel ve ark., 2014). Kısmi NMDA reseptörü agonistlerinin ise rekabetçi agonistlerin aksine, eksitotoksosite olmaksızın hafıza güçlenmesine fayda sağladığı görülmüştür (Ressler ve ark., 2004). D-cycloserine (DCS), NMDA reseptör bölgelerinden biri olan glisine bağlanarak nörotransmisyonu arttırmaktadır (Ressler ve ark., 2004). D-cycloserine'nin diğer bir avantajı da sistemik enjeksiyondan sonra hızla merkezi sinir sistemine taşınmasıdır (Baran ve ark., 1995).

Bir çalışmada sakarin ve LiCl eşleşmesinin aralığının uzun ya da kısa olmasının DCS'nin etkinliğini nasıl etkilediği gözlemlenmiştir. Sıçanlarla yapılan bu çalışmada, sakarin ve LiCl eşleşmesi 10 dakikalık kısa bir aralıkla yapıldığında, 15 dakika önce yapılan DCS enjeksiyonunun koşullanmayı arttırıp sakarin tercih oranını azalttığı görülmüştür. Fakat bu eşleşme 45 dakikalık uzun bir aralıkla yapıldığında, koşullanmadan 15 dakika önce yapılan DCS enjeksiyonunun koşullanmayı arttırmadığı görülmüştür (Davenport ve Houpt, 2009). Nunnink ve ark. (2007) tarafından yapılan başka bir çalışmada ise, sakarin alımı ile LiCl enjeksiyonu eşleştirmesinden 15 dakika önce sıçanlara sistemik D-cycloserine uygulanmıştır. Daha sonra yapılan 2 şişe tercih testinde, DCS uygulanan sıçanların sakarin bulunan şişeyi tercih etme oranlarının azaldığı gözlemlenmiştir (Nunnink ve ark., 2007).

Koşullanma deneyleri dışında başka davranış deneylerinde de DCS kullanılmıştır. Bozulmuş sosyallik belirtileri gösteren Balb/c farelerine davranış testinden 20 dakika önce 320 mg/kg olarak uygulanan DCS, bu farelerin lokomotor aktivitelerini arttırmıştır (Deutsch ve ark., 2011). Jecome ve ark. (2011) tarafından yapılan çalışmada ise davranış testinden 20 dakika önce Balb/c farelerinde uygulanan 320 mg/kg dozundaki DCS, çevrede uyaran olarak bulunan fareyi keşfetmek için harcanan zamanı arttıran bir etki yaratmıştır (Jecome ve ark., 2011).

DCS'nin NMDA reseptörlerinin etkinliğini artırarak doza bağımlı olarak, öğrenmeyi arttıran ve hafızayı güçlendiren etkilerini inceleyen bu çalışmalara rağmen, yüksek ve tekrarlanan dozların aynı etkiyi yaratmadığı gösterilmiştir

(Quartermain ve ark., 1994; Flood ve ark., 1992). Tüm bunlara dayanarak; mevcut çalışma, 320 mg/kg olarak uygulanan DCS'nin fareler üzerine sistemik enjeksiyonunun KÇİ öğrenmesi üzerine nasıl bir etkisi olduğunu bulmayı amaçlamaktadır.

## Yöntem

### Hayvanların Bakımı

Deneyde ağırlıkları 30-36 gram arası değişen 10-12 hafta aralığındaki CDI erkek fareler kullanıldı. Her biri 365 x 207 x 140 mm ölçülerine sahip şeffaf duvarlı kafeslere birer hayvan yerleşecek şekilde hayvanların bakımı sağlandı. 12 saatlik aydınlık/karanlık döngüsüne sahip olan koloni odasının sıcaklığı 24 °C +/-1'de sabit tutuldu. Tüm deney boyunca hayvanların fare yemi erişimi *ad libitum* olarak sağlanırken, su erişimi sadece aşağıda tarif edilen zamanlarda kısıtlandı. Deney, Technical Universal Verification Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul'u tarafından onaylandı (Karar Sayısı: 0034/2023; Karar Tarihi: 30.06.2023).

