T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

STRES VE ÇEVRESEL ZENGİNLEŞTİRMENİN YAŞLI SIÇANLARDA DAVRANIŞLAR, ÖĞRENME VE BEYİNDEKİ BAZI NÖROBİYOLOJİK BELİRTEÇLER ÜZERİNE ETKİLERİ

DUYGU SULTAN ORAN

DANIŞMAN
DOÇ. DR. EVREN ERASLAN

FİZYOLOJİ ANABİLİMDALI
FİZYOLOJİ DOKTORA PROGRAMI

İSTANBUL-2022

TEZ ONAYI

Bu çalışma 14.09.2022 Tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Fizyoloji Anabilim Dalı, Fizyoloji Doktora Programı Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

TEZ JÜRİSİ

Doç. Dr. Evren Eraslan
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Veteriner Fakültesi

Doç. Dr. İbrahim Akyazı
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Veteriner Fakültesi

Prof. Dr. Abit Aktaş
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Veteriner Fakültesi

Prof. Dr. Hümeyra Ünsal
Aydın Adnan Menderes Üniversitesi
Veteriner Fakültesi

Doç. Dr. Ahu Demirtaş
Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi
Veteriner Fakültesi

İTHAF

Her zaman yanımda olan annem Arzu ve eşim Tunçalp'e ithaf ediyorum

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca ve tezimin her aşamasında kıymetli bilgi ve önerileriyle desteğini esirgemeyen danışman hocam Doç. Dr. Evren Eraslan'a, bu süreçte güvenleriyle ve yönlendirmeleriyle yanımda olan tez izleme komitemdeki hocalarım Prof. Dr. Abit Aktaş'a ve Doç. Dr. İbrahim Akyazı'ya, varlıklarıyla süreci güzel kılan Anabilim Dalımızın bütün üyelerine; Sayın Prof. Dr. Ülker Çötelioğlu'na, Prof. Dr. Elif Ergül Ekiz'e, lisans ve doktora eğitimim boyunca ihtiyaç duyduğumda hep yanımda olan hocalarım Prof. Dr. Murat Arslan ve Prof. Dr. Erdal Matur'a, dersini dinlediğim ilk andan itibaren hayran olduğum, sesini duyunca sakinleştiğim, bilgi ve tecrübesini cömertçe paylaşan kıymetli hocam Prof. Dr. Mukaddes Özcan'a, gen ekspresyon seviyelerinin belirlenmesinde yardımcı olan Araş. Gör. Mert Erek'e; bilgisini ve emeğini özveriyle paylaşan, tatil günlerini benimle laboratuvarda geçiren kıymetli dostum Veteriner Hekim Burcu Çevreli'ye, başta istatistik analizleri olmak üzere tüm süreçte sabırla sorularımı yanıtlayan beni hep sakinleştiren arkadaşım Dr. Öğr. Üyesi Zeynep Yıldız'a, zamanını ve bilgisini hiçbir süreçte esirgemeyen sevgili dostum Dr. Öğr. Üyesi Arzu Temizyürek'e, laboratuvarlarını paylaşan Bezmialem Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarı Sorumlu Yöneticisi Veteriner Hekim Mert Çelikten'e ve ekibine, emeğini ve zamanını esirgemeyen sevgili arkadaşım Nurhayat Polat'a; manevi desteğini hep hissettiğim, düştüğüm anda bile mücadele etme gücü veren, ilmini almaktan gurur duyduğum çok kıymetli hocam Prof. Dr. Ayşin Selcan'a, hep yanımda olan ve deney hayvanlarımı özenle büyüten BADABEM ekibinin üyeleri Fatih Genç ve Göksel Danışman'a, meslek hayatıma katkısı olan meslektaşlarıma ve hayvanlarıma; bilim insanı olma yolunda her zaman ışık olan başta Mustafa Kemal Atatürk olmak üzere kıymetli hocalarıma, laboratuvar hayvanları ile tanışmamı sağlayan gerek bilgi birikimi gerekse hayat tecrübesiyle lisans ve meslek hayatımda emeği büyük olan, ışığıyla hep aydınlatmaya devam eden rahmetli hocam Prof. Dr. Tuncay Altuğ'a; desteğiyle ve koşulsuz sevgisiyle hep yanımda olan, okuma ve öğrenme azmimin mimarı annem Arzu Demiryürek'e, artık yanımda olmasalar da güven ve gurur duygularını kalbimde hissettiğim anneannem ve babama; doktoramın her aşamasında yanımda olan, desteğini, enerjisini ve sevgisini hiç esirgemeyen sevgili eşim Dr. Tunçalp Oran'a ve tüm aileme içtenlikle teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TDK-2020-35146

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI ..... İİ
İTHAF ..... İV
TEŞEKKÜR V
İÇİNDEKİLER ..... Vİ
TABLOLAR LİSTESİ ..... İX
ŞEKİLLER LİSTESİ ..... Xİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ ..... Xİİ
ÖZET ..... Xİİİ
ABSTRACT ..... XİV
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 4
2.1. Stresin Tanımı 4
2.2. Stresin Tarihçesi 4
2.3. Stres Etmenleri ve Stresin Sınıflandırılması 6
2.4. Stresin Etki Mekanizması 6
2.4.1. Stres Yanıtında Hipotalamik-Hipofiz-Adrenal Eksenin Rolü 9
2.4.2. Stres Yanıtında Kortikotropin Salgılatıcı Hormonun Rolü 11
2.4.3. Stres Yanıtında Glukokortikoidlerin Rolü 13
2.5. Kronik Stres ve Kronik Stres ile İlişkili Davranış, Öğrenme ve Nörodejeneratif Bozukluklar 15
2.5.1. Kronik Stresin Davranış Üzerine Etkisi 15
2.5.1.1. Sükroz Tercih Testi 17
2.5.1.2. Yeni Obje Tanıma Testi 18
2.5.1.3. Yükseltilmiş Artı Labirent Testi 19
2.5.1.4. Zorunlu Yüzme Testi 20
2.5.1.5. Morris Su Labirenti Testi 21
2.5.2. Kronik Stresin Nörobiyolojik Etkileri 22
2.5.2.1. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) 23
2.6. Yaşlanma Stres İlişkisi 29
2.7. Çevresel Zenginleştirme Uygulamaları 30
2.8. Çevresel Zenginleştirme ve Stres İlişkisi 31

3. GEREÇ VE YÖNTEM 33
3.1. Deney Hayvanları ve Barınma Koşulları 33
3.2. Kronik Öngörülemeyen Hafif Stres Protokolü 34
3.3. Davranış Deneyleri 36
3.3.1. Sükroz Tercih Testi 37
3.3.2. Yeni Obje Tanıma Testi 38
3.3.3. Yükseltilmiş Artı Labirent Testi 40
3.3.4. Zorunlu Yüzme Testi 41
3.3.5. Morris Su Labirenti Testi 42
3.4. Kan ve Doku Örneklerinin Alınması 45
3.5. Kortikosteron Seviyelerinin Belirlenmesi 47
3.6. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu 48
3.6.1. Ribonükleik Asit İzolasyonu 48
3.6.2. Komplementer Deoksiribonükleik Asit Sentezi 49
3.6.3. Gen Ekspresyon Seviyelerinin Belirlenmesi 50
3.7. İstatistik 52
4. BULGULAR 53
4.1. Vücut Ağırlığı Bulguları 53
4.2. Adrenal ve Rölatif Adrenal Ağırlık Bulguları 55
4.3. Kortikosteron Bulguları 57
4.4. Davranış Bulguları 58
4.4.1. STT Bulguları 58
4.4.2. NOR Bulguları 60
4.4.3. FST Bulguları 61
4.4.4. EPM Bulguları 62
4.4.5. MWM Bulguları 63
4.5. PCR Bulguları 71
4.5.1. Amigdala GR, CRH, CRHR1 gen ekspresyonları 71
4.5.2. Hipotalamus GR, CRH, CRHR1 gen ekspresyonları 73
4.5.3. Hipokampus GR, CRH, CRHR1 gen ekspresyonları 74
4.5.4. Prefrontal korteks GR, CRH, CRHR1 gen ekspresyonları 76
5. TARTIŞMA 78
ETİK KURUL KARARI 126

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI 129
ÖZGEÇMİŞ ..... **HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.**

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 3-1 : Hayvan grupları ve uygulanacak işlemler 34
Tablo 3-2 : KÖHS protokolünde uygulanan stresörler 34
Tablo 3-3 : MWM sıçanların suya bırakma kadran sırası 43
Tablo 3-4 : Hipotalamusa ait mikroplak tasarımı (hedef gen (GR) ve referans gen (GAPDH)) 52
Tablo 4-1 : Deney gruplarının vücut ağırlıkları ortalamaları 54
Tablo 4-2 : Stres ve barınma faktörlerinin adrenal ağırlık üzerine etkileri 56
Tablo 4-3 : Stres ve barınma faktörlerinin rölatif adrenal ağırlık üzerine etkileri..... 56
Tablo 4-4 : Grupların en düşük ve en yüksek kortikosteron seviyeleri 57
Tablo 4-5 : Stres ve barınma faktörlerinin STT'ye etkileri..... 58
Tablo 4-6 : NOR testindeki yeni ve eski objelere ilişkin parametreler üzerine stres uygulamasının etkisi..... 60
Tablo 4-7 : NOR testindeki yeni ve eski objelere ilişkin parametreler üzerine barınma tiplerinin etkisi 61
Tablo 4-8: Stres ve barınma faktörlerinin FST mobilite süresine etkileri..... 61
Tablo 4-9: Stres faktörünün EPM testinde ölçülen parametreler üzerine etkisi..... 62
Tablo 4-10: Barınma faktörünün EPM testinde ölçülen parametreler üzerine etkisi 63
Tablo 4-11: MWM öğrenme alıştırmalarında platformu bulana kadar katedilen mesafe değeri..... 64
Tablo 4-12: MWM öğrenme alıştırmalarında platformu bulma süresi..... 66
Tablo 4-13: MWM platform kadranında geçirilen ortalama süre değeri 67
Tablo 4-14: MWM öğrenme alıştırmalarında ortalama hız değeri..... 68
Tablo 4-15: MWM hafıza testinde katedilen mesafe değeri 69
Tablo 4-16: MWM hafıza testi hızı..... 70
Tablo 4-17: MWM hafıza testinde hedef kadranında geçirilen süre 70
Tablo 4-18: Amigdaladaki GR ve CRH gen ekspresyonları üzerine stres ve barınma etkisi 71
Tablo 4-19: Amigdaladaki CRHR1 gen ekspresyonları üzerine stres ve barınma etkisi 72
Tablo 4-20: Hipotalamustaki GR, CRH, CRHR1 gen ekspresyonları üzerine stres ve barınma etkisi..... 73

Tablo 4-21: Hipokampustaki GR ve CRHR1 gen ekspresyonları üzerine stres ve barınma etkisi 74
Tablo 4-22: Hipokampustaki CRH gen ekspreyonu üzerine stres ve barınma etkisi 75
Tablo 4-23: Prefrontal korteksteki GR ve CRHR1 gen ekspresyonları üzerine stres ve barınma etkisi..... 76
Tablo 4-24: Prefrontal korteksteki CRH gen ekspreyonu üzerine stres ve barınma etkisi 77

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1 : Stres sistemi ve HPA ekseni negatif geri bildirim mekanizması.....11
Şekil 3-1 : KÖHS protokolünde uygulanan stresörlerden eğik kafeste tutma.....35
Şekil 3-2 : KÖHS protokolünde uygulanan stresörlerden su bulunan kafes içerisinde barındırma.....35
Şekil 3-3 : ÇZ grupları için oluşturulan yaşam alanı 36
Şekil 3-4: Çalışma prosedürü 37
Şekil 3-5: Yeni obje tanıma testinde kullanılan objeler 38
Şekil 3-6: Yeni obje tanıma testi eğitim (E) periyodu 39
Şekil 3-7: Yeni obje tanıma testi test (T) periyodu video takip sistemi görüntüsü 40
Şekil 3-8: EPM'de dört kolun da kullanıldığı video takip sistemi görüntüsü 41
Şekil 3-9: EPM'de kapalı kolların kullanıldığı video takip sistemi görüntüsü 41
Şekil 3-10: Zorunlu yüzme testi.....42
Şekil 3-11 : Öğrenme alıştırmalarından 1. güne ait katedilen mesafe görüntüsü.....44
Şekil 3-12 : Öğrenme alıştırmalarından 4. güne ait katedilen mesafe görüntüsü.....45
Şekil 3-13 : Juguler venden kan alma işlemi.....46
Şekil 3-14 : Beynin matrikse yerleştirilmesi 46
Şekil 3-15 : Matrikse yerleştirilmiş beyin dokusundan kesit alınması 47
Şekil 4-1 : Deney grupları vücut ağırlığı ortalamalarının zamana göre değişimi.....54

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

A	Amigdala
ACTH	Adrenokortikotropik hormon
AVP	Arjinin vasopressin
BDNF	Brain derived neurotrophic factor Beyin kaynaklı nörotropik faktör
cDNA	Komplementer deoksiribonükleik asit
CRH	Corticotropin releasing hormone Kortikotropin salgılatıcı hormon
CRHR1	Corticotropin releasing hormone receptor 1 Kortikotropin salgılatıcı hormon reseptörü 1
CRHR2	Corticotropin releasing hormone receptor 2 Kortikotropin salgılatıcı hormon reseptörü 2
Ct	Cycle threshold Eşik değeri döngüsü
ÇZ	Çevresel zenginleştirme
DNA	Deoksiribonükleik asit
DNaz	Deoksirobonükleaz
dNTP	Deoksiribonükleozid trifosfat
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EPM	Elevated plus maze Yükseltilmiş artı labirent
FST	Forced swimming test Zorunlu yüzme testi
GABA	Gama aminobütirik asit
GAPDH	Gliseraldehit 3-fosfat dehidrojenaz
GR	Glukokotikoid reseptörü
GR	Glukokortikoid reseptörü
HC	Hipokampus
HPA	Hipotalamo-hipofiz-adrenokortikal
HT	Hipotalamus
KÖHS	Kronik öngörülemeyen hafif stres
MR	Mineralokortikoid reseptörü
mRNA	Messenger ribonucleic acid Mesajcı ribonükleik asit
MWM	Morris water maze Morris su labirenti
NOR	Novel object recognition test Yeni obje tanıma testi
PFC	Prefrontal korteks
PVN	Paraventriküler nukleus
RNA	Ribonükleik asit
RNaz	Ribonükleaz
RT-PCR	Real time polimeraze chain reaction Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
SAM	Sympathetic-adreno-medullar Sempato-adrenal-medullar
SK	Standart kafes
STT	Sükroz tercih test
TNF	Tümör nekroz faktör

ÖZET

ORAN, D.S. (2022). Stres ve Çevresel Zenginleştirmenin Yaşlı Sıçanlarda Davranışlar, Öğrenme ve Beyindeki Bazı Nörobiyolojik Belirteçler Üzerine Etkileri. İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Fizyoloji ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

Yaşlanmanın sıçanlarda anksiyete düzeyini artırdığı, öğrenme ve hafıza fonksiyonlarını olumsuz etkilediği gösterilmiştir. Stresin de yaşlanmanın biliş ve davranışlar üzerine olan olumsuz etkilerini artırdığı bilinmektedir. Çevresel zenginleşmenin (ÇZ) ise öğrenme ve hafızayı geliştirdiği deneysel çalışmalarla kanıtlanmıştır. Çalışmamızda kronik öngörülemeyen hafif stres (KÖHS) protokolü uygulanan yaşlı sıçanlarda ÇZ'nin kortikosteronu, çeşitli beyin bölgelerindeki stresle ilgili gen ekspresyonlarını, öğrenmeyi olumlu yönde etkileyip etkilemeyeceği araştırılmıştır. Zenginleştirilmiş ve standart kafeslerde barındırılan yaşlı sıçanlara KÖHS uygulandıktan sonra hipotalamus, amigdala, prefrontal korteks ve hipokampusta glukokortikoid reseptörü (GR), kortikotropin salgılatıcı hormon (CRH), kortikotropin salgılatıcı hormon reseptörü 1 (CRHR1) ekspresyon seviyeleri belirlenmiştir. Sıçanlara kognitif ve davranış değerlendirmesi amacıyla Morris su labirenti (MWM), yeni obje tanıma testi (NOR), zorunlu yüzme testi (FST) ve yükseltilmiş artı labirent testi (EPM) uygulanmıştır. Stres grubunda zamana bağlı olarak vücut ağırlıklarının azaldığı gözlenmiştir. Stres uygulanan sıçanlar, EPM'de daha fazla mesafe kat etmiştir. MWM'de stres, barınma ve zaman etkileşiminin sıçanların öğrenme alıştırmalarındaki platformu bulana kadar yüzdüğü mesafe üzerinde etkisi gözlenmiştir. Stres uygulaması hipotalamus ve amigdalada GR gen ekspresyonu ayrıca hipotalamusta CRHR1 gen ekspresyonunu azaltmıştır. Çevresel zenginleştirme, amigdalada CRH gen ekspresyonunu arttırırken hipokampusta azaltmıştır. Kronik stres ve çevresel zenginleştirmenin beyin bölgesine spesifik değişimler oluşturduğu böylece yaşlılarda da nörobiyolojik ve kognitif fonksiyonları etkilediği sonucuna varılmıştır. Bu yönüyle çalışmamızın yaşlanma ile ilgili nörobiyolojik ve nörodejeneratif araştırmalara katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Stres, çevresel zenginleştirme, yaşlanma, öğrenme, davranış.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TDK-2020-35146

ABSTRACT

ORAN, D.S. (2022). Effects of stress and environmental enrichment on behavior, learning of eldery rats and some neurobiological markers in the brain. İstanbul University-Cerrahpasa, Institute of Graduate Studies, Department of Physiology. Doctoral Thesis. Istanbul.

Aging has been shown to increase the level of anxiety and negatively affect the learning and memory functions in rats. Stress also increases the negative effects of aging on cognition and behavior. Experimental studies showed that environmental enrichment (EE) improves learning and memory. We investigated whether EE would positively affect the corticosterone, stress-related gene expressions in various brain regions, and learning in elderly rats undergoing chronic unpredictable mild stress (CUMS). After CUMS was applied in elderly rats housed in enriched and standard cages, glucocorticoid receptor (GR), corticotropin-releasing hormone (CRH), corticotropin-releasing hormone receptor 1 (CRHR1) expression levels were determined in the hypothalamus, amygdala, prefrontal cortex, and hippocampus. For the cognitive and behavioral evaluation, Morris water maze (MWM), new object recognition test (NOR), forced swimming test (FST) and elevated plus maze test (EPM) were performed. In the stress group, it was observed that body weights decreased over time. Stress-induced rats travelled more distance in EPM. In the Morris water maze, the interaction of stress, housing, and time had an effect on the distance swum by rats to find the platform in acquisition trials. Stress application reduced the GR gene expression in the hypothalamus and amygdala. Stress application reduced the CRHR1 gene expression in the hypothalamus. EE increased the CRH gene expression in the amygdala but decreased it in the hippocampus. Chronic stress and environmental enrichment caused brain region-specific changes and thus affected the neurobiological and cognitive functions in the elderly. In this respect, our study will contribute to neurobiological and neurodegenerative studies on aging.

KeyWords: Stress, environmental enrichment, aging, learning, behavior.

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. TDK-2020-35146

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Stres; sağlığa zararlı zorlamalar, enfeksiyon ve fizyolojik dengeyi bozacak anormal durumlara karşı organizmanın tepkisi olarak tanımlanmakta olup, birçok bilişsel ve fizyolojik sorunlara neden olmaktadır (Szabo ve ark., 2012). Stres, öğrenme ve hafıza gibi bilişsel süreçleri nöron özelliklerini değiştirerek etkilemekte ve canlıların yaşam kalitesi üzerinde olumsuz rol oynamaktadır (Kim ve Diamond, 2002). Kronik strese maruz kalma, hayvanlarda hipokampus (HC), prefrontal korteks (PFC) ve amigdala (A) gibi çeşitli beyin bölgelerinde fonksiyonel ve morfolojik bozulmalara neden olmakta (Lupien ve ark., 2009) ve bu değişiklikler; öğrenme, hatırlama, hafızada tutmanın yanı sıra karar verme ve davranışlar üzerinde de olumsuz etkiler oluşturmaktadır (Herman ve ark., 2005; McEwen, 2006). Stres ayrıca, yaşlanmayla birlikte görülen; nöronal yapılardaki dejenerasyonun, bilişsel fonksiyonlar ve periferik dolaşımdaki bozulmanın şiddetini arttırmaktadır. Özellikle stres hormonlarına uzun süre maruz kalmanın yaşlanmanın etkilerini arttırdığı bilinmektedir (Aguilera, 2011; Yau ve ark., 1995).

Stres ile hipotalamo-hipofiz-adrenokortikal (HPA) ekseni aktive olur. Organizmanın strese yanıtı, hipotalamusun paraventriküler çekirdeğindeki (PVN) kortikotropin salgılatıcı hormon (CRH) nöronları tarafından başlatılır. PVN'de CRH nöronları tarafından oluşturulan uyarılar hipotalamusun median eminensine ulaşır. Buradan, hipofizer portal sistemin primer kapiller pleksusundan CRH salgılanır, CRH ön hipofiz bezine taşınarak buradan adrenokortikotropik hormon (ACTH) salgılanmasına neden olur (Guyton ve Hall, 2013 pp. 897-898). Adrenokortikotropik hormon da adrenal kortekste glukokortikoidlerin (insanda kortizol, kemirgenlerde kortikosteron) sentezini ve salgılanmasını sağlar. Salgılanan glukokortikoidler beyin de dahil olmak üzere çoğu organdaki reseptörlerine bağlanır (Myers ve ark., 2012). Reseptörlere bağlanan glukokortikoidler; hipotalamusta CRH ekspresyonunu, ön hipofiz bezinde ACTH ekspresyonunu baskılarlar (Guyton ve Hall, 2013 pp. 931-933; Herman ve ark., 2005). Hipotalamo-hipofiz-adrenokortikal (HPA) ekseninin aktivasyonu ve inhibisyonu, stresörün etki süresine ve yoğunluğuna göre değişir (Herman ve ark., 2016).

Akut stres, HPA stres yanıtının aktivasyonunu sağlar ve stresörün etkisi azaldıktan sonra gerçekleşen geri bildirim sonucunda stres yanıtı etkin bir şekilde sonlandırılır

(Herman ve ark., 2016). Stresör, tüm sistemi aktive ederek hızlı bir şekilde kortikosteron salgılanmasını sağlar. Kortikosteron da stresin zararlı etkilerini engellemek için metabolik etkileri başlatır. Sonrasında kortikosteron, hipotalamus ve hipofize direkt negatif geri bildirim sağlayarak plazma kortikosteron konsantrasyonunun azaltılmasını sağlar. Kronik stres durumunda ise stresörler kortikosteronun negatif geri bildirim etkisini bozabilir ve uzun süreli kortikosteron salgılanmasına neden olabilir (Guyton ve Hall, 2013 pp. 932-933). Organizmada stres yanıtının süresi uyaran süresine, şiddetine ve geri bildirime bağlıdır (Herman ve ark., 2016). Dolaşımdaki glukokortikoidlerin normal yaşam fonksiyonu için gerekli olduğu bilinmekle birlikte (Selye, 1974), fazla salgılandıklarında merkezi sinir sistemi üzerinde olumsuz etkileri vardır (de Kloet ve ark., 1999). Glukokortikoid düzeylerindeki artış, hipokampal atrofiye, nöronal ölüme, hipokampal nöronların erken yaşlanmasına ve bellek fonksiyonlarının bozulmasına neden olmaktadır (Sapolsky, 1999). Ayrıca yaşlanma ile merkezi sinir sistemindeki glukokortikoid reseptörü sayısı ve HPA ekseninin glukokortikoid geri bildirim mekanizmasına duyarlılığı azalmaktadır. Yaşlılarda negatif geri bildirime duyarlılığın azalması, hipokampusta glukokortikoid reseptörü (GR) ve mineralokortikoid reseptörü (MR) azalması ile ilgilidir (Jacobson ve Sapolsky, 1991).

Yapılan deneysel çalışmalarda stres kaynaklı kaygı artışlarının, gençlere kıyasla yaşlı kemirgenlerde daha belirgin olduğu (Shoji ve Mizoguchi, 2010) ve bu durumun HPA eksenindeki yaşla ilgili değişikliklerden kaynaklandığı düşünülmektedir (Aguilera, 2011). Hem klinik hem de deneysel çalışmalarda dolaşımdaki glukokortikoid seviyelerinin yaşla birlikte arttığı tespit edilmiştir (Gupta ve Morley, 2014; Meaney ve ark., 1992; Sapolsky ve ark., 1986). Stres ayrıca depresyon ve Alzheimer hastalığı gibi nörodejeneratif bozuklukların gelişmesi ile de ilişkilendirilmiştir (Carroll ve ark., 2011).