### Deney Grupları

Deneyde LiCl-DCS, LiCl-NaCl ve NaCl-NaCl olmak üzere toplam 3 grup bulunmaktadır (Tablo 1). Bu grupların ilki deney grubu olup, son ikisi de kontrol grubudur. Her grupta 12 hayvan olmak üzere toplam 36 hayvan kullanıldı. Gruplar oluşturulurken hayvanların ağırlıklarının ve yaşlarının ortalamalarının gruplar arasında eşit dağılmış olmasına dikkat edildi.

### İlaçların Enjeksiyonu

LiCl-DCS grubuna koşullanmadan 15 dakika önce 320 mg/kg dozunda DCS enjeksiyonu yapılırken, koşullanmanın 5. dakikasında 6 mEq/kg dozunda LiCl enjeksiyonu yapıldı. Kontrol grubu olan LiCl-NaCl grubunda ise; koşullanmadan 15 dakika önce 0.9% oranında NaCl enjeksiyonu yapılırken, koşullanmanın 5. dakikasında LiCl enjeksiyonu gerçekleştirildi. Diğer bir kontrol grubu olan NaCl-NaCl grubunda, hem koşullanmanın 15 dakika öncesinde hem de koşullanmanın 5. dakikasında 0.9% oranında NaCl enjeksiyonu uygulandı.

Tablo 1. Deney ve kontrol grupları

Gruplar		Hayvan Sayısı	Koşullanma öncesi enjeksiyon	Koşullanma sonrası enjeksiyon
Deney Grubu	LiCl-DCS	12	DCS	LiCl
Kontrol Grupları	LiCl-NaCl	12	NaCl	LiCl
	NaCl-NaCl	12	NaCl	NaCl

Deney prosedürü 6 asamadan oluşmakta olup, her bir asama detaylı bir şekilde aşağıda açıklanmıştır:

*Alıştırma.* Hayvanların ele alınmaya alışması amacıyla, 4 gün boyunca her biri günde 3 dakika olmak üzere ele alıştırdı. 4. gün elde tutma alıştırmaları tamamlandığında, koşullanma sırasında gerçekleştirilecek olan enjeksiyon uygulamalarından kaynaklı stresi ve yenilik etkisini azaltmak için her bir hayvana NaCl enjeksiyonu yapıldı. Bu süreç boyunca hem suya hem yeme ulaşımında bir kısıtlama uygulanmazken, 4. günün sonunda saat 17.30'da su şişeleri kafeslerinden alınarak su eğitime başlandı.

*Su İçme Eğitimi.* Alıştırma aşaması bittikten sonraki 2 gün boyunca hayvanların suya erişimi yalnızca sabah 10.00-10.30 ve akşam 17.00-17.30 olmak üzere günde iki defa ile kısıtlandı. Eğitim sırasında, kendi kafeslerinde her zaman kullanılan şeffaf plastik su şişeleri kullanıldı.

*Ön Maruz Kalma.* 2 günlük su içme eğitiminin ardından, koşullanma günü oluşabilecek olan neofobik tepkileri önlemek amacıyla, her bir hayvan 5 dakika koşullama çevresine maruz bırakıldı.

*Koşullama Testi.* Ön maruz kalma gününden bir gün sonra 12.30'da başlayan koşullama sürecinden 15 dakika önce, hayvanlara buldukları gruba göre NaCl (%0.9) ya da DCS (320 mg/kg) enjeksiyonları yapıldı. Koşullanma odasında asıl hedeflenen, hayvanların farklı bir çevrede bulduklarını simgeleyen uyarınları yerleştirerek çevresel ortamların değiştirilmesiydi. Bu amaçla ilk olarak koşullanma odasında alınmadan hemen önce, hayvanlar şeffaf duvarlı kafeslerinden alınıp siyah-beyaz mat şeritli kafeslere yerleştirildi. Bu kafeslerde normal kafeslerinden farklı olarak zeminde talaş değil kedi kumu kullanıldı. Koşullanma odasında kokusal uyarın olarak limon yağı, duyuusal uyarın olarak 75 dB beyaz gürültü ve görsel uyarın olarak da 60 watt değerinde kırmızı ışık eklendi. Ayrıca koşullanma odasında su şişesi olarak, yeşil cam ve çelik bilye uçlu şişeler kullanıldı. Hayvanlar koşullanma odasına alındıktan 5 dakika sonra gruplarına göre LiCl ya da NaCl enjeksiyonu