Çevresel zenginleşmenin (ÇZ) öğrenme ve hafızayı geliştirdiği, başarılı bilişsel yaşlanmayı olumlu yönde etkilediği yapılan deneysel çalışmalarla kanıtlanmıştır (Cortese ve ark., 2018; Harati ve ark., 2011; Speisman ve ark., 2013). Çevresel zenginleşme, artan beyin plastisitesi ve nörogenezini modellemek için kemirgenlerde en sık kullanılan deneysel ortamdır (Cortese ve ark., 2018; Speisman ve ark., 2013). Zenginleştirilmiş ortamlarda kemirgenler, daha büyük gruplar halinde barındırılır. Zenginleştirme materyali olarak çeşitli karmaşık nesneler ve mekansal yapılandırmalar kullanılır. Böylece ÇZ ile kemirgenlere daha karmaşık sosyal etkileşimler için fırsat sağlanmaktadır

(Bakos ve ark., 2009). Gelişmiş sosyal ve bilişsel uyaranlara sahip zenginleştirilmiş çevrelerin, hipokampusta GR ekspresyonunu arttırdığı, CRH'nin hipotalamik sentezini düzenlediği ve strese karşı HPA yanıtını değiştirdiği, dentat girusta nörogenezi arttırdığı bildirilmiştir (Fox ve ark., 2006; Meaney ve ark., 1988; van Praag ve ark., 2000). Ayrıca beyin ağırlığını, dendritik dallanmayı ve sinaptogenezi de arttırdığı bilinmektedir (Leggio ve ark., 2005; Rossi ve ark., 2006).

Yetişkin sıçanlarda ÇZ'nin kronik stresin zararlı etkilerini hafiflettiği bilinmektedir (Hutchinson ve ark., 2012; Leggio ve ark., 2005). Kemirgenlerin erken yaşta ÇZ'ye maruz kalmaları yaşam boyu ÇZ'den daha fazla faydalanmasını sağlamaktadır (Harati ve ark., 2011). ÇZ'nin başlangıç zamanı ve süresi, yaşlılık dönemindeki etkilerini değiştirebilir. Yaşam boyu ÇZ'ye maruz kalan yaşlanmış sıçanlar, geç dönemde ÇZ'ye maruz kalan yaşlanmış sıçanlardan daha iyi performans göstermektedir. Geç dönemde uygulanan ÇZ erişkin dönemde uygulanan kadar faydalı olmasa da yaşa bağlı bellek kaybını hafifletmektedir (Fuchs ve ark., 2016). Bu durum geç dönemde başlanan ÇZ uygulamalarınından da olumlu sonuç alındığını göstermektedir (Kobayashi ve ark., 2002; A. Kumar ve ark., 2012; Speisman ve ark., 2013).

Çalışmamızın amacı, kronik öngörülemeyen stresin beyin üzerindeki ve davranışlardaki muhtemel olumsuz etkilerinin çevresel zenginleştirme uygulaması ile değişip değişmeyeceğinin araştırılmasıdır. Bu amaçla standart kafeslerde ve çevresel zenginleştirme ortamında barındırılan yaşlı sıçanlara hafif stres protokolü uygulandıktan sonra hipotalamus, hipokampus, amigdala ve prefrontal korteks gibi stres ve davranışlarla ilgili beyin bölgelerinde, vücutta stres yanıtının oluşumunda rol alan moleküler mekanizmalar incelendi. Ayrıca davranış deneyleriyle sıçanların öğrenme ve hafıza yetenekleri değerlendirildi.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Stresin Tanımı

Stres; sağlığa zararlı zorlamalar, enfeksiyon ve fizyolojik dengeyi bozacak anormal durumlara karşı organizmanın tepkisi olarak tanımlanmaktadır. Organizmanın stres tepkisini vermesi için, mevcut etkeni stres faktörü olarak algılaması gereklidir. Stres oluşturan bu etmenlere stresör denir (Guyton ve Hall, 2013).

Fizyolojik stresin üç bileşeni vardır. Bu bileşenler; stres faktörleri, stres faktörlerinin oluşturduğu kimyasal veya fiziksel dengesizlik ve vücudun buna adaptasyon yeteneğidir. Vücudun stresörler karşısında stabilitesini koruma (adaptasyon) yeteneğine *allostaz* denir (Selye, 1946). Allostaz sırasında otonom sinir sistemi, HPA ekseni, kardiyovasküler, metabolik ve immün sistemler internal ve eksternal strese karşı vücudu korur. Allostaz bozulduğunda stresin olumsuz etkileri ortaya çıkmaktadır (McEwen ve ark., 2011).

2.2. Stresin Tarihçesi

Stresin kelime anlamı Latince *estrictia* ve Fransızca *estree* kelimelerinden köken almıştır. İngilizceye 14. yüzyılda gerilme ve zorlanma olarak girmiştir. On altıncı yüzyılda baskı ve fiziksel yaralanma anlamlarında da kullanılan stres, 17. yüzyılda felaket, dert, bela gibi anlamlarda kullanılmış, içsel bir duruma gönderme yapılmaya başlanmıştır (Hayward, 2005). Stres terimi, bilimsel olarak ilk kez 17. yüzyılda fizikçi Robert Hooke tarafından nesne ve uygulanan dış güç arasındaki ilişkiyi açıklamak için kullanılmıştır. Stresin canlı organizmalar ile ilişkilendirilmesi biyolog Walter Cannon (1914) ile olmuştur. Cannon stresin oluşumunu, canlının doğal dengesinin çevresel uyaranlar tarafından bozulması olarak tanımlamıştır (Cannon, 1914). Strese ilişkin *homeostasis* ve *savaş ya da kaç sendromu* tanımları da ilk kez Cannon tarafından kullanılmıştır (Cannon, 1922). Cannon, ağrıya veya majör duygulara verilen nöroendokrin tepkinin katekolaminlerin salınımıyla sınırlı olduğunu savunmuştur (Cannon, 1914).

Stres konusunda ilk çalışanlardan olan Kanadalı fizyolog Selye (1936), *Genel Uyum Sendromu*, stres ve stresör tanımlaması yapmıştır. Stresi uyaranlara karşı organizmanın verdiği non-spesifik tepki, stresörü ise organizmada bir dizi tepki yaratan

çevresel uyaranlar olarak tanımlamıştır (Selye, 1936). Selye, stres yanıtında HPA ekseninin kritik rolünü gösteren ilk bilim insanıdır (Szabo ve ark., 2012).

Canon ve Selye'nin ardından stres kavramı 1940'lardan itibaren klinik alanlara ve sonrasında sosyoloji ve psikoloji alanlarına girmiştir. Wolff 1953'de stresi, tehdit içerikli dış uyarana karşı bedenin verdiği tepkiler olarak tanımlamıştır (Wolff, 1953).

Mason, stresörlerin ancak olumsuz olarak algılanması durumunda stres tepkilerini tetiklediğini savunmuştur (Mason, 1971). Böylece Selye'nin stresörlere non-spesifik yanıtıyla ilgili tanımlamaları ilk kez sorgulanmıştır. Stres yanıtında bireysel farklılıkların oluşabileceği belirtilmiştir (Mason, 1971). Mason, farklı stresörlere cevap olarak HPA eksen aktivitesinin artabileceği, azalabileceği veya değişmeyebileceğini bildirmiştir (Mason, 1975). Kaygı/korku gibi bir tepkinin ortaya çıkmasında farklı stresörlere karşı benzer nöroendokrin mekanizmaların rol oynadığını savunmuştur (Mason, 1971; Munck ve ark., 1984).

Pozitif ve negatif stres ayrımı ilk kez Levi tarafından yapılmıştır (Levi, 1971). Ardından Selye, stres tepkisinin organizmanın iyiliğine mi kötülüğüne mi olduğunu ayırt etmek için *distress* ve *eustress* terimlerini kullanmıştır. Stresin her zaman kaçınılması gereken bir durum olmadığı, doğuştan gelen dürtüler ile ilişkili olduğu ve gerekliliği açıklanmıştır. Homeostatik sistemin ideal koşulları için iyi strese (eustress) ihtiyaç olduğu belirtilmiştir. Eustresin olumlu duygulara neden olan, duygusal ve entellektüel düzeyde canlının büyümesini, gelişimini arttırabilen stres durumu olduğu ifade edilmiştir (Selye, 1974). Selye, stresi stresöre karşı organizmada oluşan non-spesifik yanıtlar olarak tanımlamıştır. Ancak Stephens ve Henry, fizyolojik stres tepkilerinin de bir şekilde spesifik olduğunu öne sürmüştür. Bu spesifikliğin durum özelinde değerlendirilmesi gerekliliğini savunarak; tehdit edici bir stresörün, hiçbir kontrol mümkün olmadığında kortikotropik ekseni harekete geçirirken, bir kontrol mümkün olduğunda ise sempatik sinir sistemini tetiklediğini ileri sürmüştür (Stephens ve Henry, 1977). Dantzer ve Mormède, stres tepkisinin fizyolojik ve davranışsal olduğunu, stresin anlaşılması için bu bileşenler arasındaki etkileşimlerin anlaşılmasının gerekli olduğunu öne sürmüşlerdir. Fizyolojik tepkiler stres etmenine özgü değilken davranışsal tepkilerin stresöre özgü olduğunu belirtmişlerdir. Böylece davranışsal tepkilerin iki zıt modu olan pasif mod (ör: donma) ve aktif mod (ör: savaş veya kaç) tanımlanmıştır (Dantzer ve Mormède, 1983).

2.3. Stres Etmenleri ve Stresin Sınıflandırılması

Organizmanın stres tepkisi vermesine neden olan, homeostazisi tehdit eden stresörler, yapısal özelliklerine göre fiziksel, sosyal ve psikolojik olmak üzere üçe ayrılır (Pacák ve Palkovits, 2001).

1. Fiziksel: Travma, cerrahi girişimler, gürültü, şiddetli egzersiz, çevre kirliliği, ısı, nem, yiyecek kısıtlanması, hareketsizlik
2. Sosyal: Birey çevre ilişkisi/çatışması, alışılan çevreden uzaklaşma
3. Psikolojik: Fiziksel ve sosyal etmenlerin sonucu olarak ya da kendiliğinden ortaya çıkan, hayal kırıklığı, izolasyon gibi genellikle yinelenen etmenler

Stresöre maruz kalınan süreye göre yapılan diğer sınıflandırma; akut (tek, aralıklı ve sınırlı zamanda maruziyet) ve kronik (aralıklı ve uzun süreli maruziyet) şeklindedir (Paca´k ve ark., 2001).

Deneysel çalışmalarda immobilizasyon, zorunlu yüzme, yiyecek kısıtlaması, ağrılı uyaran ve ses gibi farklı stresörler kullanılmaktadır. Bu stresörler bir kere veya tekrarlı uygulanarak akut veya kronik stres etkileri değerlendirilmektedir (Aleisa ve ark., 2006; Eraslan ve ark., 2015; Luine ve ark., 1996; Shoji ve Mizoguchi, 2010).

Kronik strese maruz kalındığında organizma zamanla stresörü tanır ve tekrarlanma sayısına bağlı olarak stresöre karşı koruyucu mekanizmalar geliştirebilir. Öngörülebilir hale gelen stres ile başa çıkılması kolaylaşmış olur ve strese adaptasyon gerçekleşir. Adapte olunamayan stresörler ise çoğunlukla şiddetli stres kaynaklarıdır. Strese adaptasyonu engellemek ve doğal şartları taklit etmek amacıyla kronik öngörülemeyen hafif stres (KÖHS) modeli oluşturulur (Willner ve ark., 1987). Bu modelde farklı stresörler deney hayvanının öngöremeyeceği sırayla uygulanmalıdır ve benzer stresörlerin (süre, içerik, etki vb.) ard arda uygulanmamasına dikkat edilmelidir (Willner, 2005).

2.4. Stresin Etki Mekanizması

Stres, homeostazise yönelik tehdit oluşturan stresöre karşı oluşan, spesifik olmayan bir tepkidir. Organizma, stres etmenine uyum sağlamak için bir dizi davranışsal ve fiziksel tepkiler geliştirmektedir (Selye, 1976). Duyu sistemlerinden stres etkeni ile ilgili alınan bilgiler, nöral ve nöroendokrin sistemler tarafından beyne iletilir. Stres tepkisi, otonom sinir sisteminde başlar. Sempato-adrenal-meduller (SAM) ve limbik HPA eksen stres sırasında homeostazisin sürdürülmesi ve oluşan değişikliklerin eski haline

getirilmesinde rol alan birincil sistemlerdir (Gunnar ve Quevedo, 2007). Sempato-adrenal-meduller eksenin uyarılmasıyla adrenal medulladan dolaşıma adrenalin ve noradrenalin salgılanır. Bunlar, kalp hızı ve kasılma kuvvetinin, periferik vazokonstriksiyonun artması ve enerji mobilizasyonunun sağlanması gibi fizyolojik etkilere neden olurlar (Ulrich-Lai ve Herman, 2009). Böylece bireyin tehdit yaratan stres etkeninden kaçması ya da onunla savaşması için gerekli şartlar fizyolojik olarak sağlanmış olur. Otonom sinir sisteminin sempatik bölümü ve limbik sistem tarafından regüle edilen bu sempatik aktivasyon, ilk olarak Cannon tarafından tanımlanmış ve savaş ya da kaç tepkisi olarak adlandırılmıştır (Cannon, 1922). Stres tepkisine verilen uzun süreli ikincil yanıt ise, HPA eksenin aktive olması ile başlar, endokrin, sinir ve immün sistemlerini etkileyerek devam eder. Bu sistemler sinirsel, hormonal ve inflamatuar stres yanıtını uyumlu hale getirmek için etkileşime girerler (McEwen ve ark., 2015; Ulrich-Lai ve Herman, 2009).

Strese yol açan uyarılar, neokorteks ve limbik sistem tarafından değerlendirilerek hipotalamusa iletilir. Hipotalamus, kısa süreli yanıt oluşturulması için otonom sinir sistemini uyarır. Uzun süreli ikinci yanıt ise, HPA ekseninin devreye girmesiyle oluşur. Hipotalamus uyarıldıktan sonra CRH salgılar. CRH ön hipofizden ACTH salgılanmasını sağlar. ACTH ise adrenal korteksten glukokortikoidlerin sentezi ve salgılanmasını uyarır (Guyton ve Hall, 2013 pp. 922-923). Endokrin sistemdeki bu değişiklikler, olumsuz sonuçları önleyen ve homeostazise yönelik olası tehlikelere organizmanın uyumunu sağlayan bir tepki olarak kabul edilir (Leonard ve Myint, 2009). Bu nedenle, ani bir stres etkenine karşı ortaya çıkan akut stres yanıtı, endokrin sistemin çoğunlukla koruyucu etkilerini içeren adaptasyon mekanizmasını aktive eder. Ancak tekrarlayan sürekli stres, HPA ekseninde uzun süreli değişiklikler ve patolojik sonuçlara yol açan zararlı değişikliklere sebep olabilir (de Kloet ve ark., 2005).

Stresöre verilen yanıt, genetik faktörlere ve stres ile başa çıkma stratejilerine bağlı olarak bireysel değişkenlikler gösterir (Leistner ve Menke, 2020). Stres tepkilerini düzenlemekten sorumlu olan limbik bölgeler, hafıza ve ödülden sorumlu alt bölgelerle beraber stres tepkisinin deneyimlere göre uyarlanmasını sağlar (Ulrich-Lai ve Herman, 2009). Bunun sonucunda allostaz ve adaptasyon oluşur. Zamanla, allostatik yük birikebilir ve stres etkenlerine aşırı maruz kalma nöral, endokrin ve bağışıklık sisteminde olumsuz etkilere neden olabilir (McEwen, 2006).

Genel Uyum Sendromu

Selye, bedenin stresli durumlarda verdiği üç aşamalı tepkiyi *Genel Uyum Sendromu* olarak tanımlamıştır. Bu kurama göre, organizmanın strese tepkisi alarm, direnme/adaptasyon ve tükenme olmak üzere üç evrede gelişmektedir. Bu tepki istemsizdir ve sırayla oluşur (Selye, 1946).

1. Alarm Evresi: Merkezi sinir sisteminin ve vücut savunma sistemlerinin harekete geçtiği evredir. Stresör hipofiz bezini ve sempatik sinir sistemini tetikler.
2. Direnme veya Adaptasyon Evresi: Stres koşulları devam ederse savaşarak veya kaçarak kurtulmak mümkün olmadığında organizma direnme evresine geçer. Yüksek düzeyde kortizol, norepinefrin ve epinefrin etkisiyle strese uyum sağlamaya çalışılır. Bu evre aşılırsa organizma normal koşullara döner.
3. Tükenme Evresi: Stres süreklilik gösterir ve adaptasyon başarılı olmaz ise telafi edici mekanizmalar yıkılır. Bu evrede artık immün sistem baskılanır, kalp, böbrek problemleri ve diğer bazı hastalıklar başlayabilir (Guyton ve Hall, 2013; Selye, 1946).

Sempatik Sinir Sisteminin Stres Yanıtı

Sempatik sinir sistemi, aşağıdaki gibi stres yanıtı oluşturur.

1. Arteriyel kan basıncının artması
2. Aktif olan kaslarda kan akımı artarken, hızlı motor aktivite için ihtiyaç duyulmayan (böbrekler, gastrointestinal sistem organları gibi) organlarda kan akımının azalması yani periferik dolaşımın değişmesi
3. Organizmada hücresel metabolizma hızının artması
4. Kan glukoz düzeyinin artması
5. Kasta ve karaciğerde glukolizin artması
6. Kas gücünün artması
7. Mental aktivitenin artması
8. Kan koagulasyon hızının artması

Sempatik sinir sistemi aktivasyonu ile oluşan tüm bu değişiklikler sonucunda, organizma normal şartlarda yapamayacağı, güçlü bir fiziksel aktivite gösterir. Sempatik sinir sistemi *fiziksel* veya *mental stres* ile uyarıldığında, amacının stres durumlarında vücuda fazladan bir işlev sağlamak olduğu söylenebilir. Bu durum *sempatik stres yanıtı*

olarak adlandırılır. Sempatik sistem özellikle bir çok emosyonel durumlarda kuvvetle aktive olur. Örneğin, genellikle hipotalamusun uyarılmasından kaynaklanan öfke durumlarında, sinyaller aşağıya doğru beyin sapı retikuler formasyonu üzerinden medulla spinalise iletilerek yaygın sempatik deşarjların oluşmasına neden olur ve sempatik tepkiler şekillenir. Sempatik sinir sisteminin büyük bölümünde aynı anda deşarjların olması, vücudun şiddetli bir kas aktivitesi gösterme becerisini birçok yoldan arttırmaktadır (Guyton ve Hall, 2013 pp. 738-739). Bu durum, *sempatik stres reaksiyonu* veya *savaş ya da kaç reaksiyonu* olarak da adlandırılır (Cannon, 1922). Hayvan yerinde kalıp kavga etmeye veya kaçmaya karar verir. Her iki olayda da sempatik stres reaksiyonu hayvanın sonraki aktivitelerinin daha güçlü olmasını sağlar (Guyton ve Hall, 2013 pp. 738-739).

Sonuç olarak, stres organizmanın savaş ya da kaç tepkisini göstermesine neden olur. Böylece organizma her iki durumda da hayatta kalmayı sürdürmeyi amaçlar. Strese verilen yanıt organizmanın hayatta kalabilmesi açısından vazgeçilmezdir (Ulrich-Lai ve Herman, 2009).

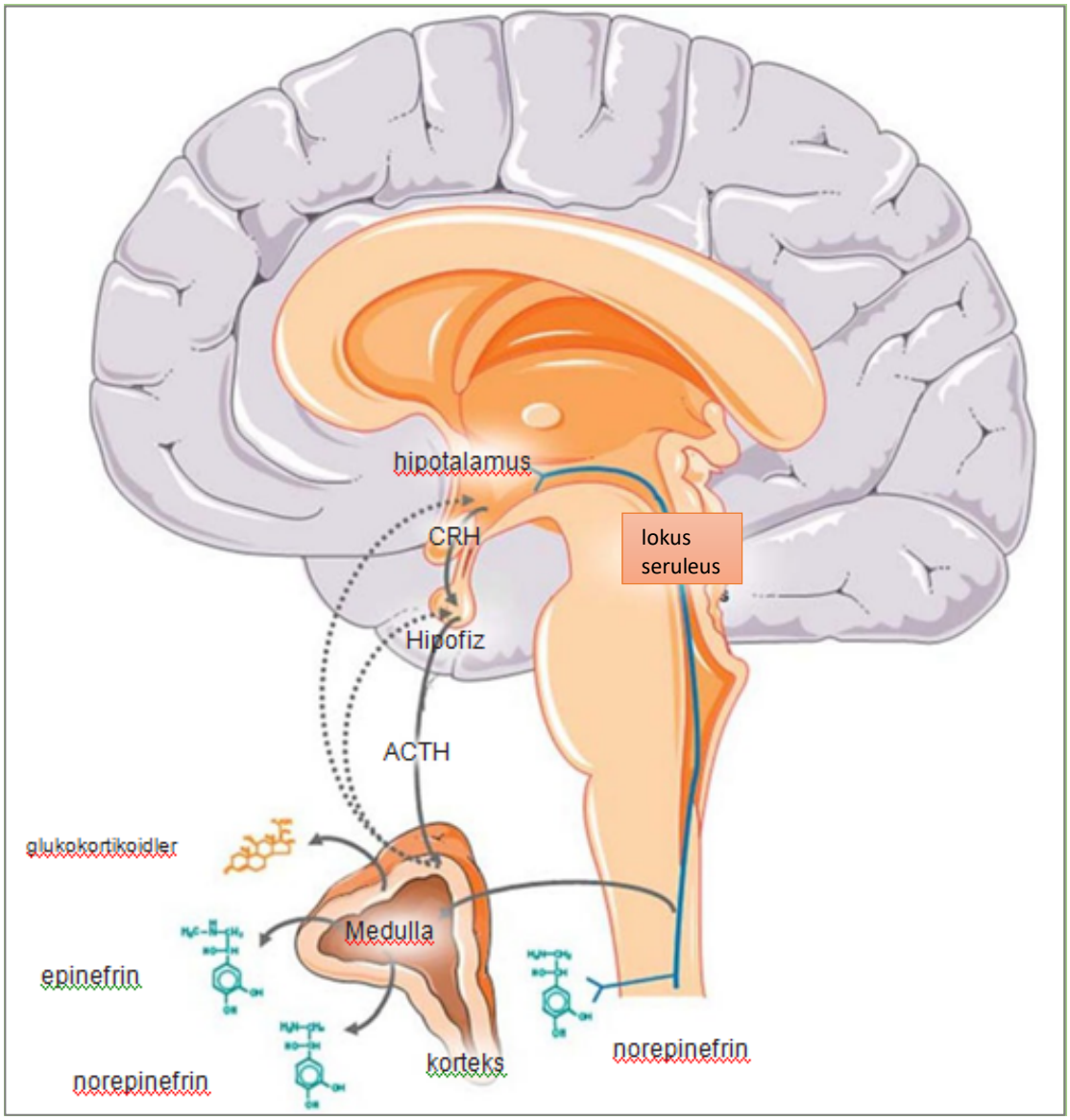
2.4.1. Stres Yanıtında Hipotalamik-Hipofiz-Adrenal Eksenin Rolü

Stres yanıtında HPA eksenin rolü büyüktür (Herman ve ark., 2005). Organizmanın stres tepkisini vermesi için stres kaynağını stres faktörü olarak algılaması gereklidir. Stres faktörü (stresör) hipotalamusta paraventriküler nukleus (PVN)'un parvoselüler nöronlarından CRH ve arjinin vasopressin (AVP) hormon salgılanmasını başlatır (Tafet ve Nemeroff, 2016). CRH, hipofizyal portal sistem yoluyla hipofiz ön lobuna ulaşır. Kortikotrop hücrelerini etkileyerek prekürsör molekül olan pro-opiomelanokortin (POMC)'den ACTH sentezini ve genel dolaşıma salgılanmasını sağlar (Breault ve Majzoub, 2003; Jacobson ve Sapolsky, 1991). CRH ana düzenleyicidir ancak CRH nöronlarının yaklaşık %50'sinde birlikte eksprese edilen AVP, CRH'nin ACTH salgılanması üzerindeki uyarıcı etkisini güçlendirir (Aguilera, 1998). ACTH, adrenal bezlerden glukokortikoidlerin salgılanmasını başlatır (Guyton ve Hall, 2013 pp. 922-923). Glukokortikoidler, glukokortikoid reseptörlerine bağlanarak etkilerini gerçekleştirirler (Reul ve de Kloet, 1985). Glukokortikoidler, HPA ekseninin negatif geri bildiriminde de rol alır: Glukokortikoid seviyesi yükseldiğinde, hipokampus ve hipotalamustaki kortikosteroid reseptörleri aracılığıyla CRH ekspresyonu baskılanır ve böylece negatif geri bildirim gerçekleşmiş olur (Şekil 2.1) (Herman ve ark., 2005).

Hipotalamik-hipofiz-adrenal eksenin geri bildiriminden iki kortikoid reseptörü sorumludur. Bu reseptörler mineralokortikoid reseptörü (MR) ve glukokortikoid reseptörü (GR)'dür. Bu reseptörler, beyinde stres yanıtının düzenlenmesinde rol oynayan amigdala, prefrontal korteks, hipokampus ve hipotalamus gibi bölgelerde bulunurlar (de Kloet ve ark., 2018; Herman ve ark., 2005; Reul ve de Kloet, 1985). Düşük bazal kortikosteron seviyelerinde kortikosteroidlerin çoğunlukla MR'ye bağlandığı, GR'nin ise sadece kortikosteron seviyeleri yüksek olduğunda yani stres sırasında etkinleştiği gösterilmiştir (de Kloet ve ark., 1998). Ayrıca hipokampusta glukokortikoidlerin reseptörlerine bağlanması, PVN ve HPA ekseni aktivitesine engel olan GABAerjik nöronları aktive eder (Tafet ve Nemeroff, 2016).

Stres kontrol edilemezse homeostaz sağlanamaz ve HPA eksenin düzensizliği oluşabilir. HPA eksendeki düzensizlik, negatif ve pozitif geri bildirim mekanizmalarında olası dengesizlik ile beraber GR duyarlılığındaki değişiklikten kaynaklanabilir. Glukokortikoid geri bildirim duyarlılığının artması veya azalması, periferik glukokortikoid konsantrasyonunun değişmesine neden olur (McEwen ve ark., 2015).

HPA ekseninin hiperaktivitesinin, yaşlanma ile ilişkili nöronal ve periferik bozulmaya katkı sağladığı bilinmektedir. Özellikle kronik stres sırasında stres tepkisinin sürmesi ve stres hormonlarına uzun süre maruz kalmanın zararlı etkilerinden dolayı yaşlanma etkilerinin de artması muhtemeldir (Aguilera, 2011).



Şekil 2-1 : Stres sistemi ve HPA ekseni negatif geri bildirim mekanizması

Chrousos'tan türkçeleştirilmiştir (Chrousos, 1995).

2.4.2. Stres Yanıtında Kortikotropin Salgılatıcı Hormonun Rolü

Kırk bir aminoasitli bir peptid hormon olan CRH, stresörlere yanıt olarak hipotalamus PVN'den salgılanır (Vale ve ark., 1981). Spesifik plazma membran reseptörleri (CRHR1 ve CRHR2) yoluyla ACTH ve glukokortikoidleri stimüle ederek strese karşı oluşacak davranışsal, otonomik ve hormonal yanıtları düzenler. CRH, hipotalamusun PVN'den başka, amigdalanın santral nukleusunda ve merkezi sinir sistemi arka beyin bölgelerinde, bağırsak, deri ve adrenal bezin çevresinde bulunur (Bale ve Vale, 2004). CRHR1 ve CRHR2 merkezi sinir sisteminde bulunurlar (Aguilera, 1998). Daha

yaygın olan CRHR1, serebral korteks, serebellum, bulbus olfaktoryus, medial septum, hipokampus, amigdala ve hipofiz boyunca dağılırken CRHR2, merkezi sinir sisteminde yoğunlukla lateral septum ve hipotalamusta bulunur (Bale ve Vale, 2004).

Stres etkeni ile karşılaşıldığında CRH, ACTH salgılanmasını uyarmak için hipofiz ön lobu kortikotrop hücrelerindeki CRHR1'e etki eder. CRH'ın CRHR1'e bağlanması, ön hipofiz kortikotroplarında cAMP içeriğini artıran adenilat siklaz aktivitesini uyarır. CRH, proopiomelanokortin türevi peptid sentezini ve cAMP-protein kinaz A yoluyla ACTH salgılanmasını sağlar (Breault ve Majzoub, 2003). Enerji mobilizasyonu ve fizyolojik dengeyi korumak üzere HPA eksenini ve sempatik sinir sistemini uyarmaktadır. CRH, HPA eksenine ek olarak, hipotalamik ve ekstrahipotalamik bölgelerdeki reseptörlere de etki ederek homeostatik dengeyi sağlamaktadır (Aguilera, 1998; Bale ve Vale, 2004). HPA eksenindeki rolünün haricinde, davranışsal aktivite, gıda alımı, üreme ve büyüme düzenlenmesi ile otonom fonksiyonları vardır (Breault ve Majzoub, 2003).

Beyinde limbik bölgelerde özellikle amigdaladaki CRH sisteminin regülasyonunun bozulmasıyla anksiyete yanıtında değişiklik olur (Bale, 2005; Reul ve Holsboer, 2002). Stres amigdalada CRH artışına neden olabilir bu da muhtemel anksiyojenik davranışların ortaya çıkmasına yol açar (Gray ve Bingaman, 1996). Amigdalada bulunan CRHR1, strese verilen normal tepkilere aracılık eder. Anksiyetenin düzenlenmesinde de rol oynar (Savarese ve Lasek, 2018). CRHR2 ise CRHR1'in bu etkilerini hafifletmek için bir inhibitör veya modülatör reseptör olarak çalışmaktadır (Bale ve Vale, 2004).

Kortikotropin salgılatıcı hormon, stresle ilgili birçok aşamada mediatör görevi görür. Paraventriküler çekirdekte CRH, ön hipofizden ACTH salınımını düzenlerken, amigdalada CRH, plastisiteyi etkileyerek, strese karşı davranışsal ve otonomik tepkilerin kontrolünde görev alır (Matys ve ark., 2004). Ekstrahipofizyal bölgelerde sinaptik olarak salınan CRH, HPA ekseninin endokrin tepkilerini yukarıda açıklandığı gibi tamamlayarak stresörlere davranışsal, bilişsel ve otonomik cevapları organize eder (de Kloet ve ark., 2005).

Kortikotropin salgılatıcı hormon, AVP'nin aksine, strese karşı HPA ekseni yanıtı oluşması için elzemdir (Bale ve Vale, 2004). HPA ekseninin aktivasyonu, CRH transkripsiyonundaki hızlı ve geçici artışlarla sağlanır. Bu salgılanma, CRH mRNA ve peptid seviyelerini yenilemek için gereklidir (Aguilera, 1998). Hipotalamusta artan CRH

üretimi, HPA ekseninin hiperaktivasyonunu uzun süre koruyabilir (Herman ve ark., 2016). CRH transkripsiyonunun sürekliliği, peptidin aşırı üretimine ve bunun sonucunda HPA ekseninin aşırı uyarılmasına neden olur (Aguilera, 2011). Stres sonucunda aşırı CRH üretimi, öğrenme güçlüğü ve hipokampal nöronların atrofisine yol açar. Ancak bu durumun strese neden olan uyaranın veya CRH nöron hiperaktivitesinin kesilmesiyle geriye döndüğü gösterilmiştir (Meijer ve ark., 2005). Beynin zararlı CRH seviyelerine maruz kalması, muhtemelen CRH üretimini sınırlayan mekanizmaların bozulmasıyla ilişkilidir. Bu nedenle, stresle ilişkili bozuklukların patofizyolojisini ve terapötik yaklaşımlarını daha iyi anlamak için CRH transkripsiyonunu kontrol eden mekanizmaların aydınlatılması gerekmektedir.

2.4.3. Stres Yanıtında Glukokortikoidlerin Rolü

Glukokortikoidler, adrenal bezlerden günlük ritimde veya stres durumunda salgılanan steroid hormonlardır. HPA ekseninin aktivasyonuyla salınan ACTH, adrenal korteksten stres adaptasyonu için gerekli olan glukokortikoid salgılanmasına yol açar (Guyton ve Hall, 2013 pp. 929-931). Glukokortikoidler, günlük aktivitelerin yürütülmesi için enerji homeostazının düzenlenmesinde rol oynar (Herman ve ark., 2016). Glukokortikoidlerin kardiyovasküler, metabolik, homeostatik ve immünolojik sistemler ile ilgili görevleri de vardır. Dolaşımdaki glukokortikoidler, çoğu periferal dokuda ve beyinde bulunan spesifik reseptörleri üzerinden etki ederek, stresle başa çıkmak için gerekli olan metabolik ve nöromodülatör değişiklikleri başlatırlar (Mcewen ve ark., 2007). Karbonhidrat, protein ve yağ metabolizmasını etkileyerek glukoneogenezin uyarılması, hücresel proteinin azaltılması, yağ asitlerinin serbestlenmesi gibi önemli metabolik işlevlerde de etkin rol oynarlar (Guyton ve Hall, 2013 pp. 928-930). İnsanda salgılanan en önemli glukokortikoid kortizol iken sıçan ve farede kortikosterondur. Dolaşıma salınan kortikosteronun büyük bir bölümü kortikosteroid bağlayıcı globuline bağlı olarak sistemde bulunmaktadır. Sadece serbest kortikosteron spesifik reseptörlerine (MR ve GR) bağlanabilir (Buckingham, 2006). Glukokortikoidlerin dokular üzerindeki etkisi, dokulardaki GR seviyesine bağlıdır (Simons, 2008). Glukokortikoidlerin MR'ye daha yüksek afinite ile bağlandığı bilinmektedir (Funder, 1997). Bu nedenle, glukokortikoidlerin dokuya özgü etkilerinin ortaya çıkabilmesi için GR'yi aktive edebilecek yüksek seviyelerde glukokortikoid konsantrasyonunun sistemde bulunması gerekmektedir (Kitchener ve ark., 2004; Reul ve de Kloet, 1985).

HPA ekseninin uyarılmasının son ürünü olan glukokortikoidler, hipotalamus ve hipofiz üzerinde negatif geri bildirim etkisine sahiptir. Bu etkileri; hipotalamusta CRH ve ön hipofizden ACTH salgılanmasını azaltarak gerçekleştirir (Guyton ve Hall, 2013 p. 932). Hipofizden ACTH salgılanmasının durdurulmasını POMC transkripsiyonunu doğrudan inhibe ederek sağlarlar (Autelitano ve ark., 1989; Dallman ve ark., 1987). Glukokortikoidler, CRH nöronundaki reseptör seviyelerini değiştirerek CRH transkripsiyonunu etkilerler ve böylece inhibisyonunu sağlarlar (Aguilera, 2011). Her iki geri bildirim mekanizması da plazmadaki glukokortikoid konsantrasyonunu düzenlemeye yardım etmektedir (Guyton ve Hall, 2013 p. 932).

Glukokortikoidler, normal yaşam fonksiyonları için gerekli olsalar da fazla salgılanmaları durumunda merkezi sinir sistemi üzerinde olumsuz etkilere sahiptirler (Sapolsky, 1999). Adrenal glukokortikoidlerin salgılanması pulsatildir, diurnal olarak gerçekleşir ve bazal koşullar altında meydana gelir. Pulsatil salgılanma ile glukokortikoid seviyeleri stres durumunda da değişmeyerek devamlılığını korur. Strese maruz kalma sonucu oluşan kortikosteron yanıtının büyüklüğü, stresin ultradian ritmin hangi aşamasına denk geldiğine göre değişir. Yükselen fazda uygulanan stresörler düşme fazında uygulananlara göre daha fazla glukokortikoid tepkisine neden olur. Pulsatil salgılanmanın bozulması GR sinyalinin bozulmasına sebep olacağı için pulsatil salgılanma HPA aktivitesinde önemli bir role sahiptir (Russell ve ark., 2015). Glukokortikoidlerin stres süresince ve sonrasında salgılanmaları, hipokampal atrofiye, hipokampal nöronların erken yaşlanmasına, dendritlerinde atrofi gelişmesine ve bellek fonksiyonlarının bozulmasına neden olur (Sapolsky, 1999). Strese neden olan durum bir süre sonra sonlanırsa olumsuz etkiler gerileyebilir. Ancak uzun süreli strese maruziyet hipokampal nöronların ölümü ile sonuçlanır (Kerr ve ark., 1991). Glukokortikoidlerin ve CRH'ın katabolik etkilerine uzun süre maruz kalmayı engellemek için glukokortikoid geri bildirim mekanizmaları aktive olmalıdır (Myers ve ark., 2012). Ancak uzun süreli strese maruziyet nöronal hasar ve ölüme yol açarak negatif geri bildirim mekanizmalarını bozar. Birçok çalışma ile depresyon, anksiyete gibi semptomlarda HPA ekseni düzensizliği ve glukokortikoid dengesizliklerinin nedenleri araştırılmıştır. Bu bozukluklarda HPA ekseninin hiperaktivitesinin, stres tepkisinin sonlandırılamaması ve strese karşı aşırı duyarlılık reaksiyonları sonucu gerçekleştiği düşünülmektedir. Bunun da GR aktivitesindeki ve negatif geri bildirim mekanizmasındaki bozukluklardan kaynaklandığı belirtilmektedir (de Kloet ve ark., 2005; Holsboer, 2000).

2.5. Kronik Stres ve Kronik Stres ile İlişkili Davranış, Öğrenme ve Nörodejeneratif Bozukluklar

Kronik stres yanıtı, stres etmenine uzun süre maruz kalınması veya tekrarlı maruziyet durumunda metabolizmanın vermiş olduğu fizyolojik yanıtlardır (Jacobson ve Sapolsky, 1991).

Kronik stresin; hafıza ve öğrenme bozuklukları, depresyon, anksiyete, kalp krizi, yüksek kolesterol, inme, migren, dikkat dağınıklığı, uykusuzluk, diyabet gibi birçok olumsuzluğa neden olduğu bilinmektedir. Hayvanlarda kronik strese maruz kalmanın, hipokampus, prefrontal korteks ve amigdala gibi çeşitli beyin bölgelerinde fonksiyonel ve morfolojik değişikliklere yol açtığı saptanmıştır (Lupien ve ark., 2009).

Deneysel çalışmalarda kronik stres oluşturmak için çok sayıda stres etkeni kullanılmaktadır. Aynı stres etkenine tekrarlı maruziyet homotipik stres, farklı stresörlere maruziyet ise heterotipik stres olarak tanımlanır. Homotipik stres uygulamaları sonucu azalan glukokortikoid tepkisi nedeniyle adaptasyon gerçekleşebilir (Dhabhar ve ark., 1997). Bunun yanı sıra stresör ne kadar şiddetliyse HPA ekseni tepkisi o kadar fazla oluşacaktır ve dolayısıyla adaptasyon daha az belirginleşecektir (Natelson ve ark., 1988; Rabasa ve ark., 2011). Kronik öngörülemeyen hafif stres (KÖHS) modeli, kemirgenlerde kronik stres kaynaklı davranış değişikliklerini tetiklemek için Willner tarafından geliştirilmiştir (Willner ve ark., 1987). Bu modelde kemirgenlere günlük randomize olarak farklı stresörler, günün farklı saatlerinde uygulanmaktadır. Aynı stresörün ard arda kullanılmamasına dikkat edilen bu model, diğer kronik stres modellerinden farklı olarak strese adaptasyonu engellemektedir (Willner, 1997). Heterotipik stres uygulamalarına karşı HPA ekseninin tepkisi homotipik stres uygulamalarına göre daha belirgindir. Buna rağmen bu durum, hayvanın stres uygulamalarına belirli bir seviyeye kadar adapte olmayacağı anlamına gelmemektedir (Flak ve ark., 2011; Herman ve ark., 2016).

2.5.1. Kronik Stresin Davranışlar Üzerine Etkileri ve Değerlendirme Yöntemleri

Deney hayvanlarının çeşitli hafif stresörlere uzun süre maruz kalması, hayvan davranışlarında önemli değişikliklere neden olur (Crema ve ark., 2013). Kronik strese bağlı değişikliklerin etkileri; öğrenme ve hafıza ile karar verme ve duygusal tepkiler üzerinde görülmektedir (Dias-Ferreira ve ark., 2009; McEwen, 2006). Kronik stresin öğrenme ve hafızayı olumsuz etkilediğine dair çok sayıda çalışma literatürde mevcuttur (Hölscher, 1999; Lupien ve ark., 2009; McEwen ve ark., 2015; Sandi, 2004).

Deneysel çalışmalarda; anhedoni tespiti için sükroz tercih testi (STT), hipokampus bağımlı öğrenme ve hafızanın değerlendirilmesi amacıyla yeni obje tanıma testi (Novel object recognition; NOR) ve Morris su labirenti (Morris water maze; MWM) testi, davranışsal çaresizlik değerlendirilmesi için zorunlu yüzme testi (Forced swimming test; FST) ve kaygı davranışlarının değerlendirilmesi için yükseltilmiş artı labirent (Elevated plus maze; EPM) testi uygulanmaktadır.

Kronik stres uygulamalarının sıçanlarda anhedoniye neden olduğu bildirilmiştir (Katz, 1982; Willner ve ark., 1992). Anhedoni, STT ile ölçülmektedir. Bu testte hayvanın sükroz tüketimindeki azalma, depresyonun bir semptomu olan anhedoninin göstergesi olarak kabul edilir (Willner ve ark., 1987, 1992). Dolayısıyla kronik stres uygulamalarının hayvanların sükroz tüketimini azaltması beklenmektedir.

Yeni obje tanıma testi, sıçanlarda öğrenme ve hafızayı değerlendirmek için kullanılmaktadır. Sıçanların yeni nesneyle, daha önce tanıdıkları nesneye göre daha fazla zaman geçirmeleri beklenmektedir (Ennaceur ve Delacour, 1988). Kronik stres öğrenme ve hafıza bozukluğuna neden olmakta, dolayısıyla yeni nesneye olan ilgiyi azaltmaktadır.

Kronik stresin semptomlarından biri olan davranışsal çaresizlik, FST ile değerlendirilmektedir (Crema ve ark., 2013; Rygula ve ark., 2005). FST testinde sıçanların hareketsiz kalma süresinin uzaması çaresizlik davranışı ile ilişkilendirilmektedir (Porsolt ve ark., 1977). Stres uygulamasının zorunlu yüzme testi ile değerlendirilen çaresizlik davranışını tetiklediği ve hareketsiz kalma süresini uzattığı bilinmektedir (Crema ve ark., 2013)

Kronik stresin anksiyete üzerine etkilerini göstermek için EPM testi kullanılmaktadır. Kronik stresin sıçanlarda EPM testi ile değerlendirilen kaygı davranışını tetiklediği ve kapalı kollarda geçirilen süre ve giriş sıklığının açık kollara göre daha fazla olduğu bilinmektedir (Walf ve Frye, 2007).

Bilişsel işlevin kronik stresten etkilendiği bilinmektedir. Bu etkinin ne şekilde olduğunu belirlemek amacıyla öğrenme ve hafızayı değerlendiren çeşitli testler kullanılmaktadır. Bunlardan biri MWM testidir (Brandeis ve ark., 1989). MWM testinde öğrenme, caydırıcı bir şekilde motive edilmiş bir davranıştır ve caydırıcı faktörler en aza indirildiğinde bile test hayvanlar için streslidir. Platformu bulma süresinin uzaması, platform kadranında geçirilen sürenin kontrol gruplarına kıyasla daha az olması, öğrenme ve hafıza bozukluğunu göstermektedir (Morris, 1984). Test koşullarının yarattığı strese

ilaveten dışarıdan uygulanan stresin bilişsel performansı, dolayısıyla MWM performansını olumsuz etkilediği gösterilmiştir (Hölscher, 1999; Hu ve ark., 2017).

2.5.1.1. Sükroz Tercih Testi

Sükroz tercih testi (STT), depresyonun temel bir semptomu olan anhedoniyi yani ödüle karşı azalmış duyarlılığı belirler. Sıçanların ödüle duyarlılığı, içme suyuna karşı sükroz çözeltisi tercihine göre ölçülür. STT'nin tanımlandığı ilk yayında, 3 haftalık KÖHS uygulaması sonrası sükroz tercihinde azalma bildirilmiştir (Willner ve ark., 1987).

Her sıçan için % 1-2'lik sükroz çözeltisi ve sadece su bulunan iki suluk hazırlanır. Test bireysel kafeslerde uygulanır. 24 saat boyunca ayrı kafeslerdeki sıçanların iki şişeye de erişmesine izin verilir. Şişe konumunun tüketimi etkilemesini önlemek için su ve sükroz şişelerinin yerleri 12 saatte bir değiştirilmelidir. Bu bölüm öğrenme ve adaptasyon bölümüdür. 24 saatlik adaptasyon tamamlandıktan sonra sıçanlar kendi kafeslerine alınır ve 24 saatlik su ve yem kısıtlaması uygulanır (Shen ve ark., 2019). Testin sıçanların aktif saatlerine denk gelecek şekilde düzenlenmesi önerilir. Bir saat süreyle bireysel kafeslere alınan sıçanlara bir şişede 100 ml su ve diğer şişede 100 ml sükroz çözeltisi sunulur. Bu sürede sıçanların su ve sükroz çözeltisi tüketimi ölçülür. Sükroz tercihi, sükroz çözeltisi (g) / (sükroz çözeltisi (g) + su (g)) x 100 formülü ile hesaplanır. Test, KÖHS uygulaması öncesi ve sonrasında, stresin etkisini ölçmek amacıyla, belirli aralıklarla uygulanabilir.

Stres uygulanmayan sıçanlar STT'de, su yerine sükroz veya glukoz gibi çeşitli tatlandırılmış solüsyonları tercih ederler (Nielsen ve ark., 2000; Willner ve ark., 1992, 1996). Stres uygulananlarda ise stres etksiyle oluşan anhedoni nedeniyle sükroz/glukoz tüketiminin düşmesi beklenir (Matthews ve ark., 1995). Bu testin sonuçlarını eleştiren literatür çalışmaları da bulunmaktadır. STT'nin; ırk, soy ve protokol farklılıklarına duyarlılığı sebebiyle KÖHS modelinde güvensiz bir hedonik durum ölçüsü olduğu bildirilmiştir (Forbes ve ark., 1996; Matthews ve ark., 1995; Nielsen ve ark., 2000). KÖHS modelinde stres etkeni olarak gıda-su kısıtlaması kullanılırsa sükroz tercihinde azalma olduğu bildirilmiştir. Eğer gıda-su kısıtlaması stresör olarak kullanılmazsa bu etkinin görülmediği, stres grupları ile kontrol gruplarında benzer sonuçların elde edildiği tespit edilmiştir (Forbes ve ark., 1996). Willner ise KÖHS uygulaması sonrası gözlenen anhedoninin vücut ağırlığı kaybından kaynaklanmadığını dolayısıyla anhedoninin gıda-su kısıtlamasına bağlı olmadığını bildirmiştir (Willner ve ark., 1996).

Sükroz tercih testi sonuçlarını etkileyen iki önemli değişken, testten önce uygulanan gıda/su yoksunluğunun süresi ve kullanılan sükroz çözeltisinin konsantrasyonudur. Gıda-su yoksunluğu kısa süreli (1-2 saat) ve daha uzun süreli (3-12 saat) olarak uygulanabilir. Uzun süreli uygulama daha çok tercih edilmektedir. Sükroz çözeltisinin sadece zayıf bir şekilde ödüllendirici olması, yani konsantrasyonunun düşük olması (en fazla %2 önerilir) KÖHS' nin etkisini ölçmede STT' nin güvenilirliği için önemlidir (Willner, 2017). Başka bir çalışmada da klasik STT protokolünün aksine akut stres kaynağı olan yiyecek-su yoksunluğunun (Forbes ve ark., 1996; Matthews ve ark., 1995) STT için gerekli olmadığı ve sükroz tercihini değiştirmediği rapor etmiştir. Bu durum hayvan refahı adına olumlu bir gelişme olarak değerlendirilebilir (Fonseca-Rodrigues ve ark., 2022). Laboratuvarlar arası uygulama farklılıklarının literatürdeki farklı sonuçlara sebep olduğu bunun da çalışmalar arası karşılaştırmayı zorlaştırdığı düşünülmektedir (Fonseca-Rodrigues ve ark., 2022; Willner, 2017).