yapıldı. Enjeksiyondan 15 dakika sonra hayvanlar koşullanma odasından çıkarılıp kendi kafeslerine yerleştirildi. Hayvanların tekrar koloni odasına götürülmesiyle koşullama süreci tamamlandı. Koşullanma başlamadan önce tartılan şişeler koşullanma sonunda da tartılıp, 20 dakikalık koşullanma oturumunda hayvanların tükettikleri su miktarı belirlendi. Bu işlemlerin hepsi her hayvan için bireysel olarak gerçekleştirildi.

*İyileşme.* Koşullanmayı takip eden iki gün hayvanlar iyileşme sürecine alındı. Bu süreç boyunca su içme eğitimlerinde belirlendiği saate göre su erişimine izin verildi.

*Bellek Testi.* İyileşme sürecinin ardından 12.30'da başlayan bellek testinde, her bir hayvan ayrı zamanlarda olmak üzere 15 dakika boyunca koşullanma odasına alındı. Bellek testi esnasında hiçbir enjeksiyon işlemi uygulanmadı fakat çevresel uyarılar koşullanma aşamasındakiler ile aynıydı. Bellek testi koşullu çevre itenmesinin gücünü değerlendirmek amacıyla her bir farenin içtikleri su miktarı ölçüldü.

### Veri Analizi

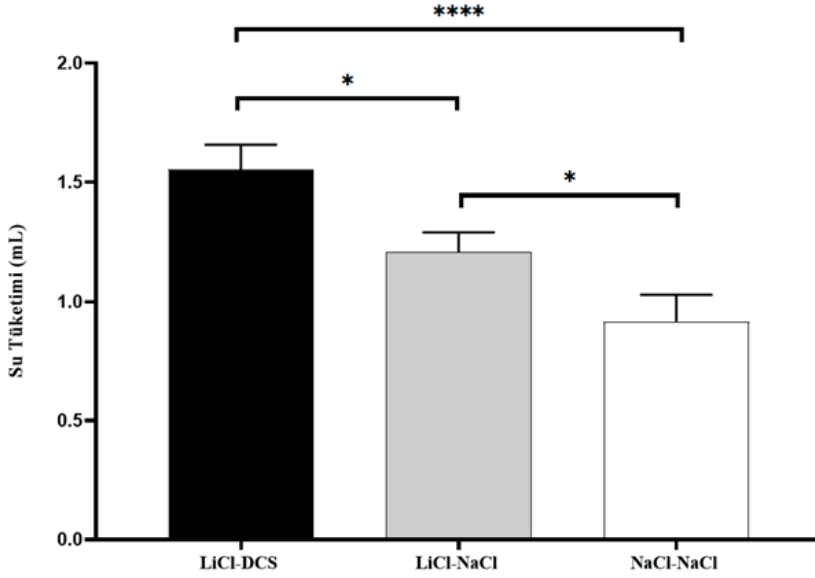
İstatistiksel analiz yapmak için Prism GraphPad (Sürüm 8) kullanıldı. Koşullandırma ve bellek testi sırasında hayvanların su alımı, tek yönlü ANOVA kullanılarak değerlendirildi. Post-hoc karşılaştırmalar için Fisher'in LSD testi kullanıldı. Farklılıkların anlamlı kabul edilmesi için güven düzeyi %95 olarak ayarlandı ( $p < 0.05$ ).