2.5.1.2. Yeni Obje Tanıma Testi

Yeni obje tanıma (Novel object recognition; NOR) testi, sıçanlarda uzamsal öğrenme ve hafızayı değerlendirmek için kullanılır. Bu test, sıçanların yeni bir nesneyi keşfetmek için, bu yeni nesneyle daha önce tanıdıkları objeye göre daha fazla zaman harcamaları prensibine dayanmaktadır (Ennaceur ve Delacour, 1988). Deney kutusunun kare olması, kolay temizlenebilir olması ve şeffaf olmaması önerilmektedir. Kutular yaşa ve ağırlığa göre farklı boyutlarda olabilir (Reger ve ark., 2009). Test iki aşamadan oluşmaktadır. Öncesinde her hayvan için boş kutuya alıştırma önerilir. Alıştırma sonrası ilk testte sıçan, birbiriyle aynı, iki nesnenin yerleştirildiği deney kutusuna bırakılır. Beş dakikalık eğitim süresinin ardından deney hayvanı kafesine bırakılır. Bu bölümde hayvanın nesneyi tanıması sağlanır. İkinci aşamada ise denek ilk aşamada tanıtılan nesne ve yeni bir nesne ile deney kutusuna yerleştirilir. Her bir nesne ile ilgilendiği süre ölçülür. Nesne tanıma testinde, yeni nesne ile etkileşim için daha fazla zaman harcanması beklenir. Koku ipuçları giderilmelidir. Işık düşük şiddetli ve indirekt olmalı, deney odasının mümkünse ses yalıtımı olmalıdır (Lissner ve ark., 2021). Eğitim ve test arası süre 1 saat olduğunda kısa süreli hafıza, 24 saat olduğunda ise uzun süreli hafıza değerlendirilir. Nesne boyutunun yaşa uygun olmasına ve nesnelerin hayvanın boyunun iki katından daha uzun olmamasına dikkat edilmelidir (Bevins ve Besheer, 2006; Lissner ve ark., 2021).

Yeni nesnenin tercih edilmesi ve bununla daha fazla zaman geçirilmesi, eski nesnenin hatırlandığı anlamına gelir (Arias ve ark., 2015). Yeni objenin tanınması, yeni ortamların veya tek bir yeni nesnenin keşfini değerlendiren testlere göre daha fazla bilişsel beceri gerektirir. Nesne tanıma belleğinin oluşumu, hipokampus ve medial prefrontal korteks ve parahipokampal yapılar arasındaki işlevsel etkileşime bağlıdır (Barker ve Warburton, 2011; Chao ve ark., 2013). Yeni obje tanıma testi gibi özellikle nesne tanıma hafızasını değerlendiren davranış testleri, hafızanın sinirsel temelini incelemeye olanak tanıdığı için klinik öncesi araştırmalarda giderek daha faydalı hale gelmiştir (Antunes ve Biala, 2011).

2.5.1.3. Yükseltilmiş Artı Labirent Testi

Kaygı davranışlarının ölçülmesi için kullanılan testlerde deney hayvanının araştırma ve keşif dürtüsünden faydalanılır. Yeni bir çevrede sergilediği araştırma davranışı, deney hayvanının koşulsuz genel keşif dürtüsünden kaynaklanmaktadır. Keşif davranışına koşullandırılmış araştırma dürtüsü de sebep olabilir. Bu sebeple kaygı modelleri koşullu ve koşulsuz olarak sınıflandırılabilir (Bourin ve ark., 2007). Koşulsuz kaygı modellerinde deney hayvanının yeni, parlak ışıklı veya açık alanlardan içgüdüsel olarak korkması gibi koşulsuz tepkilerinden yararlanılır. Koşullu kaygı modellerinde ise elektrik şoku gibi ağrı ve rahatsızlık içeren durumlardan kaçınma tepkisi değerlendirilir (Bourin ve ark., 2007; V. Kumar ve ark., 2013).

Yükseltilmiş artı labirent (Elevated plus maze; EPM) testi kemirgenlerin yükseklik ve açık alanlardan doğal olarak kaçınmasına dayanan koşulsuz kaygı davranışlarının ölçülmesinde yaygın olarak kullanılan bir testtir (Pellow ve ark., 1985). İlk olarak sıçanlarda gerçekleştirilen test, daha sonra diğer kemirgenlerle yapılan çalışmalarda da kullanılmaya başlanmıştır (Bourin ve ark., 2007). Labirent, 50 cm uzunluğunda ve 10 cm genişliğinde artı şekilde tasarlanmış dört koldan oluşur. Kollardan ikisi açık, ikisi kapalıdır. Kapalı kolların iki tarafı 30 cm yüksektir ve tüm labirent yerden 50 cm yüksektedir. Kolların keşişimindeki açık orta alan 5 x 5 cm'dir. Labirent, mat siyah ve temizlenebilir yüzeyli olmalıdır (Walf ve Frye, 2007). Deney hayvanlarının yeni çevreye adaptasyonunu sağlamak için testten en az 1 saat önce odaya taşınmaları önerilir. Ayrıca hayvanların, testten en az üç gün önce taşınma stresinin etkisini azaltmak için deneyin yapılacağı odaya taşınması, 15-30 dakika odada bekletilmesi ve bunun üç gün boyunca tekrarlanması önerilir. Deney hayvanının araştırmacıdan etkilenmemesi için

labirent perde ile odanın diğer bölümünden ayrılmalı veya farklı bir odadan kontrol edilmelidir (Pellow ve ark., 1985). Labirentin tüm kollarına aydınlatmanın eşit ve indirekt gelmesi önemlidir (Walf ve Frye, 2007).

Test başlangıcında araştırmacı deney hayvanını, hayvanın yüzü açık kola bakacak şekilde labirentin merkezine bırakır. Test süresi beş dakikadır ve kamera ile kayıt altına alınır. Bu test ile deney hayvanının karanlık/kapalı alanlara yönelimi ve yüksek/açık alanlardan kaçınması değerlendirilir (Walf ve Frye, 2007). EPM testinde açık ve kapalı kollarda geçirilen sürenin yanı sıra kollara ve orta alana giriş sıklığı, toplam mesafe parametreleri ölçülür (Pellow ve ark., 1985). Kapalı kollarda geçirilen sürenin uzun olması hayvanda anksiyete benzeri davranışlar olduğunu gösterir.

2.5.1.4. Zorunlu Yüzme Testi

Zorunlu yüzme testi (Forced swimming test; FST), sıçanların depresyon ile ilişkilendirilen çaresizlik davranışını tespit etmek amacıyla yapılan bir davranış testidir. Test protokolü Porsolt'un tanımlamasına uygun olarak gerçekleştirilir (Porsolt ve ark., 1977). Test için, 50 cm yüksekliğinde ve 20 cm çapında su dolu şeffaf silindirik kaplar kullanılır. Kaplar 23 ± 1 °C'de musluk suyuyla doldurulur ve su derinliği sıçanın boyundan yüksek olacak şekilde (30 cm) ayarlanır (de Kloet ve Molendijk, 2016).

Sıçanlar, içi su ile dolu silindir kaba bırakılır. 24 saat ara ile iki uygulama seansı uygulanır. Deney ortamına alışmaları ve öğrenmeleri için 15 dakikalık ön test, 24 saat sonra da 5 dakikalık test uygulanır. Beş dakikalık test boyunca deney hayvanının immobilizasyon ve mobilizasyon süresi ölçülür (Porsolt ve ark., 1977). Her deney hayvanından sonra su değiştirilir ve hayvan havlu ile kurutularak sıcak bir alanda bekletilir (Petit-Demouliere ve ark., 2005).

Değerlendirme yapılırken; immobilizasyon hayvanın başını suyun üzerinde tutmak için gerekli olan küçük hareketler dışında tüm vücudun hareketsizliği; mobilizasyon ise ön ayaklar suya girip çıkarken, genellikle silindirin duvarına karşı şiddetli hareketler olarak tanımlanır (Cryan ve ark., 2002). Depresyon belirtisi gösteren sıçanın immobilizasyon süresinin daha uzun olması beklenmektedir (Porsolt ve ark., 1977). Hareketsizlik, deney hayvanının bir çıkış bulma umudundan vazgeçmesi ve deneysel duruma teslim olarak umutsuzluk durumunu yansıtması diye yorumlanmaktadır (Porsolt ve ark., 1978).

Test prosedürünün basitliğine ve duyarlılığına rağmen, FST çalışmalarında, kontrol gruplarının immobilizasyon sürelerinde bile büyük farklılıklar bildirilmiştir. Bu farklılıklar sonuçların değerlendirilmesini zorlaştırmaktadır (Bogdanova ve ark., 2013).

2.5.1.5. Morris Su Labirenti Testi

Morris su labirenti (Morris water maze; MWM), sıçanlarda hipokampal öğrenme, mekansal hafıza ve uzun süreli uzamsal öğrenme değerlendirilmesi için tasarlanmış bir davranış testidir (Morris, 1981). Davranışsal sinirbilim alanında en sık kullanılan testlerden biri haline gelmiştir (Lissner ve ark., 2021).

Morris su labirenti testi, 150 cm çapında yuvarlak bir havuz ile 15 cm çapında bir platformdan oluşmaktadır. Havuz, platformu 1,5 cm geçene kadar su ile doldurulur. Su, süt tozu, gıda boyası gibi toksik olmayan maddelerle opak hale getirilir. Platformu hayvanın görmesine engel olmak için bulanıklaştırılan suyun rengi hayvanın rengi ile zıt olmalıdır. Böylece deney hayvanı video görüntüsünde takip edilebilir. Hipotetik olarak 4 eşit kadrana bölünen tankta her kadran farklı bir yönü ifade etmektedir (doğu, batı, kuzey ve güney). MWM, dört gün boyunca öğrenme kapasitesinin, beşinci gün ise belleğin değerlendirildiği iki temel bölümden oluşmaktadır (Morris, 1984). Öğrenme bölümünde deney hayvanı havuzun duvarına bakacak şekilde suya bırakılır ve yüzerek platformu bulması için 60 sn süre tanınır. Süre sonunda platformu bulamayan deney hayvanı araştırmacı tarafından platforma yönlendirilir. Hayvanın 15 sn platform üzerinde kalmasına izin verilerek etraftaki görsel ipuçlarına göre konumunu belirlemesi ve öğrenmesi beklenir. Her öğrenme gününde her bir hayvan ard arda 4 kez havuzun farklı kadranlarından suya bırakılır ve gizli platformu bulması, sonraki denemelerde aşamalı olarak platforma ulaşma süresini azaltması beklenir (Morris, 1984). Sabit bir yerde gizlenmiş bir platformun etraftaki görsel ipuçlarını da kullanarak yerini bulma ve sudan platforma kaçmayı öğrenme yeteneğinin, uzamsal belleğin bir ölçüsü olduğu düşünülmektedir. Bellek yetisinin değerlendirilmesi amacıyla beşinci gün platform kaldırılır ve platforma en uzak kadrandan suya bırakılan hayvanın daha önceki bölümde platformun bulunduğu hedef kadranda geçirdiği süre hesaplanır. Burada geçirilen sürenin uzun olması hayvanın daha yüksek bir bellek tutma kapasitesine sahip olduğu yönünde yorumlanır (D'Hooge ve de Deyn, 2001).

Uzamsal öğrenmede davranışın üç yönü ölçülmeye çalışılır. Bunun için hayvanın platforma ulaşmak için kullandığı stratejiler değerlendirilir. Praksis stratejisi kapsamında

hayvan öğrenilmiş hareket sırasını kullanabilir. Taksi stratejisi; yakın çevredeki ipuçlarını kullanarak hayvanın platformu bulabilme yeterliliğidir. Hedef konumunu gösteren görünür ipuçları kullanılır. Haritalama/uzamsal strateji kapsamında ise hayvan vücut ipuçlarını (sağa, sola dönme gibi) kullanabilir (Brandeis ve ark., 1989; Whishaw ve Kolb, 2019). MWM testi sonuçları bu yeteneklerden bir veya birkaçında sorun olduğunu gösterebilir. Bu sebeple öğrenme-hafıza eksikliklerinin altında yatan nedeni anlamak için daha fazla test yapılması veya farklı parametrelerin ölçülmesi gerekebilir (D'Hooge ve de Deyn, 2001).

Testin yürütülmesi sırasında gerekli özenin gösterilip gösterilmediği ve uygulayıcının tecrübesi gibi değişkenler çeşitli varyasyonlara sebep olabilir. Bu varyasyonlara rağmen MWM, hipokampus ile ilgili hafıza değerlendirmesi için etkili, pratik ve kontrol edilebilir düzeyde az stresli bir testtir (Lissner ve ark., 2021).

2.5.2. Kronik Stresin Nörobiyolojik Etkileri

Strese karşı otonomik, davranışsal ve endokrin tepkilerin etkinleştirilmesinde amigdala, hipotalamus, hipokampus ve prefrontal korteksin önemi bilinmektedir (Lupien ve ark., 2009). Bu beyin bölgelerinde stres yanıtının düzenlenmesinde rol oynayan GR, CRH ve CRHR1 gen ekspresyonlarının değerlendirilmesi kronik stresin nörobiyolojik etkilerini anlamaya yardımcı olmaktadır (Chiba ve ark., 2012; Dong ve ark., 2018; Mizoguchi ve ark., 2003; Shekhar ve ark., 2005). Deneysel çalışmalarda stresle ilgili beyin bölgelerinde stres yanıtının düzenlenmesinde görev alan gen ekspresyon seviyelerinde farklı sonuçlar bildirilmiştir (Bakshi ve Kalin, 2000; Mizoguchi ve ark., 2003).

Kronik stresin, amigdalada GR ekspresyonunu arttırarak anksiyete benzeri davranışları indüklediği ve öğrenmeyi olumsuz etkilediği bildirilmiştir (Shilpa ve ark., 2017; Tripathi ve ark., 2017). Paraventriküler nukleus, CRH'nin tek kaynağı değildir. CRH'nin sinir sisteminde ve periferde dağılım gösterdiği bilinmektedir (Palkovits ve ark., 1985; Swanson ve Sawchenko, 1983). Amigdala da nörotransmitter ve nöromodülatör görevi gören CRH'nin önemli bir kaynağıdır. Bu bölgedeki CRH gen ekspresyonu; otonomik, bağışıklık ve davranış değişiklikleri gibi stres tepkileriyle ilgilidir. Merkezi CRH; uyarılma, bilişsel işlevlerin, ödül, korku, kaygı ve depresyonun düzenlenmesinde görevlidir. Ayrıca sirkadiyen ritmi de etkilemektedir. Büyüme ve üremenin düzenlenmesinde görevli mekanizmalarla etkileşime girmektedir. Ek olarak

kardiyorespiratuvar, gastrointestinal ve metabolik işlevlerde de görev almaktadır (Kovács, 2013). Kronik stres, amigdaladan CRH salgılanmasını da arttırmaktadır (Herringa ve ark., 2004; Koob ve Heinrichs, 1999). Bu artışının stres kaynaklı kaygı ile ilişkili olabileceği (Regev ve ark., 2012) ve stres altında hafıza konsolidasyon sürecini değiştirebileceği bildirilmiştir (Roozendaal ve ark., 2002). Ancak farklı stresörlerin ve uygulama sürelerinin gen ekspresyon seviyelerinde farklı sonuçlara neden olduğu bilinmektedir (Makino ve ark., 1999; Watts, 1996).

Kronik stres, hipotalamusta GR gen ekspresyonunu azaltmakta (Herman ve ark., 1995; Lu ve ark., 2015), CRH ve CRHR1 gen ekspresyonunu ise çoğunlukla arttırmaktadır (Eraslan ve ark., 2015; Herman ve ark., 1995; Imaki ve ark., 1996; Martí ve ark., 1999). Hipotalamusta GR azalması ile CRH artışının birbiriyle ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Herman ve ark., 1995).

Streste glukokortikoid etkisine bağlı olarak hipokampusta glukokortikoid reseptörlerinin aşağı regülasyonu bilinmektedir (Gómez ve ark., 1996; Sapolsky ve ark., 1984). CRH ve CRHR1 gen ekspresyonunun KÖHS uygulamasıyla arttığı bildirilmiştir (Iredale ve ark., 1996). CRH, öğrenme ve hafıza üzerinde etkindir. Düşük dozlarda hafızayı artırabilirken yüksek dozlarda performansı bozabilir (Koob ve Bloom, 1985). CRH ile indüklenen CRHR1 reseptörlerinin hafızanın arttırılmasına aracılık edebileceğini gösterilmiştir (Radulovic ve ark., 1999).

Kronik stres kaynaklı glukokortikoid seviyesindeki artışın PFC'de GR gen ekspresyonunu azalttığı bildirilmiştir (Chiba ve ark., 2012; Mizoguchi ve ark., 2003). Stresin, dişilerde PFC'de CRH gen ekspresyonunu arttırdığı tespit edilmiştir (Karisetty ve ark., 2017).

Kronik stresin PFC, hipokampus ve hipotalamustaki GR seviyelerini farklı şekilde etkilediği belirtilmiştir. PFC ve hipokampustaki GR seviyelerinde görülen değişim, kronik stres kaynaklı glukokortikoid negatif geri bildiriminin zayıflaması sonucu oluşabilir (Mizoguchi ve ark., 2003).

2.5.2.1. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), deoksiribo nükleik asit (DNA)'in belirli bir parçasının primerler tarafından yönlendirilerek enzimatik olarak çoğaltılması şeklinde tanımlanan *in vitro* bir yöntemdir. Yüksek ölçüde duyarlı ve özgün bir teknik olan PCR, Dr. Kary Mullis tarafından bulunmuştur (Mullis ve ark., 1986). DNA polimeraz

enzimleri, DNA moleküllerinin sentezini sağlayan enzimlerdir. Bu enzimler, ilk nükleotidi ekleyeceği bir başlatıcı (primer) varlığında tek zincirli DNA'ya bağlanarak replikasyonu gerçekleştirirler. Çift zincirli DNA sarmallarının ayrılarak tek zincirli DNA elde edilmesi yani denatürasyon aşaması sıcaklık etkisiyle gerçekleşir. PCR'da ilk olarak kullanılan DNA polimeraz enzimi ısıya hassas yapıdaydı. Dolayısıyla bu enzimin bir sonraki denatürasyon aşamasında etkisiz hale gelmesi sebebiyle her döngü sırasında yeniden eklenmesi gerekmekteydi. Isıya hassasiyete bağlı yöntemdeki hataları azaltmak ve testin güvenilirliğini arttırmak amacıyla, yöntemde ısıya dayanıklı olan Taq DNA polimeraz enzimi kullanılmaya başlanmıştır (Saiki ve ark., 1988). Bu enzim, 1976 yılında Cincinnati Üniversitesi'ndeki araştırmacılar tarafından kaplıcalarda yaşayan termofilik bir bakteri olan *Thermus aquaticus*'dan elde edilmiştir. Taq polimeraz enziminin yüksek ısıya dayanıklılığı sayesinde PCR'da kullanılmaya başlanmasının ardından otomatize termal siklus cihazları geliştirilmeye başlanmıştır (1988) (Bartlett ve Stirling, 2003).

Polimeraz zincir reaksiyonu temel olarak, nükleik asitlerin tüp içerisinde optimum koşullarda çoğaltılması prensibine dayanır. Birincil amaç, DNA'nın çoğaltılarak jel elektroforez ile tespit edilebilmesini sağlamaktır. Kopyalamak istenilen DNA bölümünün her iki tarafına bağlanacak şekilde dizayn edilmiş, PCR reaksiyonunu başlatmak için kullanılan sentetik oligonükleotidlere primer denir. Çoğaltma, çift zincirli bir DNA molekülünde çoğaltılmak istenen hedef gen bölgesine oligonükleotid primerlerinin ısının etkisiyle bağlanması ve ortamdaki nükleotidleri kullanarak uzaması şeklinde gerçekleşir. PCR; denatürasyon, primer bağlama, primer uzama olarak isimlendirilen üç aşamadan oluşur ve bu üç aşamanın döngüler halinde tekrarlanması ile gerçekleşir (Mullis ve ark., 1986). Denatürasyon aşamasında, yüksek sıcaklıkta çift zincirli DNA sarmalları sıcaklık etkisiyle birbirinden ayrılarak tek zincirli hale gelir. Genellikle en etkili denatürasyon 92-95 °C'de gerçekleşir. Bölgeye özgü dizayn edilmiş sentetik oligonükleotid olan primerlerin bağlanması (annealing) aşamasında, primerler hedef DNA komponenti ile birleşir. Primerler, çoğaltılacak DNA bölgeleri sınırlarını belirleyecek şekilde DNA'ya bağlanarak polimeraza ilgili bölgeyi çoğaltması için hedef gösterir. Eğer primerler kalıp DNA yerine kendi kendilerine ya da birbirlerine bağlanırlarsa polimeraz zincir reaksiyonunun verimi düşer. Bu sebeple tamamlayıcı dizilerin hibritleşmemesi için primerlerin erime derecesine uygun sıcaklık (55 °C) kullanılmalıdır. Primer uzama aşamasında, 72 °C'de DNA polimeraz uyarımı ile primer uzaması gerçekleşmektedir (Delidow ve ark., 2003). Polimeraz enzimi ile uzama işlemi için ısıya dayanıklı Taq

proteini kullanılır (Saiki ve ark., 1988). Taq DNA polimeraz enzimi uygun tampon ve dört çeşit deoksiribonükleozid trifosfat (dNTP) varlığında primerlere bağlanarak nükleoitidlerin 3′ OH ucundan uzamasını sağlar. Her bir döngü sonunda DNA molekül sayısı ikiye katlanır. Bir döngü sonucu sentezlenen ürün, bir sonraki döngüde diğer primerler için kalıp görevi görür (Amplifikasyon=2^n, n:döngü sayısı). DNA çoğaltıldıktan sonra jel elektroforez yöntemiyle analiz edilir. Jel elektroforeze DNA eklendikten sonra elektrik verilerek DNA jelde yürütülür. Ultraviole ışıma ile agar içerisinde hareket ettiği seviye tespit edilir. Kısa parçacıklar agar içerisinde daha hızlı hareket eder ve jelde hızlı yürür. DNA merdiveninde elde edilen DNA'nın denk geldiği bant uzunluğu baz alınarak ürün tespiti yapılır (Eckert ve Kunkel, 1991; Mullis ve ark., 1996).

Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu, her PCR döngüsü boyunca oluşan PCR ürünlerinin eş zamanlı olarak tespitinin yapıldığı ve miktarının kantitatif olarak belirlendiği moleküler tekniktir (Higuchi ve ark., 1993). RT-PCR ile gen ekspresyon analizleri yapılır. Bir genin mRNA üretme miktarı tespit edilir. Aşağı veya yukarı regülasyon olup olmadığı anlaşılır. Klasik PCR'dan en büyük farkı, kantitatif olarak miktar tayini yapılması ve reaksiyonun gerçek zamanlı olarak takip edilebilmesidir. Her döngüde PCR ürünü miktarı ölçülebildiği için başlangıç materyali doğru bir şekilde hesaplanabilir. Amplifikasyon ve tespit tek tüpte gerçekleştiği için PCR sonrası işlemleri ortadan kaldırmaktadır. Standart PCR ile aynı temel prensiplere sahiptir. RT-PCR tek veya iki aşamalı olarak gerçekleştirilir. Tek aşamalı PCR'da ters transkripsiyon ve PCR aynı tüpte gerçekleşir. RNA örnek miktarı fazla olduğunda tercih edilebilir. Tek aşamalı olduğu için kontaminasyon riski daha azdır. İki aşamalıda, önce cDNA sentezlenerek PCR şablonu olarak kullanılmaktadır. Tamamlayıcı DNA veya komplementer DNA olarak da isimlendirilen cDNA, ters transkriptaz enzimiyle katalizlenen bir reaksiyonda şablon olarak kullanılan mRNA'dan sentezlenen DNA parçasıdır. Sentezlenen cDNA RT-PCR aşaması için yeni bir tüpe aktarılır (Wong ve Medrano, 2005). PCR'da kullanılan primerlere ek olarak RT-PCR'da floresan boyalar veya problar kullanılır. RT-PCR'da çift iplikli DNA'ya bağlanan floresan boyalar (Syber Green) veya problar sayesinde reaksiyon gerçek zamanlı görüntülenir. Prob, floresan bir maddedir ve primer gibi DNA dizisine bağlanır. Bunun için TaqMan prob ve hibridizasyon prob kullanılmaktadır. Boyaların dışında bu spesifik oligonükleotid temelli sistemler (TaqMan prob, hibridizasyon prob ve moleküler boncuk), çoğaltılmak istenen hedef bölgeye bağlanarak çoğalma gerçekleştiğinde floresan ışıma yapar. Işıma, optik modül sayesinde

görüntülenir (Li ve ark., 2016). RT-PCR geleneksel RNA analiz tekniklerinin aksine düşük konsantrasyonda mRNA' nın ölçülebilmesinde veya biyolojik materyalin azlığında da kullanılabilir. Ayrıca hassas, hızlı, güvenilir ve kolay bir yöntem olması sebebiyle tercih edilir (Santagati ve ark., 1997).

Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu; RNA izolasyonu, cDNA sentezi ve gen ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi aşamalarından oluşur (Kim, 2001).

RNA izolasyonu aşaması, doku ya da hücrelerin lizis solüsyonu ile parçalanıp fenol yardımıyla RNA'nın ekstrakte edilmesi prensibine dayanır. Protokolün orjinali, Chomczynski ve Sacchi tarafından 1987'de tanımlanmıştır (Chomczynski ve Sacchi, 1987). RNA izolasyonu gerçekleştirmek için farklı yöntemler kullanılmaktadır. Klasik RNA izolasyon yöntemi olarak da isimlendirilen solüsyon temelli yöntemler ve katı faz nükleik asit izolasyon yöntemi olarak da adlandırılan kolon temelli yöntemler kullanılır. (Tan ve Yiap, 2009). Klasik RNA izolasyon yöntemi; dokunun homojenize edilmesi, hücrenin parçalanması, nükleaz aktivitesinin engellenmesi ve son olarak istenen nükleik asit moleküllerinin hücresel moleküllerden ayrılıp saflaştırılması adımlarından oluşur (Nilsen, 2013). RNA izolasyonunun gerçekleşeceği materyalin organik bir çözücü ile yıkımlanması ilk adımdır. Yıkımlanmanın gerçekleşmesi ve RNaz aktivitesinin engellenmesi için guanidin izotiyosinat ve sodyum dodesil sülfat gibi kimyasallar kullanılır (Nilsen, 2013). Daha sonra tek adımdan oluşan izolasyon yöntemi geliştirilmiş, RNA'nın guanidin tiyosiyanat, kloroform ve fenolden oluşan solüsyonda DNA'dan ve diğer hücresel bileşenlerden ayrılması sağlanmıştır. Fenol ile proteinlerin hızlı yıkımlanması sağlanır. Kloroform, RNA'nın DNA ve diğer moleküllerden ayrılması için faz oluşumunu sağlar. Solüsyonda üç ayrı faz oluşur. Alt kısımdaki organik fazda proteinler, interfazda DNA ve denatüre olmuş proteinler, üst kısımdaki sıvı fazda ise izole edilmek istenen RNA'yı içeren sıvı bulunur (Li ve ark., 2016). Sıvı faz içerisindeki fenolün uzaklaştırılmasını da kloroform sağlar. Kontaminasyona engel olmak için sıvı fazın pipetle dikkatlice alınması gerekmektedir (Nilsen, 2013). Katı faz nükleik asit izolasyon yöntemi; dokunun homojenize edilmesi, hücrenin paraçalanması, RNA adsorbsiyonu, yıkama ve elüsyon aşamalarından oluşur. Lizis solüsyonu ile hücreler parçalanır. Saflaştırma kolonları kullanılarak RNA slika membran üzerinde toplanır. Saflaştırma kolonunun içerisindeki membran RNA'yı tutar. Diğer moleküller membrandan geçer ve böylece RNA saflaştırılır (Li ve ark., 2016). Yüksek pH ve tuz

konsantrasyonu RNA'nın kolon membranına tutunmasına yardımcı olur. Proteinlerin membranlardan uzaklaştırılması için yıkama adımları kullanılır. Elüsyon solüsyonları ile RNA membrandan ayrılır. RNA izolasyonu için üretilen ticari kitler bu prensip temelinde çalışmaktadır (Tan ve Yiap, 2009). Bir sonraki aşamaya geçmeden, RNA kalite ve miktar kontrolleri yapılmalıdır. Çünkü başarılı bir cDNA sentezi için yüksek saflıkta ve yeterli miktarda RNA ile çalışılması önemlidir. RNA kalite ve miktar kontrolü amacıyla kullanılan farklı yöntemler mevcuttur (Becker ve ark., 2010). Agaroz jel elektroforezi, RNA kalitesini değerlendirmek için kullanılan klasik bir yöntemdir. Ribozomal RNA kalitesinin mRNA kalitesini yansıttığı prensibine dayanan bu yöntem diğer yöntemlere göre daha az güvenilirdir (Die ve Román, 2012). RNA kalitesinin değerlendirilmesinde kullanılan diğer yöntem optik yoğunluğun ölçümüdür (Becker ve ark., 2010). Nanodrop veya diğer hassas spektrofotometreler kullanılarak fotometrik olarak ölçülüp saflık derecesi ve miktarı kontrol edilmektedir. Bu ölçümle optik yoğunluk farklı dalga boylarıyla saptanmaktadır (Die ve Román, 2012). İki yüz otuz nm, farklı kontominant maddelerin maksimum absorbans değerini gösterirken, 260 nm nükleik asit kontaminasyon maksimum absorbans değerini gösterir. İki yüz seksen nm protein-fenol kontaminasyonun maksimum absorbans değerini ve 320 nm ise farklı kontaminant maddelerin maksimum absorbans değerini göstermektedir. RNA saflığının belirlenmesi için 260/280 oranı kullanılır (Anon, 2017; Thermo Scientific, 2012). Gen ekspresyon ölçümlerinde oranın 1,8'den yüksek olması uygundur (Becker ve ark., 2010). Böylece fenol ve protein kontaminasyonu olmadığı ve RNA'nın yeterli saflıkta olduğu tespit edilir (Taylor ve ark., 2010). Ancak bu yöntem, RNA bütünlüğü ve yıkımlanma durumu tespitinde yetersiz olabilir. Diğer yöntemler ise mikrofluidik kapiller elekroforez sistemi (Becker ve ark., 2010), RIN/RQI değeri (Die ve Román, 2012) ve 3′:5′ oranıdır (Nolan ve ark., 2006).

İzolasyondan sonra eğer farklı örneklerde çalışılıyorsa eşit miktarda RNA'da çalışmak önerilmektedir. Bu sebeple nanodrop spektrofotometre ile RNA miktar tayini yapılıp miktarları eşitlemek amacıyla her bir örnekten eşit miktarda RNA alınarak cDNA sentezi aşamasına geçilmelidir (Bustin ve ark., 2010).

Sonraki aşamada cDNA sentezi gerçekleştirilir. Sentez için ters transkriptaz enzimi kullanılır. Bu enzim, tek iplikli bir RNA molekülünü kalıp olarak kullanıp tek iplikli DNA üreten bir polimeraz enzimdir. Enzim, uygun tampon ve dört çeşit dNTP

varlığında primerlere bağlanarak nükleoitidlerin 3′ OH ucundan uzamasını sağlar ve cDNA sentezlenir. cDNA sentezinde primer olarak random-hegzamer, oligo veya gen spesifik primerler kullanılabilir.

Komplementer DNA'nın PCR cihazı kullanılarak çoğaltılması ve çoğaltılan ürünlerin gerçek zamanlı olarak tespiti ile RT-PCR protokolü tamamlanır (Kim, 2001). Reaksiyonun gerçekleşmesi için termal döngü cihazı ve optik modülden oluşan RT-PCR cihazı kullanılır. Reaksiyon klasik PCR'deki adımlardan oluşur (denatürasyon, primer bağlama ve primer uzama). Prob veya boyalar reaksiyonun farklı aşamalarında çoğaltılmak istenen hedef bölgeye bağlanıp çoğalma gerçekleştiğinde floresan ışımaya sebep olur. SYBR Green ve TaqMan prob uzama aşamasında, hibridizasyon prob ise primer bağlama aşamasında hedef bölgeye bağlanır. Optik modül sayesinde ışıma görülür ve ışımanın şiddetine bağlı olarak amplifikasyon grafiği oluşur. Bu grafikte öncelikle taban çizgisi belirlenmelidir. Taban çizgisi, floresan sinyalde küçük değişikliklerin gözlendiği başlangıç döngülerindeki sinyal seviyesidir. Amplifikasyon eğrisinin otomatik analiziyle veya kullanıcı tarafından belirlenir. Taban çizgisi sinyalini aşan istatistiksel olarak anlamlı artışı yansıtan sinyal seviyesine eşik değeri (threshold) denir. Eşik değeri döngüsü (Ct: cycle threshold) ise reaksiyon floresan sinyalinin eşik değerini aştığı döngü sayısıdır. Bu sayı ne kadar düşük ise başlangıçtaki ürün miktarı o kadar fazladır. Elde edilen Ct değerleri kullanılarak gen ekspresyon seviyeleri, standart eğri yöntemi veya karşılaştırmalı eşik yöntemi ile belirlenir (Joyal ve ark., 2007).

Gen ekspresyon ürünlerinin analizinde ortaya çıkabilecek sorunların en aza indirilmesi amacıyla genlerin uygun referans genler ile normalizasyonu önerilmektedir (De Spiegelaere ve ark., 2015). Referans genler, hücrenin fonksiyonundan bağımsız bir şekilde hücre için gerekli olan genlerdir. Bu sebeple, tüm hücrelerde değişkenlere bakılmaksızın normal koşullarda eksprese olurlar. Araştırmalarda normalizasyon amacıyla yaygın olarak kullanılırlar (Sikand ve ark., 2012). Bütün doku ve organlarda eksprese olan referans genlerin genomik organizasyonu, hedeflenen gen diziliminden farklıdır. Referans genlerin ekspresyon seviyelerinin gene, hücre tipine ve deneysel koşullara bağlı olarak değiştiğini gösteren çalışmalar mevcuttur (Mahoney ve ark., 2004; Sullivan-Gunn ve ark., 2011). Bu sebeple referans genlerin deney tasarımına uygun olarak seçilmesi gerekmektedir (Lin ve Redies, 2012). Normalizasyon, farklı dokular ve farklı miktarlardaki örnekler arasında mRNA konsantrasyonlarının karşılaştırılmasını

sağlamaktadır (Bustin ve ark., 2010). Normalizasyon için hedef genin ekspresyon düzeyi, referans genin ekspresyon düzeyine oranlanır. RT-PCR verilerinin analizinde yaygın olarak delta-delta Ct yöntemi kullanılır (Livak ve Schmittgen, 2001). Bu yöntem, RT-PCR gerçekleşirken oluşan eşik döngülerini (Ct) doğrudan kullandığından farklı numuneler arasındaki nispi kat gen ekspresyon seviyelerini hesaplamak için tercih edilir. Bu $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodu olarak da adlandırılan yöntemde önce ΔCt değeri bulunur. Bu değer, hedef ve referans genlerin Ct değerleri arasındaki farktır. Sonra hesaplanan $\Delta\Delta Ct$ ise hedef örnek ile kontrol örneğin ΔCt'leri arasındaki farktır. Bu $2^{-\Delta\Delta Ct}$ aritmetik formülünün sonucu, bir referans gene normalize edilmiş kontrol örneğe göre bir hedef örnekte hedef gen ekspresyonunun değişimini vermektedir (Livak ve Schmittgen, 2001).

2.6. Yaşlanma Stres İlişkisi

Yaşlanmanın bazal HPA eksen aktivitesini ve stres tepkisini arttırdığı bilinmektedir (Sapolsky, 1991). Bu artış, merkezi sinir sistemindeki glukokortikoid reseptörlerinin kaybı ve HPA ekseninin glukokortikoid geri bildirim mekanizmasına duyarlılığının yaşlanmayla azalmasından kaynaklanır (Sapolsky ve ark., 1986). Yaşlılarda negatif geri bildirime duyarlılığın azalması, hipokampusta glukokortikoid ve mineralokortikoid reseptörlerinin azalması ile ilgilidir (Jacobson ve Sapolsky, 1991). Hem klinik hem de deneysel çalışmalarda dolaşımdaki glukokortikoid seviyelerinin yaşla birlikte arttığı görülmektedir (Bassani ve ark., 2017).

HPA eksenindeki yaşlanmaya bağlı bu etkiler üzerinde belirgin bireysel farklılıklar da vardır. Bazı bireylerde HPA ekseni hiperaktivasyonu gözlenmesine rağmen yaşam boyu normal HPA ekseni aktivitesini koruyan bireyler de vardır. Bellek eksikliklerinin öncelikle hipokampal GR kaybı olan yaşlı sıçanlarda meydana gelmesi, HPA ekseninin aktivitesinin sağlıklı yaşlanma ile ilişkili olduğunu göstermiştir (Issa ve ark., 1990).

Çalışma sonuçları arasındaki farklılıklar yaşlanma deneylerinin tekrarlanabilirliğinde sorunlara neden olmaktadır. Stres durumunda HPA ekseni yanıtının gösterdiği çeşitlilik (Herman, Mcklveen, ve ark., 2016) replikasyon sorunlarına sebep olabilir. Örneğin, yaşlanma ve/veya stres koşullarında artmış veya değişmemiş bazal glukokortikoid miktarı; artmış, azalmış veya değişmemiş CRH mRNA ekspresyonu gibi farklı sonuçlar bildirilmiştir (Cizza ve ark., 1994; Herman ve ark., 2016). Yaşlanmanın HPA ekseni reaktivitesindeki değişkenleri arttırma eğiliminde olduğu göz önünde bulundurulmalıdır. Kümülatif strese maruz kalma, perinatal dönemdeki çevresel etkiler

gibi değişkenler yaşlılık dönemini etkilemektedir. Bu değişkenler, HPA ekseni düzensizliğine yatkınlık veya koruma sağlayabilir. Stres ve yaşlanma bağlantısını tartışmadan önce bu değişkenler dikkate alınmalıdır (Herman ve ark., 2016).

Yaş, genetiğe bağlı olarak HPA ekseni aktivitesinde değişikliklere sebep olabilir. Bununla birlikte yaşlanma sırasında glukokortikoid aktivitelerindeki ve merkezi CRH seviyelerindeki artışlar, nörodejenerasyon, bağışıklık ve metabolizma ile ilgili bozukluklar, depresyon ve anksiyete gibi yaşlanmayla ilişkili patolojilere de katkıda bulunabilir (Aguilera, 2011). Yaşlanmanın sıçanlarda anksiyete düzeyini arttırdığı, öğrenme ve hafıza fonksiyonları gibi bilişsel yetenekleri olumsuz etkilediği deneysel çalışmalarla gösterilmiştir (Jeong, 2006; Shoji ve Mizoguchi, 2010). Yapılan deneysel çalışmalarda stresten kaynaklanan kaygı artışları, gençlere kıyasla yaşlı kemirgenlerde daha belirgindir ve bu durum yaşla birlikte gelişen strese savunmasızlıkla açıklanabilir (Shoji ve Mizoguchi, 2010).

2.7. Çevresel Zenginleştirme Uygulamaları

Çevresel zenginleştirme (ÇZ) uygulamaları, laboratuvar hayvanlarını standart barınma koşullarından daha fazla fiziksel ve/veya sosyal uyarıma maruz bırakmak için kullanılır (Rosenzweig ve ark., 1962). Laboratuvar hayvanları için zenginleştirme, ilk olarak 1940'larda Donald Hebb tarafından tanımlanmıştır. Evcil hayvanlar olarak odada serbest bırakılan sıçanların standart laboratuvar koşullarında barındırılanlara göre daha iyi problem çözme ve öğrenme yeteneklerine sahip olduklarının bulunmasıyla çevresel zenginleştirmenin önemi kabul edilmiştir (Bingham ve Griffiths, 1952). Sonrasında ÇZ'nin daha çok çalışmada kullanılması ise laboratuvarda hayvanların uyumsuz davranış sergilemelerinin gözlemlenmesi ile olmuştur. Bu sebeple doğal ortamlarındaki davranışları sergileyebilecekleri ortamlar yaratılmasına ilgi artmıştır (Bingham ve Griffiths, 1952; Forgays ve Read, 1962; Rosenzweig ve ark., 1962). Yapılan çalışmalarda ÇZ uygulamasının nörogenez, dendritik dallanma artışı, öğrenme ve hafızada iyileşme gibi olumlu sonuçlara neden olduğu tespit edilmiştir. Bu da kullanım alanlarının artmasına yol açmıştır (Simpson ve Kelly, 2011).

İdeal bir ÇZ uygulaması için sosyal ve fiziksel zenginleştirme kombinasyonun tercih edilmesi önerilmektedir (Johansson ve Ohlsson, 1996). Fiziksel zenginleştirme, geniş kafes alanı ve egzersiz imkanı, oyun, keşif alanları ve hayvanların çevreleri üzerinde kontrolüne izin veren özelliklerin eklenmesi gibi yapısal değişiklikleri içerir.

Bunun için doğal malzemeler, ahşap nesneler (Lambert ve ark., 2016), plastik tüneller, halatlar, toplar, merdivenler ve uygun boyuttaki çeşitli hayvan oyuncakları kullanılır. Sosyal zenginleştirme ise sosyal hayvanların gruplar halinde barındırılmasıyla gerçekleştirilir (Johansson ve Ohlsson, 1996).

Çevresel zenginleştirme her ne kadar organizmanın fizyolojisinin, anatomisinin ve davranışının çevreye uyum sağlama ve öğrenme şeklini anlamak için bir deney koşulu olarak kullanılsa da hayvan refahı ile ilgili bir gereklilik olarak da düşünülmektedir (Jirkof ve ark., 2019). Öte yandan güvenilir araştırma bulguları için gerekli olan standart barınma koşullarında yapılacak değişikliklerin araştırma sonuçlarını nasıl etkileyeceği konusunda literatürde henüz yeterli çalışma ve fikirbirliği yoktur (Benefiel ve ark., 2022; Tsai ve ark., 2002). Deneysel bir değişken olarak kullanılan ÇZ prosedürlerinin ve sonuç değerlendirmelerinin standardizasyonu gereklidir (Burke ve ark., 2007). Bu sebeple hem hayvan refahını arttıracak hem de çalışma bulgularının güvenirliğini ve geçerliğini etkilemeyecek türe özgü barınma koşullarının geliştirilmesi önemlidir.

2.8. Çevresel Zenginleştirme ve Stres İlişkisi

Çevresel zenginleştirme, doğası gereği uyarıcı olan ancak rahatsız edici olmaması amaçlanan fiziksel ve/veya sosyal unsurlardan oluşmaktadır. Olumlu etkiler sağladığı varsayılan bu çevresel uyarıma eustres denir (Konkle ve ark., 2010). Davranış deneylerinde mümkün olduğu kadar doğal aktiviteyi gözlemlemek için hayvanlar biyolojik olarak uygun çevresel zenginleştirme koşullarında barındırılmalıdır (Bayne ve Würbel, 2014).

Çevresel zenginleştirmenin öğrenme ve hafızayı geliştirdiği, başarılı bilişsel yaşlanmayı desteklediği deneysel çalışmalarla kanıtlanmıştır. ÇZ uygulamasının hayvanlarda davranışsal ve endokrin tepkileri azalttığı, bu durumun stresle başa çıkma yeteneğinin artmasına sebep olduğu düşünülmektedir (Fox ve ark., 2006; Moncek ve ark., 2004). Gelişmiş sosyal ve bilişsel uyaranlara sahip zenginleştirilmiş koşullar, nörogenezis ve nöral plastisite ile ilişkili bir nörotrofik faktör olan hipokampal beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF) artışına sebep olmuş, dentat girusta nörogenezi arttırmış, hipokampusta sinaptik plastisiteyi olumlu etkilemiştir (Bhagya ve ark., 2017; Kempermann, 2019; Rossi ve ark., 2006). Ayrıca beyin ağırlığını, dendritik dallanmayı ve sinaptogenezi de arttırdığı bilinmektedir (Bhagya ve ark., 2017; Leggio ve ark., 2005;

Rossi ve ark., 2006). ÇZ, hipokampus, frontal korteks ve amigdaladaki nörotrofik faktörleri, astrositleri ve glukokortikoid reseptörlerini modüle ederek stres kaynaklı bilişsel eksiklikleri iyileştirmektedir (Shilpa ve ark., 2017) .

Yapılan deneysel çalışmalarda çevresel zenginleştirmenin glukokortikoid reseptörlerini modüle ederek stres kaynaklı bilişsel eksiklikleri iyileştirdiği gösterilmiştir (Olsson ve ark., 1994; Shilpa ve ark., 2017). Ayrıca hipokampal MR/GR mRNA seviyelerini arttırarak HPA ekseninin hiperaktivasyonunu iyileştirdiği bildirilmiştir (Zhang ve ark., 2011). Çevresel zenginleştirmenin anksiyolitik etkisi, glukokortikoid seviyelerinin modülasyonuyla ortaya çıkmaktadır (Xu ve ark., 2009). Zenginleştirilmiş koşullarda barındırma sonrası farelerde gözlenen kaygı benzeri davranıştaki azalmanın, bazolateral amigdalada düşük seviyedeki CRHR1 mRNA ekspresyonu ile de ilişkili olduğu bildirilmiştir (Sztainberg ve ark., 2010). Yaşam boyu uygulanan ÇZ'nin beyinde yaşlanmaya spesifik apoptoz ve pro-inflamatuar belirteçlerdeki artışları olumlu yönde etkilediği gösterilmiştir (Birch ve Kelly, 2019).

Çevresel zenginleştirmede sıçanlar, daha büyük gruplarda barındırılarak çeşitli karmaşık nesneler ve mekansal yapılandırmalara maruz bırakılmaktadır. Böylece sıçanlara daha karmaşık sosyal etkileşimlerde bulunmaları için fırsat sağlanmaktadır (Bakos ve ark., 2009; Kempermann, 2019). Bu çalışmaların çoğu yetişkin kemirgenlerde yapılmış olup ileri yaşlarda uygulanan ÇZ'nin etkileri hakkında daha az bilgi bulunmaktadır (Cortese ve ark., 2018; Fuchs, Cosquer, ve ark., 2016; Sampedro-Piquero ve ark., 2016). Yapılan bir çalışmada kısa süreli çevresel zenginleştirmenin de hipokampal fonksiyonu iyileştirmek için yeterli olduğu gösterilmiştir (Cortese ve ark., 2018). ÇZ'nin etkisi kemirgenlerin yaşına, zenginleştirmenin başlangıç zamanı, süresi ve içeriğine bağlı olarak değişmektedir (Lambert ve ark., 2016; Sampedro-Piquero ve ark., 2016; Simpson ve Kelly, 2011). ÇZ'nin yaşlılarda oluşturulan stres üzerine etkileri ile ilgili az sayıdaki çalışmalardan birinde, stres uygulanan yaşlı sıçanlarda anksiyete davranışlarının ÇZ ile azaltıldığı gösterilmiştir (Sampedro-Piquero ve ark., 2016).

Çevresel zenginleştirme uygulamalarının etkileri pek çok çalışmada incelenmiş olmasına rağmen yaşlılık döneminde başlatılan ÇZ uygulamasının etkileri hakkında az sayıda bilgi bulunmaktadır (Kumar ve ark., 2012; Stein, O'dell ve ark., 2016). Standardizasyonun sağlanabilmesi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır (Simpson ve Kelly, 2011).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Deney Hayvanları ve Barınma Koşulları

Deneysel çalışma için Bağcılar Eğitim ve Araştırma Hastanesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan onay alındı (29.12.2019 tarihli 95. kurul/2019-48 sayılı proje). Ayrıca Bezmialem Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan da gerekli izinler alındı (28.12.2020 tarihli 2020/241 sayılı onay). Deneysel çalışma, Bağcılar Eğitim ve Araştırma Hastanesi Deneysel Araştırma ve Beceri Geliştirme Merkezi (BADABEM)'nde ve Bezmialem Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarı'nda yürütüldü.

Çalışmada ortalama ağırlıkları 450-550 g olan Wistar Hannover ırkı, yaşlı (21 aylık) 32 adet erkek sıçan kullanıldı. Sıçanlar BADABEM'den temin edildi. Deney hayvanları, %50 - 60 nem, 22±2 °C sıcaklık ve saatte 15 devir havalandırma, 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık olacak şekilde standart laboratuvar koşullarında barındırıldı. Su ve yem ile *ad libitum* tarzda beslenme yapıldı. Beslenmede sıçan kullanımına uygun olarak üretilmiş 750 ml'lik suluklar ve paslanmaz çelik tel ızgara (PLEXX, Hollanda) üzerine konulmuş pelet sıçan yemi (MBD Deney Hayvanları Yemi, Türkiye) kullanıldı. Deney süresince vücut ağırlıkları on günde bir ölçüldü (Kern FCB 12K1, Almanya). Çalışmada kullanılan 32 adet sıçan randomize olarak her grupta 8 hayvan olacak şekilde, 4 gruba ayrıldı (Tablo 3.1).

Standart kafes (SK) grubu ve SK+KÖHS grubu 425 x 265 x 180 mm ölçülerindeki polikarbonat konvansiyonel Tip 3H kafeslerde (PLEXX, Hollanda) ikişerli olarak barındırıldı. ÇZ grubu ve ÇZ+KÖHS grubu ise 110 x 75 x 70 cm ölçülerindeki plastik yaşam alanında 8 sıçan olacak şekilde barındırıldı. Sıçanlar ortama adapte olmalarını sağlamak amacıyla 15 gün boyunca başka hayvanın bulunmadığı bir odada kafeslerinde barındırıldı. Adaptasyon süresi sonunda KÖHS ve SK+KÖHS grupları diğer grupların stresörlerden etkilenmesini engellemek amacıyla davranış testlerinin yapıldığı odaya alınarak deney sonuna kadar burada barındırıldı. Bakımları (yem-su verilmesi ve kafes temizliği) deney boyunca aynı araştırmacı ve hayvan bakıcısı tarafından yapıldı.