### Sonuç

#### Koşullanma Sonuçları

Koşullama sırasında grupların tükettikleri sıvı miktarları Şekil 1'de gösterilmektedir. Tek yönlü ANOVA testi sonuçlarına göre grupların su tüketimi miktarları arasında anlamlı bir fark olduğu görülmektedir  $F(2, 33) = 9.858, p = .0004$ . Fisher's LSD analizi sonuçlarına göre, LiCl-DCS grubundaki ( $M = 1.552, SD = 0.363$ ) farelerin su tüketiminin, hem LiCl-NaCl ( $M = 1.208, SD = 0.289; p < .05$ ) hem de NaCl-NaCl ( $M = 0.916, SD = 0.391; p < 0.0001$ ) grubundakilere göre anlamlı derecede daha fazla olduğunu görülmektedir. LiCl-NaCl grubundaki farelerin su tüketimleri ile NaCl-NaCl grubundakilerin tüketimleri arasında anlamlı derecede fark olduğunu da görülmektedir ( $p < .05$ ).

## Koşullanma Sırasındaki Ortalama Su Tüketimi

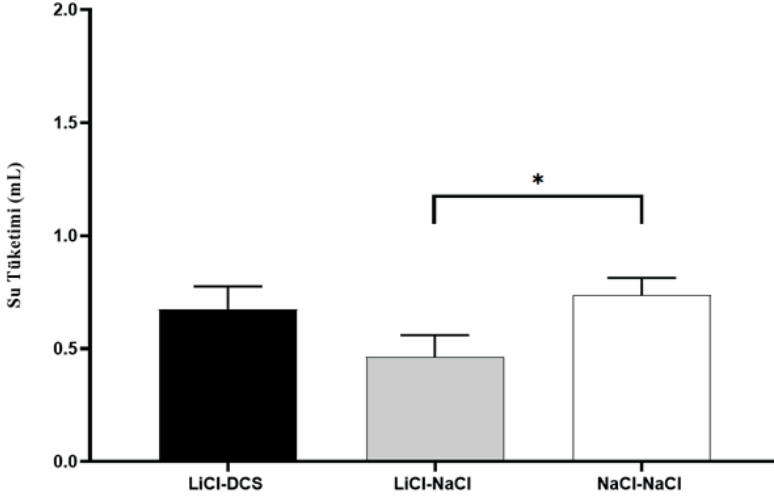


Şekil 1. 20 dakikalık koşullanma denemesi süresince grupların ortalama su tüketimi. Koşullanma sırasında DCS enjeksiyonu uygulanan fareler hem LiCl-NaCl hem de NaCl-NaCl enjeksiyonu alan farelere kıyasla daha fazla su tüketmişlerdir. Koşullanma sırasında LiCl enjeksiyonu uygulanan farelerin (LiCl-NaCl) ise sadece NaCl enjeksiyonu alan farelere göre su tüketimi daha fazladır. Değerler ortalama  $\pm$  SH şeklinde verilmiştir. \* $p < .05$ , \*\*\*\* $p < .0001$ .

### Bellek Testi Sonuçları

Bellek testi sırasında grupların tükettikleri su miktarı Şekil 2'de gösterilmektedir. Tek yönlü ANOVA testi sonuçlarına göre gruplar arasında su tüketimi açısından anlamlı bir fark bulunmadığı görülmektedir,  $F(2, 33) = 2.44$ ,  $p = .1027$ . Fisher's LSD analizi sonuçlarına göre, LiCl-NaCl grubundaki farelerin su tüketimi ( $M = 0.4633$ ,  $SD = 0.3351$ ) NaCl-NaCl grubundaki hayvanların su tüketimi ( $M = 0.7375$ ,  $SD = 0.2638$ ;  $p < .05$ ) ile kıyaslandığında anlamlı derecede daha az olup, koşullu çevre itinmesinin başarılı bir şekilde gerçekleştiğini göstermektedir. Ancak, LiCl-NaCl ve LiCl-DCS ( $p = .1132$ ) grupları arasında ve LiCl-DCS ve NaCl-NaCl ( $p = .6341$ ) arasında anlamlı bir fark görülmemektedir.