Tablo 3-1 : Hayvan grupları ve uygulanacak işlemler

Grup	Uygulanan işlemler
SK grubu	Standart kafeslerinde barındırıldı. Deney süresince herhangi bir uygulamaya maruz kalmadı.
SK+KÖHS grubu	Standart kafeslerinde barındırıldı. Kronik öngörülemeyen hafif stres protokolünde yer alan stresörler uygulandı.
ÇZ grubu	Çevresel zenginleştirme protokolü uygulandı. Deney süresince herhangi bir stresöre maruz kalmadı.
ÇZ+KÖHS grubu	Çevresel zenginleştirme protokolü uygulandı. Kronik öngörülemeyen hafif stres protokolünde yer alan stresörlere maruz kaldı.

3.2. Kronik Öngörülemeyen Hafif Stres Protokolü

Stres modeli olarak Willner ve ark. (1987) tarafından tanımlanan kronik öngörülemeyen hafif stres (KÖHS) protokolü modifiye edilerek uygulandı (Willner ve ark., 1987, 1992). Stres grubundaki sıçanlar, 6 hafta boyunca haftanın 7 günü rastgele uygulanan, öngörülemeyen hafif strese maruz bırakılarak kronik hafif stres modeli oluşturuldu. Aşağıda belirtilen stresörler (Tablo 3.2) adaptasyonu engellemek için değiştirilerek uygulandı. Aynı stresörün iki gün üst üste uygulanmamasına ve stresör sıralarının farklı olmasına dikkat edildi. Her iki stres grubuna da eş zamanlı ve eşdeğer stres protokolleri uygulandı.

Tablo 3-2 : KÖHS protokolünde uygulanan stresörler

Uygulanan stresör	**Uygulama süresi**
Kalabalık grup oluşturarak sınırlı bir alanda bulundurma	4 saat
Eğik bir kafeste (30 °) tutma	4 saat
Kedi sesine maruz bırakma	3 saat
Islak yatak (100 g mısır koçanı + 200 ml su) üzerinde bırakma	24 saat
Altlık yerine 15 cm yüksekliğinde sıcak su (40 °C) bulunan kafes içinde barındırma	10 dakika
Eş değiştirerek farklı hayvan grubu ile barındırma	14 saat
Altlıksız kafeste barındırma	15 saat
Yiyecek yoksunluğu ardından erişilemeyen yiyeceğe 1 saat maruz bırakma	14 saat
Su yoksunluğu ardından 1 saat boyunca boş bir şişeye maruz bırakma	14 saat
Aydınlık / karanlık döngüsünün tersine çevrilmesi	24 saat
30 dakika aralıklarla aydınlık/karanlık uygulaması	10 saat

Yukarıda belirtilen stresörler SK+KÖHS grubu ve ÇZ+KÖHS grubunda yer alan deney hayvanlarına 6 hafta boyunca ve davranış deneyleri tamamlanana kadar her gün uygulandı (Castelhano-Carlos ve ark., 2014; Jeong, 2006). SK ve ÇZ gruplarını stresörlerle etkilememek için KÖHS protokolü ayrı bir odada gerçekleştirildi (Şekil 3.1) (Şekil 3.2).



Şekil 3-1 : KÖHS protokolünde uygulanan stresörlerden eğik kafeste tutma

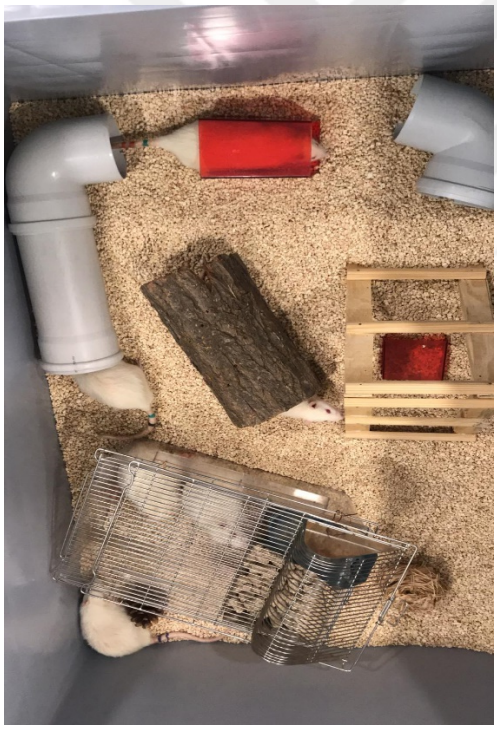


Şekil 3-2 : KÖHS protokolünde uygulanan stresörlerden su bulunan kafes içerisinde barındırma

Çevresel zenginleştirme (ÇZ), hayvanları zorlamayan karmaşık ve zorlu bir ortamın etkilerini araştırmak için kullanılan deneysel bir modeldir. ÇZ grupları için fiziksel aktivite ve sosyal etkileşimi arttıran oyuncaklar, tüneller, doğal materyaller içeren 110 x 75 x 70 cm ölçülerinde yaşam alanı oluşturuldu (Bakos ve ark., 2009; Castelhano-

Carlos ve ark., 2014) (Şekil 3.3). Bu yaşam alanında, konvansiyonel kafesler kullanılarak sıçanların su ve yem ile ad libitum tarzda beslenmeleri sağlandı. Sıçanların yaşam alanındaki bu kafeslere giriş-çıkış sağlayabilmeleri için kafesin kısa kenarı 15 x 15 cm ölçülerinde kesildi. Deney hayvanlarının yaşam alanına adaptasyon sağlamaları amacıyla ÇZ ve ÇZ+KÖHS gruplarında 6 haftalık stres protokolünden 2 hafta önce ÇZ protokolüne başlandı. Sakrifikasyon işlemine kadar protokol uygulandı.

ÇZ materyalleri haftada bir kere kafes yıkama makinası ve/veya otoklav kullanılarak temizlendi. Altlık materyalinin kirli bölümleri plastik kutu ile toplandı. Yerine temiz altlık materyali eklendi. İki haftada bir ise ÇZ yaşam alanı boşaltılarak temizlendi. Bu işlemler öncesi sıçanlar konvansiyonel kafese alındı. ÇZ materyallerinin yeri her temizlik sonrasında değiştirilerek sıçanların fiziksel aktivite ve sosyal etkileşimi arttırması amaçlandı.

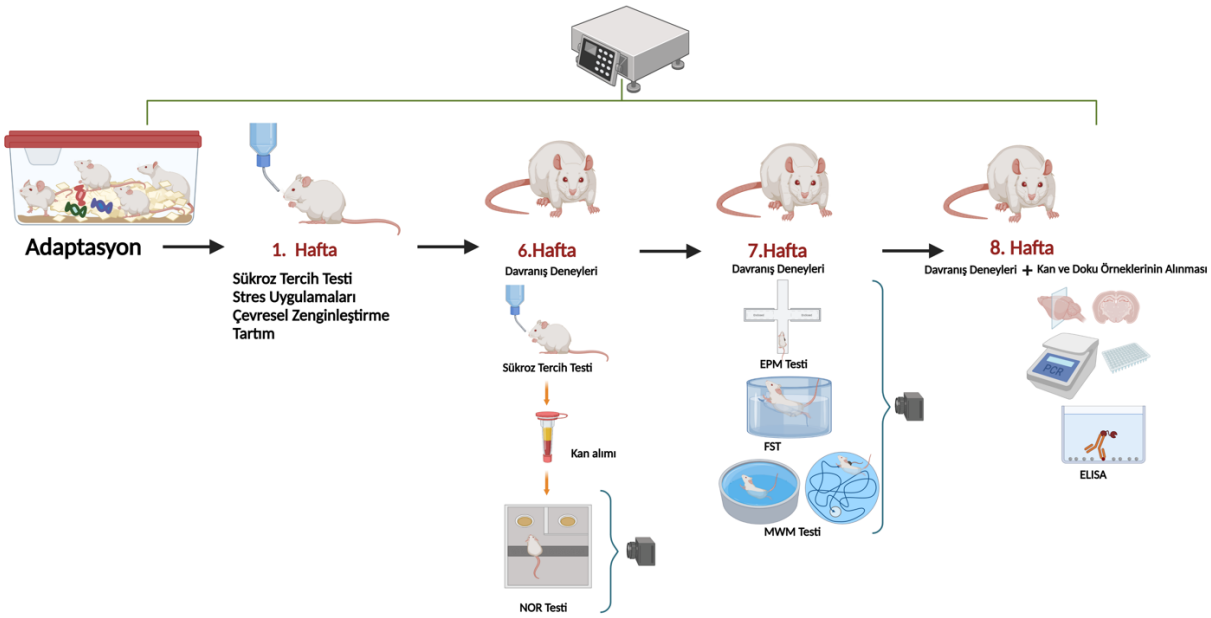


Şekil 3-3 : ÇZ grupları için oluşturulan yaşam alanı

3.3. Davranış Deneyleri

Tüm sıçanlar deney başlangıcında ve sonunda sükroz tercih testine tabi tutuldu. Deney sonunda hipokampus bağımlı öğrenme ve hafızanın değerlendirilmesi amacıyla Morris su labirenti (Morris water maze; MWM) ve yeni obje tanıma testi (Novel object recognition; NOR), davranışsal çaresizlik değerlendirilmesi için zorunlu yüzme testi

(Forced swimming test; FST), kaygı davranışlarının değerlendirilmesi için yükseltilmiş artı labirent testi (Elevated plus maze; EPM) uygulandı. Davranış deneyleri başlamadan 3 gün önce, sıçanlar günde 15 dakika deney odasında tutuldu. Sıçanların test ortamına alışmalarını sağlamak amacıyla testlerden 1 saat önce odaya taşındılar. Tüm testler günün 09.00 - 17.00 saatleri arasında, farklı gruplardaki hayvanlar randomize edilerek uygulandı. Çalışma prosedürü şekil 3.4'te gösterilmiştir.



Şekil 3-4: Çalışma prosedürü

3.3.1. Sükroz Tercih Testi

Stres süresince anhedoni benzeri davranışların zamana bağlı değerlendirilmesi amacıyla stres protokolü başlangıcında, 3. ve 6. haftasında tüm gruplara sükroz tercih testi (STT) uygulanmıştır. Deney başındaki STT için sıçanlar bireysel kafeslere alındı. Her sıçan için % 1'lik sükroz çözeltisi ve su bulunan iki suluk hazırlandı. 24 saat boyunca ayrı kafeslerdeki sıçanların iki şişeye de erişmesine izin verildi. Su ve sükroz şişelerinin yerleri 12 saatte bir değiştirildi. 24 saat adaptasyon uygulandı. Adaptasyon sonrası sıçanlar kendi kafeslerine alınarak 24 saatlik su ve yem kısıtlaması uygulandı (Shen ve ark., 2019). Adaptasyon periyodunda tüketilen su ve sükroz miktarının eşit olması sebebiyle test konsantrasyonunun % 2 olarak düzenlenmesine karar verildi. Test, sıçanların aktif saatlerine denk gelecek şekilde düzenlendi ve 19.30 - 20.30 saatleri

arasında 1 saat süreyle bireysel kafeslere alınan sıçanlara bir şişede 100 ml su ve diğer şişede 100 ml % 2'lik sükroz çözeltisi verildi. Bu sürede sıçanların su ve sükroz çözeltisi tüketimi kaydedildi. Daha sonra sükroz tercihi; tüketilen sükroz çözeltisi/(tüketilen sükroz çözeltisi + su) x 100 formülü ile hesaplandı.

Bazal sükroz tercih testinin gerçekleştirilmesinden sonra stres gruplarına stres protokolü uygulanmaya başlandı. Protokolün 3. ve 6. haftasında 24 saatlik açlık sonrası sükroz tercih testi tüm gruplara tekrarlandı.

3.3.2. Yeni Obje Tanıma Testi

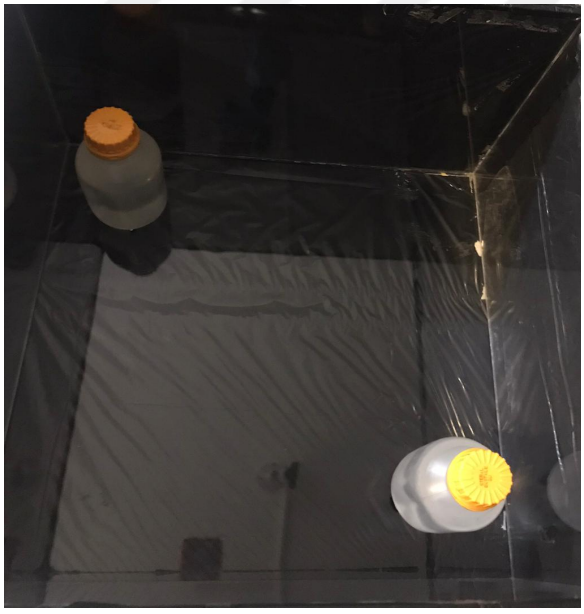
Öğrenme ve hafızanın değerlendirilmesi amacıyla gerçekleştirilen obje tanıma testi, uzamsal bir ortamda yeni objenin algılanma düzeyini belirler. Test, 50 x 50 x 50 cm boyutlarında, şeffaf pleksiglas malzemeden yapılmış üstü açık bir düzenekte yarı karanlık ortamda gerçekleştirildi. Düzeneğin dışı siyah plastik ile kaplanarak sıçanların test alanı dışını görmesi engellendi. Objeler seçilirken boyutlarının benzer olmasına, şekil ve renklerinin ise farklı olmasına dikkat edildi (Şekil 3.5). Yeni obje tanıma testi, alıştırma, eğitim (E) ve test (T) günü olmak üzere üç günlük bir süreçte tamamlandı. Sıçanlar test ortamına alışmalarını sağlamak amacıyla testlerden 1 saat önce odaya taşındılar. Test kutusu ve objeler her ölçüm sonrası kokusal uyaranların ortadan kaldırılması için % 70'lik etanol ile temizlenip kağıt havlu ile kurulandı.



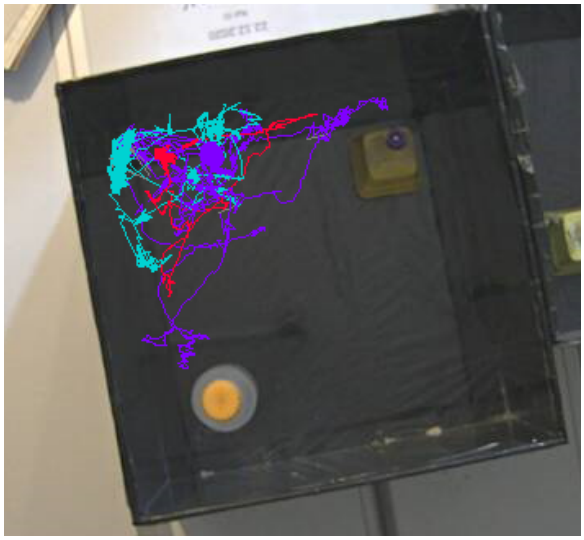
Şekil 3-5: Yeni obje tanıma testinde kullanılan objeler

Alıştırma periyodunda aynı kafesteki hayvanlar iki grup halinde düzeneğe konuldu ve 10 dakika ortamda hiçbir obje olmaksızın test düzeneğine alışmaları sağlandı. Bu süreç tüm sıçanlar için tekrarlandı.

Eğitim ve test üçer dakikalık periyottan oluştu ve 24 saat ara ile tekrarlandı. İlk 3 dakika eğitim evresinde aynı iki obje test düzeneğine yerleştirilip 3 dakikalık süreçte deney hayvanının düzenekte serbestçe gezinerek bu objeleri tanıması sağlandı (Şekil 3.6). Üç dakikalık süre dolduğunda hayvan düzenekten alındı ve kafesine konuldu (E). Yirmi dört saat sonra E'de sunulan objelerden bir tanesi değiştirilerek sıçan tekrar aynı düzeneğe alındı ve 3 dakika boyunca düzenekteki iki obje ile de serbestçe vakit geçirmesi sağlandı. Eski ve yeni objeyi incelemek için geçirdikleri süre saptandı (T) (Şekil 3.7). Periyotlar video takip sistemi (Ethovision XT, Noldus Information Technology, Hollanda) kullanılarak kayıt altına alındı. Hayvanların T'de her iki objeyle ilgilenme süreleri (bakma, dokunma ve koklama) ve sıklığı video takip sistemi tarafından ölçüldü. Sıçanın yeni objeye karşı ilgisinin eski objeye karşı ilgisine oranı, öğrenme ve bellek fonksiyonunun bir ölçüsü olarak kabul edildi (Bevins ve Besheer, 2006).



Şekil 3-6: Yeni obje tanıma testi eğitim (E) periyodu

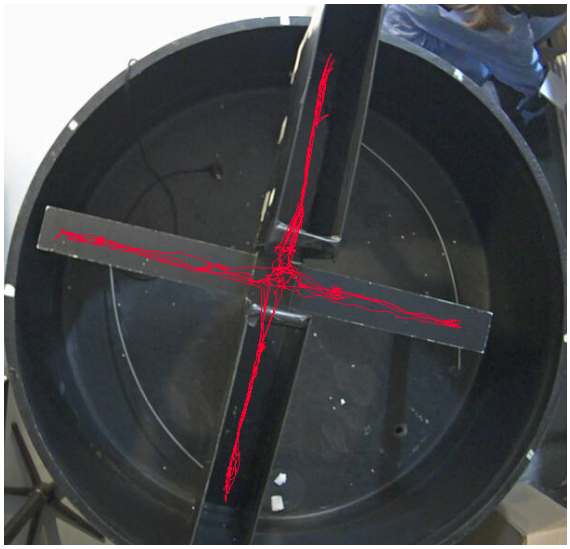


Şekil 3-7: Yeni obje tanıma testi test (T) periyodu video takip sistemi görüntüsü

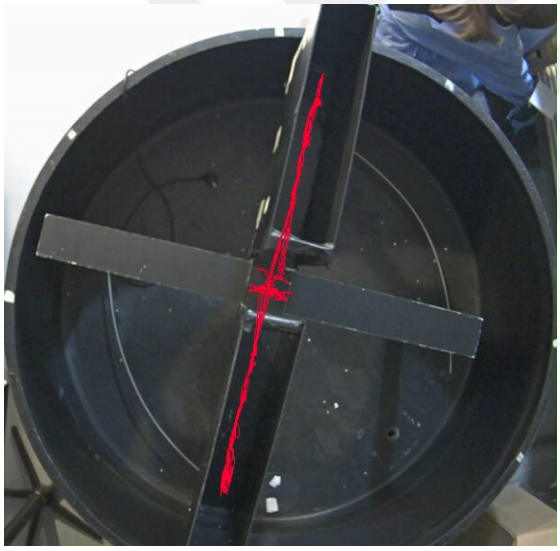
3.3.3. Yükseltilmiş Artı Labirent Testi

Sıçanların kaygı davranışlarını değerlendirmek için uygulanan bu testte, açık ve kapalı alanların tercih edilmesi, sıçanların korunan alanları tercih etmesi veya yeni alanları keşfetme motivasyonu ile ilişkilendirilir. Test için 50 cm uzunluğunda ve 10 cm genişliğinde artı şekilde tasarlanmış ikisi açık, ikisi kapalı dört koldan oluşan labirent kullanıldı. Labirent, literatüre uygun olarak mat siyah ve temizlenebilir yüzeyli pleksiglas malzemeden oluşmaktadır (Walf ve Frye, 2007). Labirent, perde ile odanın diğer bölümünden ayrılarak sıçanların deneyi yapan kişiyi görmesi engellendi. Sıçanlar testlerden 1 saat önce test ortamına alışmalarını sağlamak amacıyla odaya taşındılar (ÇZ ve SK grupları). Her bir sıçan teste alınmadan önce kokusal uyaranların ortadan kaldırılması için, yükseltilmiş artı labirent % 70'lik etanol ile temizlenip kağıt havlu ile kurulandı.

Sıçan kafesinden çıkarıldı ve labirent kollarının birleştiği orta alana, deneyi yapan kişinin tam karşısındaki açık kola bakacak şekilde yerleştirildi. Test süresi olan 5 dakika boyunca her bir sıçanın açık ve kapalı kollara giriş sayısı, açık ve kapalı kolda, merkezde kalış süresi video takip sistemi (Ethovision XT, Noldus Information Technology, Hollanda) kullanılarak kayıt altına alındı (Şekil 3.8). Dört bacağın da açık ya da kapalı kolda olması kol girişi olarak kaydedildi (Şekil 3.9). Açık kollarda geçirilen zamanın kapalı kollarda geçirilen zamana oranını kullanarak sıçanların kaygı davranışları değerlendirildi.



Şekil 3-8: EPM'de dört kolun da kullanıldığı video takip sistemi görüntüsü



Şekil 3-9: EPM'de kapalı kolların kullanıldığı video takip sistemi görüntüsü

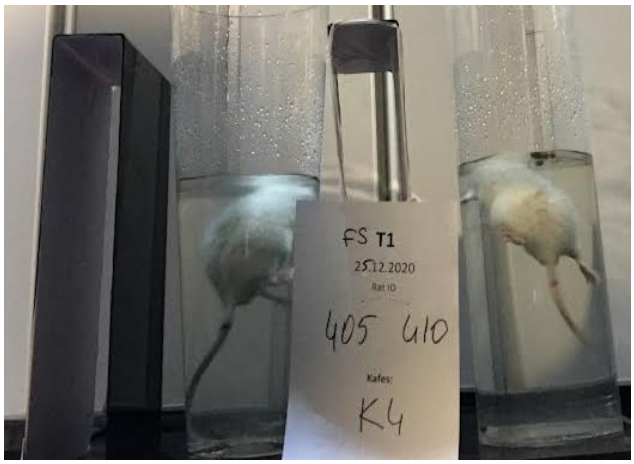
3.3.4. Zorunlu Yüzme Testi

Davranışsal çaresizlik testi olarak da bilinen bu test, ilk olarak Porsolt ve arkadaşları tarafından 1977 yılında tanımlanmıştır. Zorunlu yüzme testi (Forced swimming test; FST) ile sıçanların su dolu ve kaçamayacakları silindir bir kapta hareketsiz kalma süreleri ölçülmekte ve bu sürenin uzaması davranışsal çaresizlik ile ilişkilendirilmektedir (Porsolt ve ark., 1977). Bu test, sıçanın kaçamayacağı bir strese maruz kalması sonucunda hareketsiz kalarak kaçma çabasının sona ermesini göstermektedir.

Deney prosedürü için 50 cm yüksekliğinde ve 20 cm çapında su dolu şeffaf silindirik cam kaplar kullanıldı. Kaplar 23 ± 1 °C'de musluk suyuyla doldurulduu ve su derinliği sıçanın boyundan yüksek olacak şekilde ayarlandı (de Kloet ve Molendijk, 2016).

Sıçanlara 24 saat arayla 2 seans uygulandı. Ön test aşaması olan ilk seansta 15 dakika boyunca suya bırakılan sıçanlar, yüzme kabına ve suya alıştırıldılar. Ayrıca bu seans ile sıçanlara ortamın kaçınılmaz olduğunun da öğretilmesi amaçlandı. Test aşaması olan ikinci seansta sıçan 5 dakika suda bırakıldı ve bu aşama kamera ile kayıt altına alındı (Şekil 3.10). Süre sonunda sıçan kabın içinden çıkarıldı ve havlu ile kurulanarak geçici kurutma kafesine yerleştirildi. Bir sonraki sıçan üzerinde herhangi bir etki oluşmasını önlemek için her seanstan sonra su temizlendi.

Test seansına ait kayıtlar izlenerek sıçanların mobilizasyon (sıçanın ayaklarının hareket etmesi, yüzme-mücadele) ve immobilizasyon (sıçanın sadece başının suyun üzerinde olması, hareketsiz yüzme) süreleri kronometre ile ölçüldü. Sıçanların immobilizasyon sürelerinin uzaması davranışsal çaresizlik ile ilişkilendirilirken mobilizasyon sürelerinin uzaması ise mücadele motivasyonu olarak değerlendirildi.



Şekil 3-10: Zorunlu yüzme testi

3.3.5. Morris Su Labirenti Testi

Öğrenme ve hafızanın değerlendirilmesi amacıyla gerçekleştirilen Morris su labirenti testi (MWM), 150 cm çapında, 60 cm derinliğindeki standart havuzda yapıldı (Morris, 1984). Havuz varsayımsal olarak birbirini kesen iki dik doğru ile dört eşit kadrana ayrıldı. Her bir kadrana numara verildi. Havuz, kadranlarından birini (4

numaralı) ortalayacak ve merkez ile duvarlara eşit uzaklıkta yerleştirilen 15 cm genişliğindeki platformun 1,5 cm üzerine çıkacak şekilde su ile dolduruldu. Bu platformun havuz içinde bütün öğrenme alıştırmalarında ve bütün sıçanlar için aynı yerde olmasına dikkat edildi. Dört kadranın sınırları ve numaraları, platformun yeri ve sınırları video takip sistemine (Ethovision XT, Noldus Information Technology, Hollanda) kaydedildi.

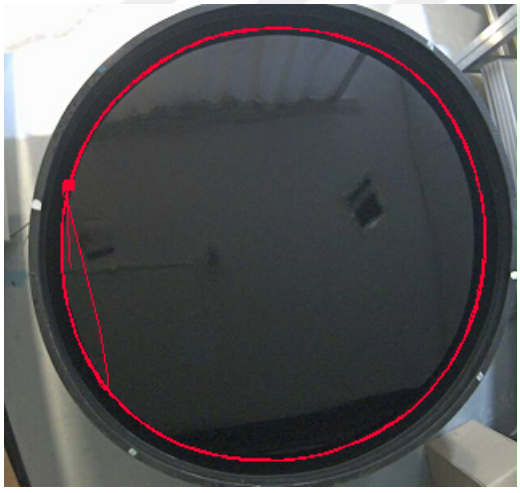
Sıçanın havuzda yüzerken konumunu algılaması amacıyla odanın içindeki her nesnenin deneyin başlangıcından sonuna kadar aynı yerde durmasına dikkat edildi. Havuzun su sıcaklığı otomatik ısıtıcı ile 24 °C' de sabitlendi. Su sıçanların platformu görmesine engel olmak için gıda boyası ile bulanıklaştırıldı ve bütün aşamalarda bulanık kaldı. Tüm testler video takip sistemi (Ethovision XT, Noldus Information Technology, Hollanda) kullanılarak kayıt altına alındı. Sıçanların havuzu görmesine engel olmak amacıyla yüzleri havuzun duvarına dönük olacak şekilde suya bırakıldılar. MWM şu aşamalarda gerçekleştirildi:

1. Öğrenme alıştırmaları: Tüm sıçanlara 4 gün boyunca günde dört kez uygulandı. Sıçanların suya bırakıldığı kadran sırası her gün için randomize olarak belirlendi (Tablo 3.3). Her alıştırmada sıçanlar farklı kadrandan ve yüzleri havuzun duvarına dönük olarak suya bırakıldı. Sıçanların yüzerek platformu bulmaları beklendi. Platformu bulan sıçanların platform üzerinde 30 sn kalmalarına izin verildi. Her alıştırma maksimum 60 sn sürdü. Süre sonunda platformu bulamayan sıçan platforma yönlendirildi ve 15 sn platformda durması beklendi. Daha sonra havlu ile kurutularak geçici kurutma kafesine yerleştirildi. Her sıçan, günde dört kez ve 10 dakika ara ile öğrenme denemelerine tabii tutuldu.

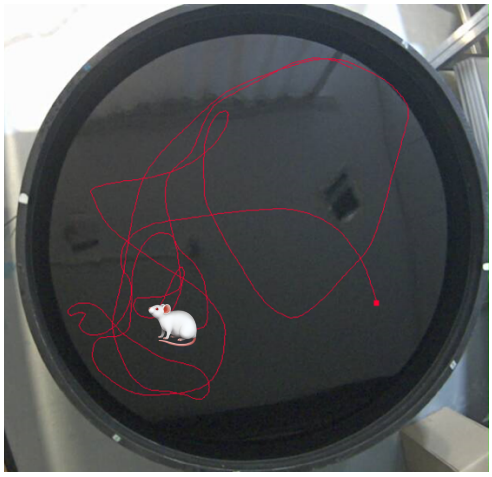
Tablo 3-3 : MWM sıçanların suya bırakma kadran sırası

Gün	Suya bırakma kadran sıralaması	Hedef kadran
1. gün	1-2-3-4	4
2. gün	4-3-2-1	4
3. gün	3-1-4-2	4
4. gün	2-3-1-4	4
Hafıza testi	2	4

2. Hafıza testi: Öğrenme alıştırmalarını takip eden gün (5. gün) platform havuzdan kaldırıldı ve platformun bulunduğu alanda 40 cm genişliğinde hayali bir alan bilgisayarda video takip sistemi üzerinde işaretlendi. Sıçanlar öğrenme alıştırmalarında yer alan platforma en uzak kadrandan (2 numaralı) yüzmeye başlatıldı. Altmış sn yüzdürülen sıçanlar süre sonunda havlu ile kurutularak geçici kurutma kafesine yerleştirildi. Tüm denemeler tankın tamamını görecek şekilde konumlanmış kamera ile kayıt altına alındı. Sonrasında bu kayıtlar NOLDUS video takip sistemi ve uygun yazılımı kullanılarak analiz edildi. Yapılan analizlerde öğrenme alıştırmalarında; yüzme hızı, platformu bulma süresi, platform çevresinde geçirdiği süre, izlediği yol, her kadranda bulunduğu süre ve yüzme mesafesi belirlendi (Şekil 3.11) (Şekil 3.12). İstatistiksel analizlerde kullanmak üzere öğrenme alıştırmalarında her bir verinin ortalaması alındı. Hafıza testinde; yüzme hızı, her kadranda geçirilen süre, öğrenme alıştırmalarında platformun bulunduğu kadranda geçirilen süre, platform bulunana kadar izlenilen yol ve katedilen mesafe belirlendi. İzlenilen yol verisi kalitatif olarak elde edilirken diğer veriler kantitatif olarak değerlendirildi.



Şekil 3-11 : Öğrenme alıştırmalarından 1. güne ait katedilen mesafe görüntüsü



Şekil 3-12 : Öğrenme alıştırmalarından 4. güne ait katedilen mesafe görüntüsü

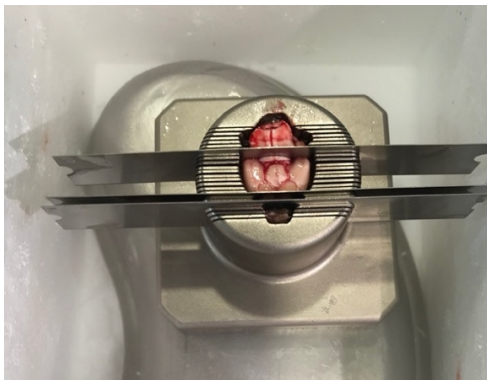
3.4. Kan ve Doku Örneklerinin Alınması

Kan almak için, hayvanların yaşlı olması ve kuyruk derisinin yeterli miktarda kan almaya uygun olmaması sebebiyle jugular ven tercih edildi. Stres ve çevresel zenginleştirme protokolü tamamlandıktan sonra en yüksek kortikosteron seviyesini belirlemek için karanlık başlangıcında ve en düşük kortikosteron seviyesini belirlemek için aydınlık başlangıcında (1 gün arayla ve toplamda tüm hayvanlardan 1 saat içerisinde) kan örnekleri alındı. Sıçanların kan alma öncesinde strese girmesine engel olmak için işlem odasına tek tek alındılar. Kan alınacak odaya taşınan sıçanlar sabitlenerek jugular venden 0,5 - 1 ml kan alındı (Şekil 3.13). Kan örnekleri 14.000 devirde 10 dk santrifüj (Hettich Micro 120) edilerek serum elde edildi. Serum örnekleri, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) yöntemiyle serum kortikosteron seviyeleri belirlenene kadar - 80 °C derin dondurucuda (Thermo Fisher Scientific ULT1786-4-V49, ABD) muhafaza edildi.

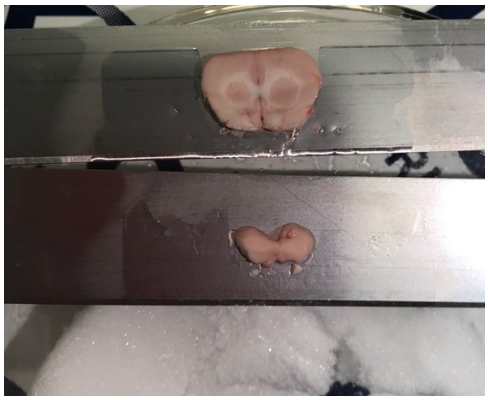


Şekil 3-13 : Juguler venden kan alma işlemi

Davranış deneyleri tamamlandıktan sonra sıçanlar, anestezi uygulanmadan giyotin kullanılarak dekapitasyon yöntemiyle sakrifiye edildi. Dekapitasyonu takiben sıvı azot kullanılarak hızlı dondurma işlemi uygulandı. Beyin kuru buz üzerinde çıkarılıp beyin matriksine yerleştirildi (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, catalogue No.69026-C). Matriks üzerinde bıçaklarla (Electron Microscopy Sciences, catalogue No.70933-70) (Şekil 3.14) 2 mm kalınlığında dilimlere ayrıldı (Şekil 3.15). Bu dilimlerden beyin atlasına göre (Paxinos ve Watson, 1998) prefrontal korteks, hipotalamus, amigdala ve hipokampus bölümleri çıkartılarak mikrotüplere konuldu ve - 80 °C derin dondurucuda muhafaza edildi.



Şekil 3-14 : Beynin matrikse yerleştirilmesi



Şekil 3-15 : Matrikse yerleştirilmiş beyin dokusundan kesit alınması

3.5. Kortikosteron Seviyelerinin Belirlenmesi

Sıçanların serum örneklerinde ELISA yöntemiyle serum kortikosteron seviyeleri belirlendi. Bu amaçla hazır ticari kit (ENZO Corticosterone ELISA Kit Cat No. ADI-901-097, PA, ABD) kullanıldı. Kit protokolü aşağıda açıklandığı şekilde uygulandı.

1. Çalışmaya başlamadan önce serum örnekleri ve kit solüsyonları oda ısısına ulaşana kadar en az 30 dakika bekletildi.
2. Test tamponu 15 (10 ml), 90 ml deiyonize su ile sulandırılarak hazırlandı.
3. 5 adet standart; kit içinden çıkan 200.000 pg/ml'lik standardın 5 tüpe seri dilüsyonu ile elde edildi. Tüplerdeki kortikosteron konsantrasyonu sırasıyla 20.000, 4.000, 800, 160 ve 32 pg/ml olarak hazırlandı. Seyreltilmiş standartlar hazırlandıktan sonra 60 dakika içinde kullanıldı.
4. Yıkama tamponu (5 ml), 90 ml deiyonize su ile sulandırılarak hazırlandı.
5. Spesifik olmayan bağlanma (NSB) ve Bo (0 pg/ml Standart) kuyularına 100 µl standart seyreltici (Test tamponu 15) pipetlendi.
6. Mikroplak kuyucuklarına hazırlanan standartlardan 100'er µl pipetlendi.
7. Örnekler kuyucuklara 100'er µl pipetlendi.
8. NSB kuyularına 50 µl test tamponu 15 eklendi.
9. Toplam aktivite (TA) ve kör dışında her kuyucuğa 50 µl mavi konjugat pipetlendi.
10. Kör, toplam aktivite ve NSB dışında her kuyuya 50 µl sarı antikor pipetlendi.
11. Mikroplak oda sıcaklığında üzeri kapatılarak plak karıştırıcısında (New Brunswick Scientific, Innova 40R, ABD) 2 saat ~ 500 rpm'de inkübe edildi.

12. Kuyuların içeriği boşaltıldı ve her kuyuya 400 µl yıkama solüsyonu eklenerek yıkandı. Toplam 3 yıkama olacak şekilde yıkama 2 kez daha tekrarlandı. Son yıkamadan sonra, kuyucuklar tamamen boşaltıldı.
13. TA kuyucuklarına 5 µl mavi konjugattan eklendi.
14. Her kuyuya 200 µl pNpp substrat solüsyonu eklendi.
15. Mikroplak, 1 saat boyunca oda ısısında ve ışık almayacak şekilde inkübasyona bırakıldı. Tüm kuyucuklara 50 µl durdurma solusyonu eklendi. Mikroplak 10 dakika içerisinde 450 nm absorbansta okundu.

3.6. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR), dokulardan izole edilen RNA moleküllerinden ilk zincir komplementer deoksiribonükleik asit (cDNA) sentezi gerçekleştirilmesi sonucu, gen ekspresyonu analizlerinin yapılabildiği hızlı ve hassas bir yöntemdir (Santagati ve ark., 1997). İlgili beyin bölgelerinde GR, CRH ve CRHR1 mRNA seviyelerini belirlemek amacıyla RT-PCR yöntemi kullanıldı.

3.6.1. Ribonükleik Asit İzolasyonu

Dokulardan RNA izolasyonunda hazır ticari kitler (Jena Bioscience Cat. No. PP-210L) kullanıldı. Protokolde yer alan adımlar takip edildi.

1. RNA eldesi için her bir mikro santrifüj tüpüne 20-50 mg doku örneği konuldu.
2. Dokuları parçalamak için 2-Merkaptoetanol eklenmiş olan lizis tamponundan (300 µl) doku örneklerine aktarıldı ve dokular homojenizatör (ISOLAB Laborgeraete GmbH, Almanya) ile homojenize edildi.
3. Ek olarak dokuları parçalamak için 200 µl daha lizis tamponu eklenerek 15-30 saniye vorteks ile karıştırıldı. Numune hacminin lizis tampon hacminin %10'unu geçmemesine dikkat edildi.
4. Örnekler 10 dakika boyunca 10.000 g hızında santrifüj edildi. Santrifüj işlemi sonrasında elde edilen süpernatant yeni bir mikro santrifüj tüpüne aktarıldı.
5. RNA'nın kolona bağlanması ve bu şekilde atıkların uzaklaştırılması için, kolon aktivasyonu aşamasına geçildi. İki mililitrelik bir mikro santrifüj tüpüne spin kolon yerleştirildi. Spin kolona 100 µl aktivasyon tamponu eklendi. Otuz saniye 10.000 g hızında santrifüj edildi. Tampon kalıntıları uzaklaştırıldı.

6. Hazırlanan lizata 300 µl izopropanol eklendi ve vortekslendi.
7. Bu karışım spin kolona aktarılarak 30 saniye 10.000 g hızda santrifüj edildi. Sıvı uzaklaştırıldıktan sonra kolon yıkama aşamasına geçildi.
8. RNA'nın kolona bağlanmasından sonra, kolona 700 µl yıkama solüsyonu eklenip 30 saniye 10.000 g hızda santrifüj edildi.
9. Mikrotüp içindeki sıvı atıldıktan sonra ikinci kolona yıkama solüsyonundan 700 µl eklenerek 30 saniye 10.000 g hızda santrifüj edildi.
10. Sıvı yine atıldıktan sonra etanol kalıntısını gidermek için 2 dakika 10.000 g hızda tekrar santrifüj edildi.
11. Kolondan RNA'nın geri kazanılması için, spin kolon RNaz içermeyen mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi. Kolon membranının merkezine 40-50 µl elüsyon tamponu eklendi.
12. Oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edildikten sonra RNA'yı ayrıştırmak için 10.000 g hızında 1 dakika santrifüj edildi.
13. Kolonlar atıldıktan sonra tüp içinde kalan RNA'lar -80 °C'de muhafaza edildi.

3.6.2. Komplementer Deoksiribonükleik Asit Sentezi

Ribonükleik asitler buz üzerinde çözdürüldü. Elde edilen total RNA miktarı cDNA sentezi öncesinde nanodrop spektrofotometre (Implen NanoPhotometer NP80) ile ölçüldü. Elde edilen RNA'nın saflığı nükleik asit kullanılan reaksiyonların optimum performansı için önemlidir. Nükleik asit numunelerinin diğer moleküllerle kontamine olup olmadığını tespit etmek için A260/A280 ve A260/A230 oranları kullanıldı. A260/A280 oranı için ≈ 2,0 ve A260/A230 oranı için 2,0 - 2,2 aralığı RNA saflığı olarak kabul edildi (Anon, 2017; Thermo Scientific, 2012). A260/A280 oranı, proteinler 280 nm'de ışığı absorbe ettiği için nükleik asitlerin protein kontaminasyonunu değerlendirmek amacıyla kullanıldı. A260/A230 oranının düşük olması fenol veya guanidin kalıntısı, yüksek olması ise kör ölçüm için uygun olmayan bir çözelti olarak değerlendirildi.

Nanodrop spektrofotometre ile RNA miktar tayini yapıldıktan sonra yoğunlukları eşitlemek amacıyla her bir örnekten 1 ng/µl yoğunluğunda RNA alınarak cDNA sentezi gerçekleştirildi. Total RNA'dan ilk zincir komplementer DNA (cDNA) sentezi için Jena

Bioscience marka SCRIPT cDNA Synthesis Kiti (Cat. No. PCR-511S) kullanıldı. Bu kit; RNaz içermeyen su, deoksiribonükleozid trifosfat (dNTP), random primer, RNaz inhibitörü, SCRIPT ters transkriptaz (RT) tamponu, dithiothreitol (DTT) ve SCRIPT RT enzimi içermektedir. Bu enzim sıcaklık kararlılığı arttırılmış bir enzimdir, bu enzimi kullanarak 100 bp'den 10 kb uzunluğuna kadar ilk iplik cDNA sentezi gerçekleştirilebilir. Reaksiyon üretici firmanın sağladığı protokole göre aşağıdaki gibi gerçekleştirildi.

1. RNA'lar ve kit solüsyonları buz üzerinde çözdürüldü.
2. RNaz içermeyen bir tüpe sırasıyla her bir örnek için 4 µl SCRIPT RT tamponu, 1'er µl dNTP ve DTT stok solüsyonu, 0,5'er µl random primer, RNaz inhibitörü ve SCRIPT RT eklendi. Bileşenler pipetlenerek karıştırıldı.
3. 2 ml'lik mikro santrifüj tüplerine her birinde yukarıdaki karışımdan 7,5 µl olacak şekilde pipetleme yapıldı.
4. RNA konsantrasyonu her bir örnekte 1 ng/µl olacak şekilde, örneklerden kaç µl kullanılacağı hesaplandı.
5. 12,5 µl'den her örnek için hesaplanan RNA miktarı çıkarılarak ne kadar RNaz içermeyen su ekleneceği hesaplandı. Her örnek için hesaplama sonucuna göre ilgili tüpe RNaz içermeyen su ve RNA eklendi.
6. T100 Thermal Cycler (Bio-Rad, ABD) kullanıldı. 42 °C'de 10 dakika inkübasyonun ardından 50 °C'de 60 dakika inkübasyona bırakıldı. 70 °C'de 10 dakika boyunca bekletildi. Protokol 4 °C'de tamamlandı.
7. Tüpler buz üzerine alındı.
8. Elde edilen cDNA miktarı nanodrop spektrofotometre (Implen NanoPhotometer NP80) ile ölçüldü.
9. Gen ekspresyon seviyeleri belirlenene kadar cDNA'lar -20 °C derin dondurucuda muhafaza edildi.

3.6.3. Gen Ekspresyon Seviyelerinin Belirlenmesi

Gerçek zamanlı gen ekspresyon aşaması qPCR ProbesMaster (Jena Bioscience, Almanya) (Cat. No. PCR-360L) kiti kullanılarak gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Real-Time PCR) cihazında gerçekleştirildi (ABI 7500 Real-Time PCR

Systems, Applied Biosystems). Bu kit; qPCR prop-master (Jena Bioscience, Almanya) her bir gen için ticari primer prob karışımından oluşan test kiti ve PCR dereceli su içermektedir. Primer prob karışımını içeren TaqMan Gen Ekspresyon test kitleri (Thermofisher Scientific, Waltham, ABD) her bir gen için şu şekildedir; GAPDH (Rn01775763-g1), GR (Rn00561369-m1), CRH (Rn01462137-m1), CRHR1 (Rn00578611-m1). cDNA sentezi yapılan örnekler ve kit solüsyonları 4 °C'de soğutulmuş blok üzerine alınarak çözdürüldü.

1. GAPDH (Gliseraldehit 3-fosfat dehidrojenaz) geni referans (housekeeping) gen olarak kullanıldı. Hedef ve referans genler için iki ayrı çalışma karışımı hazırlandı. Çalışılacak örnekler, beyin bölgeleri (HT, HC, PFC ve A) ile hedef genler (CRH, CRH-R1 ve GR) ve referans gen (GAPDH) dikkate alınarak mikroplak tasarımları (Tablo 3.4) yapıldı.
2. 1 ml'lik tüpe her bir örnek için sırasıyla 10 µl qPCR prop-master, 7 µl PCR dereceli su, 1 µl primer prob eklendi. Bileşenler pipetlenerek karıştırıldı.
3. Hazırlanan karışım, mikroplak kuyucuklarına her birinde 18 µl olacak şekilde pipetlendi.
4. Mikroplak tasarımına uygun olarak her kuyucuğa ait olan cDNA'dan 2 µl eklendi. Mikroplak üzeri kapatılarak RT-PCR cihazına yerleştirildi.
5. RT-PCR cihazında örnekler protokoldeki koşullara bağlı kalınarak çoğaltıldı. Bu koşullar, ilk denatürasyon ve polimeraz aktivasyonu 95 °C'de 2 dakika 1 döngü, denatürasyon 95 °C'de 15 saniye 45 döngü, bağlanma ve uzama 60 °C'de 1 dakika 45 döngü şeklindeydi. Cihaz örneklerin yaydığı floresan miktarlarını ölçerek eşik döngü (Ct) değerlerini belirledi. Bu süre içerisinde kontaminasyon ve spesifik olmayan bir çoğalma olup olmadığını saptamak için zamana bağlı olarak oluşan floresan miktarının erime eğrisi analizi de yapıldı. Ekspresyon seviyeleri belirlenirken hedef genler (CRH, CRH-R1 ve GR) ve referans geni (GAPDH) için, beyin bölgelerinin (HT, HC, PFC ve A) örneklerine ait olan Ct değerleri kullanıldı. Her bir hedef gene ait olan Ct değerinden GAPDH genine ait olan Ct değeri çıkarılarak veriler normailize edildi (ΔCt). Normalize edilen verilere $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülü (ΔΔCt = ΔCt (her bir örnek) – ΔCt (Kontrol ortalaması)) uygulandı ve elde edilen ham veriler düzenlenerek istatistik çalışmasına uygun hale getirildi.

Tablo 3-4 : Hipotalamusa ait mikroplak tasarımı (hedef gen (GR) ve kontrol gen (GAPDH))

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	GR 1	GR 2	GR 3	GR 4	GR 5	GR 6	GR 7	GR 8	GR 9	GR 10	GR 11	GR 12
B	GR 13	GR 14	GR 15	GR 16		GR 17	GR 18	GR 19	GR 20	GR 21	GR 22	GR 23
C	GR 24	GR 25	GR 26	GR 28	GR 29	GR 30	GR 31	GR 32	GR 33	GR 34	GR 35	GR NTC
D												
E	GAPDH 1	GAPDH 2	GAPDH 3	GAPDH 4	GAPDH 5	GAPDH 6	GAPDH 7	GAPDH 8	GAPDH 9	GAPDH 10	GAPDH 11	GAPDH 12
F	GAPDH 13	GAPDH 14	GAPDH 15	GAPDH 16	GAPDH 17	GAPDH 18	GAPDH 19	GAPDH 20	GAPDH 21	GAPDH 22	GAPDH 23	GAPDH 24
G	GAPDH 25	GAPDH 26	GAPDH 28	GAPDH 29	GAPDH 30	GAPDH 31	GAPDH 32	GAPDH 33	GAPDH 34	GAPDH 35	GAPDH NTC	

Mikroplak üzerinde yer alan satır ve sütun bilgilerine göre düzenlenmiştir. Hedef gen (GR) ve referans geni (GAPDH) altında yer alan numaralar örnek numaralarını göstermektedir.

3.7. İstatistik

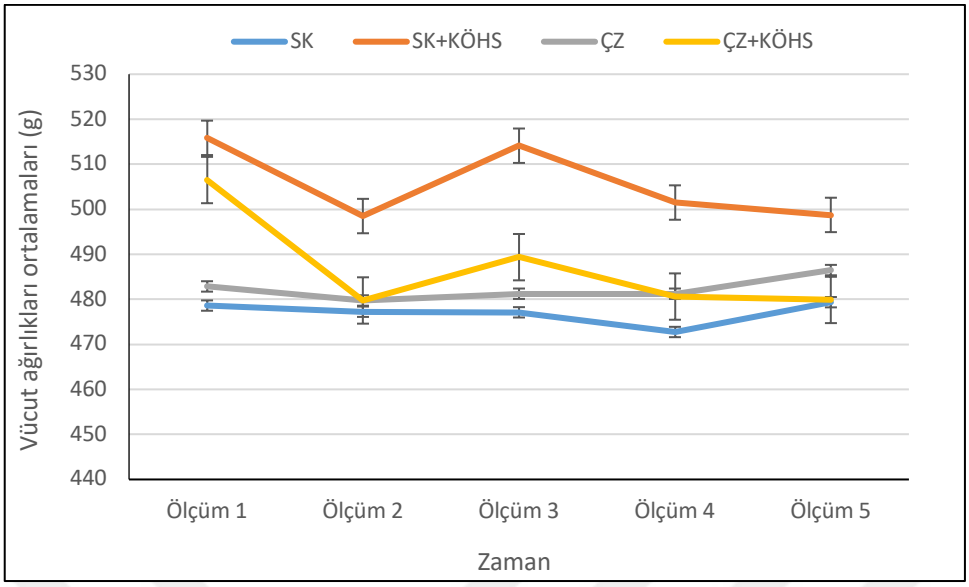
Verilerin istatistiksel analizi SPSS 22.0 programında yapıldı. Faktöriyel dizayn 2 x 2 uygulandı (stres etkisi: KÖHS (+) - KÖHS (-)) x (barınma etkisi: zenginleştirilmiş kafes - standart kafes). Öncelikle Shapiro-Wilk ve histogram grafikleri göz önünde bulundurularak verilerin normal dağılım gösterip göstermediği belirlendi. Dağılımın normallik varsayımının sağlanamadığı ölçümlerde nonparametrik testlerden Mann-Whitney U testi ve tekrarlı ölçümlerde Wilcoxon Testi; normallik varsayımının sağlandığı ölçümlerde ise iki faktörlü varyans analizi ve tekrarlı ölçümler için iki yönlü varyans analizi testleri uygulandı. Anlamlılık değeri $p \leq 0,05$ olarak belirlendi.