## Bellek Testi Ortalama Su Tüketimi



*Şekil 2. Bellek testi süresince grupların ortalama su tüketimi. LiCl-NaCl grubu, diğer iki gruba kıyasla daha az su tüketmişlerdir. İstatiksel olarak anlamlı fark sadece NaCl-NaCl ve LiCl-NaCl grupları arasında görülmüştür. Değerler ortalama  $\pm$  SH şeklinde verilmiştir. \* $p < .05$ .*

## Tartışma

Deneyimizin amacı, CD1 erkek farelerde 320 mg/kg dozunda DCS'nin bir NMDA reseptörü kısmi agonisti olarak KÇİ öğrenmesi üzerindeki etkisini incelemektir. Deneyimizde, iki kontrol grubu olan NaCl-NaCl ve LiCl-NaCl grupları kullanılmıştır. LiCl-NaCl grubu, hayvanlarda LiCl ile oluşturulan KÇİ öğrenmesinin varlığını test etmek amacıyla deneyimize dahil edilmiştir. KÇİ'nin gerçekleşip gerçekleşmediği, diğer kontrol grubu olan NaCl-NaCl grubu ile bellek testi sırasında su tüketimi arasındaki anlamlı farkın incelenmesiyle belirlenmiştir. Deneyimiz sırasında, NaCl-NaCl grubunun koşullama sürecinde yaklaşık olarak 1 ml su içerken, diğer grupların 1.2-1.5 ml arasında su tükettiği gözlemlenmiştir (Şekil 1). Bu değerler, daha önceki KÇİ deneylerinde elde edilen sonuçları ile uyumlu olup (Kışlal ve Blizard, 2016, 2018), NaCl-NaCl grubunun kısmen daha az su içmesinin, belirli hayvanların genel olarak daha az su içmeye eğilimli olmaları olarak açıklanabilir.

KÇİ'nin başarılı bir şekilde gerçekleşip gerçekleşmediği, koşullamadan üç gün sonra gerçekleştirilen bellek testi ile kanıtlanmıştır. LiCl-NaCl grubunda koşullu çevre itinmesinin gerçekleştiği ve bu grubun NaCl-NaCl grubuna göre daha az su içtiği istatistiksel olarak anlamlıdır. Bu sonuçlar Kislal ve Blizard (2016, 2018) tarafından yapılan çalışmalarda da gösterildiği gibi; kafeslerde koşullama sırasında yapılan çevresel değişikliklerin hastalık durumu ile eşleştirilmesi sonucunda, KÇİ öğrenmesinin gerçekleştiği bu deneyimizde CDI erkek fareler ile tekrarlanmıştır.

Bellek testi sonuçlarına göre, LiCl-DCS grubu ile NaCl-NaCl grubu arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır. Bu sonuç bize, koşullu çevre itinmesinin gerçekleşmediğini göstermektedir. Daha önce yapılan çalışmalar, DCS'nin yüksek dozlarda veya kronik uygulamalarda antagonist bir etki yaratabileceğini göstermiştir (Quartermain ve ark., 1994; Flood ve ark., 1992). Sonuçlarımız, DCS'nin bu deneyde olduğu gibi yüksek dozda uygulanmasının KÇİ öğrenmesini zayıflatabileceğini düşündürmektedir. Agonist olarak görev alması durumunda, öğrenme üzerinde pekiştirici etkisi olacağından LiCl-DCS ve NaCl-NaCl grupları arasında fark beklenmektedir ancak bu deneyimizde gözlemlenmemiştir.

Bu sonuçlar, DCS'nin KÇİ öğrenmesi üzerindeki etkisinin karmaşık olduğunu ve doza bağlı olarak değişebileceğini göstermektedir. İleride yapılacak çalışmalarda DCS'nin KÇİ öğrenmesi üzerindeki etkisini farklı dozaj seviyeleri kullanılarak değerlendirilmesi planlanmaktadır. Hangi dozlarda DCS'nin agonist veya antagonist etki gösterdiği araştırılabileceği gibi, yine DCS'nin en etkili olduğu zaman dilimleri üzerine daha fazla araştırma yapılması hedeflenmektedir.

Literatürdeki çalışmalara ve elde ettiğimiz sonuçlara göre, DCS'nin bellek üzerindeki etkilerini daha iyi anlamak ve potansiyel klinik uygulamalarını geliştirmek için daha fazla araştırma yapılması gerektiğini görmekteyiz. Bu araştırmalar, DCS'nin öğrenme ve bellek üzerindeki rolünü daha iyi anlamamıza ve bu ilacın kullanımını optimize etmemize olanak sağlayacağını düşünmekteyiz.

## Kaynaklar

- Baran, H., Gramer, M., ve Löscher, W. (1995). Alterations in plasma and brain amino acids after administration of the glycine/NMDA receptor partial agonist, D-cycloserine, to mice and rats. *European Journal of Pharmacology*, 273(1-2), 197-201.
- Bardaweel, S. K., Alzweiri, M., ve Ishaqat, A. A. (2014). D-Serine in neurobiology: CNS neurotransmission and neuromodulation. *Canadian Journal of Neurological Sciences*, 41(2), 164-176. <https://doi.org/10.1017/S031716710001653X>
- Bliss, T. V., ve Collingridge, G. L. (1993). A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*, 361(6407), 31-39.
- Boakes, R. A., Westbrook, R. F., Elliott, M., ve Swinbourne, A. L. (1997). Context dependency of conditioned aversions to water and sweet tastes. *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes*, 23(1), 56. <https://doi.org/10.1037/0097-7403.23.1.56>
- Calvey, N., ve Williams, N. (2009). Principles and practice of pharmacology for anaesthetists. John Wiley & Sons.
- Clark, R. E. (2004). The classical origins of Pavlov's conditioning. *Integrative Physiological & Behavioral Science*, 39, 279-294.
- Davenport, R. A., ve Houpt, T. A. (2009). D-cycloserine enhances short-delay, but not long-delay, conditioned taste aversion learning in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 91(4), 596-603.
- Deutsch, S. I., Burket, J. A., Jacome, L. F., Cannon, W. R., ve Herndon, A. L. (2011). D-Cycloserine improves the impaired sociability of the Balb/c mouse. *Brain Research Bulletin*, 84(1), 8-11.
- Flood, J. E., Morley, J. E., ve Lanthorn, T. H. (1992). Effect on memory processing by D-cycloserine, an agonist of the NMDA/glycine receptor. *European Journal Of Pharmacology*, 221(2-3), 249-254.
- Garcia, J., Kimeldorf, D. J., ve Koelling, R. A. (1955). Conditioned aversion to saccharin resulting from exposure to gamma radiation. *Science*, 122(3160), 157-158.
- Gonda, X. (2012). Basic pharmacology of NMDA receptors. *Current Pharmaceutical Design*, 18(12), 1558-1567. <https://doi.org/10.2174/138161212799958521>
- Ishii, K., Iguchi, Y., ve Sawa, K. (2006). Context dependency of conditioned aversions to familiar and novel fluids. *Learning and Motivation*, 37(2), 113-130.
- Jacome, L. F., Burket, J. A., Herndon, A. L., ve Deutsch, S. I. (2011). D-Cycloserine enhances social exploration in the Balb/c mouse. *Brain Research Bulletin*, 85(3-4), 141-144.

- Jiménez, B., ve Tapia, R. (2004). Biochemical modulation of NMDA receptors: role in conditioned taste aversion. *Neurochemical Research*, 29, 161-168.
- Kim, J. J., DeCola, J. P., Landeira-Fernandez, J., ve Fanselow, M. S. (1991). N-methyl-D-aspartate receptor antagonist APV blocks acquisition but not expression of fear conditioning. *Behavioral Neuroscience*, 105(1), 126. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.105.1.126>
- Kisla, S., ve Blizard, D. A. (2016). Conditioned context aversion learning in the laboratory mouse. *Learning and Behavior*, 44(4), 309–319. <https://doi.org/10.3758/s13420-016-0217-2>
- Kisla, S., ve Blizard, D. A. (2018). Acquisition and retention of conditioned aversions to context and taste in laboratory mice. *Learning and Behavior*, 46(2), 198–212. <https://doi.org/10.3758/s13420-017-0303-0>
- Land, C. L., ve Riccio, D. C. (1997). D-cycloserine, a positive modulator of the NMDA receptor, enhances acquisition of a conditioned taste aversion. *Psychobiology*, 25(3), 210-216. <https://doi.org/10.3758/BF03331929>
- Maren, S. (1999). Long-term potentiation in the amygdala: a mechanism for emotional learning and memory. *Trends in neurosciences*, 22(12), 561-567. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(99\)01465-4](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(99)01465-4)
- McCann, M. J., Verbalis, J. G., ve Stricker, E. M. (1989). LiCl and CCK inhibit gastric emptying and feeding and stimulate OT secretion in rats. *The American Journal of Physiology*, 256(2 Pt 2), R463–R468. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1989.256.2.R463>
- Meachum, C. L., ve Bernstein, I. L. (1992). Behavioral conditioned responses to contextual and odor stimuli paired with LiCl administration. *Physiology & Behavior*, 52(5), 895–899. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(92\)90368-c](https://doi.org/10.1016/0031-9384(92)90368-c)
- Michaelis, E. K. (1998). Molecular biology of glutamate receptors in the central nervous system and their role in excitotoxicity, oxidative stress and aging. *Progress in Neurobiology*, 54(4), 369-415.
- Nunnink, M., Davenport, R. A., Ortega, B., ve Houpt, T. A. (2007). D-Cycloserine enhances conditioned taste aversion learning in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 87(3), 321-330.
- Puente, G. P., Cannon, D. S., Best, M. R., ve Carrell, L. E. (1988). Occasion setting of fluid ingestion by contextual cues. *Learning and Motivation*, 19(3), 239-253. [https://doi.org/10.1016/0023-9690\(88\)90003-3](https://doi.org/10.1016/0023-9690(88)90003-3)
- Quartermain, D., Mower, J., Rafferty, M. F., Herting, R. L., ve Lanthorn, T. H. (1994). Acute but not chronic activation of the NMDA-coupled glycine receptor with D-cycloserine facilitates learning and retention. *European Journal of Pharmacology*, 257(1-2), 7-12.
- Ressler, K. J., Rothbaum, B. O., Tannenbaum, L., Anderson, P., Graap, K., Zimand, E., ... ve Davis, M. (2004). Cognitive enhancers as adjuncts to

- psychotherapy: Use of D-cycloserine in phobic individuals to facilitate extinction of fear. *Archives of General Psychiatry*, 61(11), 1136-1144.
- Rodriguez, M., Lopez, M., Symonds, M., ve Hall, G. (2000). Lithium-induced context aversion in rats as a model of anticipatory nausea in humans. *Physiology & Behavior*, 71(5), 571-579. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(00\)00376-0](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(00)00376-0)
- Rosenblum, K., Berman, D. E., Hazvi, S., Lamprecht, R., ve Dudai, Y. (1997). NMDA receptor and the tyrosine phosphorylation of its 2B subunit in taste learning in the rat insular cortex. *Journal of Neuroscience*, 17(13), 5129-5135.
- Sigurdsson, T., Doyère, V., Cain, C. K., ve LeDoux, J. E. (2007). Long-term potentiation in the amygdala: a cellular mechanism of fear learning and memory. *Neuropharmacology*, 52(1), 215-227. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2006.06.022>
- Symonds, M., Hall, G., Lopez, M., Loy, I., Ramos, A., ve Rodriguez, M. (1998). Is fluid consumption necessary for the formation of context-illness associations? An evaluation using consumption and blocking tests. *Learning and Motivation*, 29(2), 168-183. <https://doi.org/10.1006/lmot.1997.0998>
- VanDongen, A. M. (Ed.). (2008). *Biology of the NMDA Receptor*. CRC Press.
- Wu, L. J., ve Zhuo, M. (2009). Targeting the NMDA receptor subunit NR2B for the treatment of neuropathic pain. *Neurotherapeutics*, 6(4), 693-702.