4. BULGULAR

4.1. Vücut Ağırlığı Bulguları

Yapılan uygulamaların vücut ağırlıkları ortalamaları üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla sıçanlar on günde bir tartılmıştır. Bu veriler tekrarlı ölçümler için iki yönlü varyans analizi ile kıyaslanmıştır. Varyans analizi sonuçlarına göre zamanın vücut ağırlıkları üzerindeki etkisinin önemli olduğu ortaya çıkmıştır ($F_{(4,112)}$= 25,919, p< 0,001) (Şekil 4.1). Stres faktörü ile zaman etkileşiminin vücut ağırlıkları üzerinde anlamlı etkisi vardır ($F_{(4,120)}$= 20,918, p< 0,001). Ancak, stres faktörünün ($F_{(1,28)}$= 1,745, p= 0,197), barınma faktörünün ($F_{(1,28)}$= 0,27, p= 0,607) ve bu faktörlerin etkileşiminin ($F_{(1,28)}$= 0.876, p= 0,357) vücut ağırlıkları üzerinde anlamlı bir etkisi görülmemiştir (Tablo 4.1).

Vücut ağırlığı üzerinde stres faktörünün etkisini zamana göre kıyasladığımızda birinci ölçümde kontrol ve stres grupları arasında anlamlı fark gözlenmiştir ($F_{(1,30)}$= 5,404, p= 0,027). Stres uygulanan grupların başlangıç vücut ağırlığı stres uygulanmayan gruplardan fazladır. Diğer ölçümlerde stres uygulamasının vücut ağırlıkları üzerinde anlamlı etkisi yoktur. Vücut ağırlıkları zaman faktörü göz önünde alınarak stres etkisine göre kıyaslandığında, stres uygulanmayan gruplarda zamanlar arasında (F= 5,383, p= 0,003) ve stres uygulanan gruplarda zamanlar arasında (F= 56,382, p< 0,001) anlamlı fark gözlenmiştir (Tablo 4.1). Stres uygulanan sıçanların zamanla vücut ağırlıklarının azaldığı görülmüştür (Şekil 4.1). Stres uygulanmayan sıçanların vücut ağırlıklarında ise periyodik olarak düzenli bir azalma bulunmamaktadır. Başlangıç ve bitiş arasında da önemli bir fark görülmemiştir (Tablo 4.1).



Şekil 4-1 : Deney grupları vücut ağırlığı ortalamalarının zamana göre değişimi

Ortalama değerlere ait standart hatalar hata çubukları şeklinde gösterilmiştir.

Tablo 4-1 : Deney gruplarının vücut ağırlıkları ortalamaları

		Vücut Ağırlığı		
		N	x̄	SE
Stres etkisi				
Stres (+)		16	496,488	8,99
Stres (-)		16	479,675	8,99
Barınma etkisi				
ÇZ		16	484,755	8,99
SK		16	491,388	8,99
Zaman etkisi				
1			495,969[a]	6,742
2			483,813[b,d,e]	6,37
3			490,469[c]	6,541
4			484,031[d]	6,3
5			486,125[e]	6,169
*Stres*zaman etkileşimi*				
	1		511,188[a]	9,259
	2		489,125[b,d,e]	8,873
Stres (+)	3		501,75[c]	9,225
	4		491,063[d,e]	8,85

	5	489,313[e]	8,627
Stres (-)	1	480,75[a,b,c,d]	9,259
	2	478,5[a,c]	8,873
	3	479,188[c]	9,225
	4	477[d,a,c]	8,85
	5	482,938[b]	8,627

	p değeri
Stres etkisi	0,197
Barınma etkisi	0,607
Zaman	**< 0,001***
Stres*zaman etkileşimi	**< 0,001***

		Grup ortalamaları			
Ölçüm	N	SK	SK+KÖHS	ÇZ	ÇZ+KÖHS
1	8	478,625	515,875	482,875	506,5
2	8	477,25	498,5	479,75	479,75
3	8	477,125	514,125	481,25	489,375
4	8	472,75	501,5	481,25	480,625
5	8	479,375	498,75	486,5	479,875

Ortalama ($\bar{x}$), standart hata (SE) ve p değerleri sunulmuştur.

* Zamanın ana etkisi ve stres*zaman etkileşiminin vücut ağırlıkları üzerindeki etkisi anlamlıdır ($p < 0,05$).

a,b,c,d,e: Her bir grup için aynı sütunda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki farklılıklar önemlidir ($p < 0,05$).

4.2. Adrenal ve Rölatif Adrenal Ağırlık Bulguları

Stres ve barınma faktörlerinin adrenal ağırlık üzerinde etkisi olup olmadığını ortaya koymak amacı ile Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. Analiz sonucunda stres faktörünün (U= 104, p= 0,381) ve barınma faktörünün (U= 127,5, p= 0,985) adrenal ağırlık üzerine etkisi gözlenmemiştir (Tablo 4.2).

Tablo 4-2 : Stres ve barınma faktörlerinin adrenal ağırlık verileri

		Grup	N	Sıra Ortalaması	Medyan	Min	Maks	p değeri
Adrenal ağırlık	Stres	Stres (+)	16	15	60	40	80	0,381
		Stres (-)	16	18	60	40	70	
	Barınma	ÇZ	16	16,53	60	40	80	0,985
		SK	16	16,47	60	40	70	

Gruplar	N	Adrenal ağırlık ortalamaları
SK	8	58,75
SK+KÖHS	8	57,5
ÇZ	8	55
ÇZ+KÖHS	8	62,5

Min (minimum değer), maks (maksimum değer) ve p değerleri sunulmuştur.

Stres ve barınma faktörlerinin rölatif adrenal ağırlık üzerine etkisini belirlemek amacıyla bağımsız örnekler için iki faktörlü varyans analizi yapılmıştır. Stres (F= 1,007, p= 0,324) ve barınmanın (F= 0,18, p= 0,675), ayrıca stres ve barınma faktörlerinin etkileşiminin de rölatif adrenal ağırlık üzerine anlamlı etkisi olmadığı görülmüştür ($F_{(3,28)}$= 3,682, p= 0,065) (Tablo 4.3).

Tablo 4-3 : Stres ve barınma faktörlerinin rölatif adrenal ağırlık verileri

		Grup	N	$\bar{x}$	SE	p değeri
Rölatif adrenal ağırlık	Stres	Stres (+)	16	0,131	0,005	0,324
		Stres (-)	16	0,124	0,005	
	Barınma	ÇZ	16	0,129	0,005	0,675
		SK	16	0,126	0,005	

Gruplar	N	Rölatif adrenal ağırlık ortalamaları
SK	8	0,128
SK+KÖHS	8	0,122
ÇZ	8	0,118
ÇZ+KÖHS	8	0,138

Ortalama ($\bar{x}$), standart hata (SE) ve p değerleri sunulmuştur.

4.3. Kortikosteron Bulguları

Diurnal kortikosteron salgısının normal ritminde gerçekleşip gerçekleşmediğini ortaya koymak için yapılan Wilcoxon İşaretli Sıralar testinin sonucuna göre kortikosteron seviyelerinin en düşük ve en yüksek ölçümleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmiştir (Z= -3,4, p= 0,001). Stres ve barınma değişkenlerinin sadece en düşük ve sadece en yüksek kortikosteron seviyeleri üzerine anlamlı bir etkisi olup olmadığını görmek için Mann-Whitney U testi yapılmıştır. Test sonuçlarına göre stres uygulamasının en düşük (U= 63, p= 0,185) ve en yüksek kortikosteron seviyeleri (U= 71,5, p= 0,511) üzerine anlamlı bir etkisi olmadığı görülmüştür. Benzer şekilde barınma tiplerinin en düşük (U= 81, p= 0,683) ve en yüksek kortikosteron seviyeleri (U= 75,5, p= 0,65) üzerine etkisi gözlenmemiştir (Tablo 4.4).

Tablo 4-4 : Grupların en düşük ve en yüksek kortikosteron seviyeleri

	Kortikosteron seviyeleri (40ng/ml)							
		En düşük				En yüksek		
	N	Medyan	Min	Maks	N	Medyan	Min	Maks
Stres etkisi								
Stres (+)	13	32,76	7,23	351,82	13	72,57	21,56	407,57
Stres (-)	14	20,07	0,8	255,7	13	43,52	7,81	344,79
Barınma etkisi								
ÇZ	12	58,074	7,23	255,73	13	41,87	7,81	407,57
SK	15	26,05	0,8	351,82	13	53,56	13,52	390,37
		U	p değeri				U	p değeri
Stres etkisi		63	0,185				71,5	0,511
Barınma etkisi		81	0,683				75,5	0,65
		Sıra Ortalaması	Z					
Negatif sıralar	5	6,2	-3,4					
Pozitif sıralar	19	14,16						
Zaman								**< 0,001***

		Kortikosteron seviyeleri ortalaması	
Gruplar	N	En düşük	En yüksek
SK	8	46,08	86,637
SK+KÖHS	7	104,854	118,56
ÇZ	6	59,795	88,456
ÇZ+KÖHS	6	56,353	128,35

Min (minimum değer), maks (maksimum değer) değer, Z ve p değerleri sunulmuştur.

* Kortikosteron seviyelerinin en düşük ve en yüksek ölçümleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmiştir ($p< 0,05$).

4.4. Davranış Bulguları

4.4.1. STT Bulguları

Stres ve barınmanın sıçanlarda anhedoni benzeri davranışlar üzerine etkisini belirlemek amacıyla 3 farklı zamanda STT gerçekleştirilmiştir. KÖHS protokolü öncesi, KÖHS protokolünün 3. ve 6. haftalarında alınan bu ölçümlerden elde edilen STT ortalamaları tekrarlı ölçümler için iki yönlü varyans analizi ile kıyaslanmıştır. Varyans analizi sonuçlarına göre stres faktörünün ($F_{(1,28)}= 0,843$, $p= 0,366$), barınma faktörünün ($F_{(1,28)}= 0,001$, $p= 0,977$), zamanın ($F_{(2,56)}= 1,443$, $p= 0,245$) STT üzerinde ana etkilerinin anlamlı olmadığı görülmüştür. Stres, barınma, zaman faktörlerinin etkileşiminin STT üzerinde anlamlı etkisi gözlenmiştir ($F_{(2,56)}= 4,271$, $p= 0,019$) (Tablo 4.5). Stres faktörü göz önünde bulundurulduğunda stres uygulanan ÇZ ve SK gruplarının 1. ve 3. ölçümleri arasında fark olduğu gözlenmiştir. Zamana bağlı olarak ÇZ grubunda sükroz tüketiminin azaldığı, SK grubunda ise arttığı görülmüştür. Stres uygulanmayan ÇZ ve SK gruplarında ise sükroz tüketiminde zamana bağlı bir fark gözlenmemiştir.

Tablo 4-5 : Stres ve barınma faktörlerinin STT'ye etkileri

	STT		
	N	$\bar{x}$	SE
Stres etkisi			
Stres (+)	16	0,729	0,014
Stres (-)	16	0,746	0,014
Barınma etkisi			
ÇZ	16	0,738	0,014
SK	16	0,737	0,014

Zaman etkisi				
1			0,722	0,018
2			0,752	0,013
3			0,738	0,01
*Stres*barınma*zaman etkileşimi*				
Stres (+)	ÇZ	1	0,78[a]	0,036
		2	0,748 [a,b]	0,026
		3	0,701[b]	0,02
	SK	1	0,66[a]	0,036
		2	0,738 [a,b]	0,026
		3	0,744[b]	0,2
Stres (-)	ÇZ	1	0,695	0,036
		2	0,768	0,026
		3	0,733	0,02
	SK	1	0,753	0,036
		2	0,754	0,026
		3	0,775	0,02

	p değeri
Stres etkisi	0,366
Barınma etkisi	0,977
Stres*barınma etkileşimi	0,15
Zaman	0,245
Stres*barınma*zaman etkileşimi	**0,019***

		STT ortalamaları		
Gruplar	N	STT1	STT2	STT3
SK	8	0,061	0,062	0,015
SK+KÖHS	8	0,056	0,066	0,017
ÇZ	8	0,059	0,061	0,016
ÇZ+KÖHS	8	0,05	0,066	0,019

Ortalama ($\bar{x}$), standart hata (SE) ve p değerleri sunulmuştur.

* Stres*barınma*zaman etkileşiminin STT üzerindeki etkisi anlamlıdır ($p < 0,05$).

a,b,c,d,e: Her bir grup için aynı sütunda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki farklılıklar önemlidir ($p < 0,05$).

4.4.2. NOR Bulguları

Stres ve barınma faktörlerinin NOR testi ile ölçülen öğrenme ve hafıza sonuçları üzerinde bir etkisi olup olmadığını ortaya koymak amacı ile eski obje ilgi sıklığı, eski obje ilgi süresi, yeni obje ilgi sıklığı, yeni obje ilgi süresi ve yeni obje ilgi süresinin eski obje ilgi süresine oranı değişkenleri için Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. Analiz sonuçlarına göre stres faktörünün eski obje ilgi sıklığı (U= 100,5, p= 0,847), eski obje ilgi süresi (U= 80,5, p= 0,616), yeni obje ilgi sıklığı (U= 108,5, p= 0,654), yeni obje ilgi süresi (U= 110,5, p= 0,935) ve yeni obje ilgi süresinin eski obje ilgi süresine oranı (U= 90, p= 0,981) üzerine etkisi gözlenmemiştir (Tablo 4.6). Barınma faktörünün de eski obje ilgi sıklığı (U= 97,5, p= 0,779), eski obje ilgi süresi (U= 75, p= 0,458), yeni obje ilgi sıklığı (U= 91, p= 0,264), yeni obje ilgi süresi (U= 77, p= 0,148) ve yeni obje ilgi süresinin eski obje ilgi süresine oranı (U= 77, p= 0,548) üzerine etkisi bulunmamıştır (Tablo 4.7).

Tablo 4-6 : NOR testindeki yeni ve eski objelere ilişkin parametreler üzerine stres uygulamasının etkisi

	Grup	N	Sıra Ortalaması	Medyan	Min	Maks	p değeri
eski obje ilgi sıklığı	Stres (+)	15	14,7	0	0	15	0,847
	Stres (-)	14	15,32	1,5	0	13	
eski obje ilgi süresi	Stres (+)	13	13,19	0	0	10,12	0,616
	Stres (-)	14	14,75	0,52	0	5,16	
yeni obje ilgi sıklığı	Stres (+)	16	16,72	6	0	22	0,654
	Stres (-)	15	15,23	1	0	17	
yeni obje ilgi süresi	Stres (+)	15	15,63	0,8	0	18,76	0,935
	Stres (-)	15	15,37	0,92	0	11,64	
yeni obje/eski obje ilgisi	Stres (+)	13	14,08	0	0	1,415	0,981
	Stres (-)	14	13,93	0	0	1,979	

Gruplar	eski obje ilgi sıklığı	eski obje ilgi süresi	yeni obje ilgi sıklığı	yeni obje ilgi süresi	yeni obje/eski obje ilgisi
SK	2,88	0,468	2,25	1,585	0,116
SK+KÖHS	4,13	3,028	7,5	4,502	0,369
ÇZ	3,67	2,394	7,43	4,085	0,532
ÇZ+KÖHS	2,43	0,386	5,75	2,565	0,168

Min (minimum değer), maks (maksimum değer) ve p değerleri sunulmuştur.

Tablo 4-7 : NOR testindeki yeni ve eski objelere ilişkin parametreler üzerine barınma tiplerinin etkisi

	Grup	N	Sıra Ortalaması	Medyan	Min	Maks.	p değeri
eski obje ilgi sıklığı	ÇZ	13	15,5	3	0	10	0,779
	SK	16	14,59	0	0	15	
eski obje ilgi süresi	ÇZ	13	15,23	1	0	5,16	0,458
	SK	14	12,86	0	0	10,12	
yeni obje ilgi sıklığı	ÇZ	15	17,93	7	0	17	0,264
	SK	16	14,19	0	0	22	
yeni obje ilgi süresi	ÇZ	15	17,87	2,76	0	10,68	0,148
	SK	15	13,13	0	0	18,76	
yeni obje/eski obje ilgisi	ÇZ	12	15,08	0,89	0	1,979	0,548
	SK	15	13,13	0	0	1,415	

Min (minimum değer), maks (maksimum değer) ve p değerleri sunulmuştur.

4.4.3. FST Bulguları

Stres ve barınma faktörlerinin FST ile ölçülen mobilite süresi üzerinde etkisi olup olmadığını ortaya koymak amacı ile Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. Analiz sonucunda stres faktörünün (U= 110, p= 0,951) ve barınma faktörünün (U= 88,5, p= 0,334) FST mobilite süresi üzerine etkisi gözlenmemiştir (Tablo 4.8).

Tablo 4-8: Stres ve barınma faktörlerinin FST mobilite süresine etkileri

		Grup	N	Sıra Ortalaması	Medyan	Min	Maks	p değeri
Mobilite süresi	Stres	Stres (+)	16	15,38	220	181	265	0,951
		Stres (-)	14	15,64	224,5	170	273	
	Barınma	ÇZ	16	14,03	217	195	250	0,334
		SK	14	17,18	230	170	273	

Gruplar	N	Mobilite süresi ortalamaları
SK	6	219,83
SK+KÖHS	8	231,75
ÇZ	8	222,38
ÇZ+KÖHS	8	210,38

Min (minimum değer), maks (maksimum değer) ve p değerleri sunulmuştur.

4.4.4. EPM Bulguları

Sıçanların kaygı davranışlarını değerlendirmek amacıyla uygulanan EPM testi ölçümleri üzerinde stres ve barınma faktörlerinin bir etkisi olup olmadığını ortaya koymak amacı ile kapalı alanlara giriş sıklığı, kapalı alanda geçirilen süre, açık alanlara giriş sıklığı, açık alanda geçirilen süre, orta alana giriş sıklığı, orta alanda geçirilen süre ve toplam mesafe değişkenleri için Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. Analiz sonuçlarına göre stres faktörünün toplam mesafe (U= 66, p= 0,033) değişkeni üzerine anlamlı etkisi vardır. Ancak kapalı alanlara giriş sıklığı (U= 89, p= 0,149), kapalı alanda geçirilen süre (U= 91, p= 0,171), açık alanlara giriş sıklığı (U= 111, p= 0,539), açık alanda geçirilen süre (U= 95, p= 0,224), orta alana giriş sıklığı (U= 110, p= 0,515) ve orta alanda geçirilen süre (U= 93, p= 0,299) üzerine etkisi gözlenmemiştir (Tablo 4.9). Barınma faktörünün de kapalı alanlara giriş sıklığı (U= 120,5, p= 0,78), kapalı alanda geçirilen süre (U= 115, p= 0,642), açık alanlara giriş sıklığı (U= 111,5, p= 0,539), açık alanda geçirilen süre (U= 105,5, p= 0,402), orta alana giriş sıklığı (U= 102,5, p= 0,341), orta alanda geçirilen süre (U= 110, p= 0,711) ve toplam mesafe (U= 112, p= 0,77) değişkenleri üzerine etkisi bulunmamıştır (Tablo 4.10).

Tablo 4-9: Stres faktörünün EPM testinde ölçülen parametreler üzerine etkisi

	Grup	N	Sıra Ortalaması	Medyan	Min	Maks	p değeri
Kapalı alanlara giriş sıklığı	Stres (+)	16	18,94	3	1	12	0,149
(1)	Stres (-)	16	14,06	1	0	10	
Kapalı alanda geçirilen süre	Stres (+)	16	18,81	267,72	147,56	297,72	0,171
(2)	Stres (-)	16	14,19	211,52	0	299,04	
Açık alanlara giriş sıklığı	Stres (+)	16	15,44	1	0	7	0,539
(3)	Stres (-)	16	17,56	1,5	0	16	
Açık alanda geçirilen süre	Stres (+)	16	14,44	0,84	0	98,48	0,224
(4)	Stres (-)	16	18,56	13,12	0	295,92	
Orta alana giriş sıklığı (5)	Stres (+)	16	17,63	4	1	16	0,515
	Stres (-)	16	15,38	2	1	15	
Orta alanda geçirilen süre	Stres (+)	16	17,69	23,54	2,28	99,76	0,299
(6)	Stres (-)	15	14,2	18,32	0,96	99,72	
Toplam mesafe (7)	Stres (+)	15	19,38	656,538	347,116	1836,03	**0,033***
	Stres (-)	16	12,4	478,561	141,808	1606,16	

EPM testinde ölçülen parametrelerin grup ortalamaları

Gruplar	1	2	3	4	5	6	7
SK	2,75	145,46	4,38	127,44	5	27,06	507,464
SK+KÖHS	5,88	241,26	1,88	13,32	7,75	45,415	1051,762
ÇZ	3,13	187,57	2,63	51,955	5,13	26,234	701,454
ÇZ+KÖHS	2,88	259,33	1,38	15,245	4,13	25,425	742,981

Min (minimum değer), maks (maksimum değer) ve p değerleri sunulmuştur.

* Stres faktörünün toplam mesafe üzerine istatistiksel olarak anlamlı etkisi gözlenmiştir ($p<0,05$).

Tablo 4-10: Barınma faktörünün EPM testinde ölçülen parametreler üzerine etkisi

	Grup	N	Sıra Ortalaması	Medyan	Min	Maks	p değeri
Kapalı alanlara giriş sıklığı	ÇZ	16	16,03	2,5	0	8	0,78
	SK	16	16,97	1,5	0	12	
Kapalı alanda geçirilen süre	ÇZ	16	17,31	260,66	0	297,72	0,642
	SK	16	15,69	247,44	0	299,04	
Açık alanlara giriş sıklığı	ÇZ	16	15,47	1	0	8	0,539
	SK	16	17,53	1,5	0	16	
Açık alanda geçirilen süre	ÇZ	16	15,09	1,6	0	153,16	0,402
	SK	16	17,91	6,38	0	295,92	
Orta alana giriş sıklığı	ÇZ	16	14,91	3,5	1	15	0,341
	SK	16	18,09	5,5	1	16	
Orta alanda geçirilen süre	ÇZ	15	15,33	23,32	2,16	55,04	0,711
	SK	16	16,63	23,16	0,96	99,76	
Toplam mesafe	ÇZ	16	15,5	633,688	141,808	1836,03	0,77
	SK	15	16,53	689,457	234,513	1575,49	

Min (minimum değer), maks (maksimum değer) ve p değerleri sunulmuştur.

4.4.5. MWM Bulguları

Stres ve barınma faktörlerinin öğrenme ve hafıza değerlendirilmesi için gerçekleştirilen MWM testinde, platformu bulana kadar katedilen mesafe ortalaması üzerinde etkisini belirlemek amacıyla sıçanlara 4 gün öğrenme alıştırmaları uygulanmış, ard arda uygulanan bu alıştırmalardan elde edilen mesafe ortalamaları tekrarlı ölçümler için iki yönlü varyans analizi ile kıyaslanmıştır. Varyans analizi sonuçlarına göre sıçanların platformu bulana kadar katettiği mesafe ortalamaları ile zaman açısından

istatistiksel olarak anlamlı fark izlenmiştir ($F_{(13,27)}$= 60,31, p< 0,001). Stres faktörünün ($F_{(1,27)}$= 1,291, p= 0,266), barınma faktörünün ($F_{(1,27)}$= 0,453, p= 0,507) platformu bulana kadar katedilen mesafe ortalamaları üzerinde ana etkileri anlamlı olmamıştır. Ancak stres, barınma ve zaman etkileşiminin sıçanların öğrenme alıştırmalarındaki platformu bulana kadar katedilen mesafe üzerinde anlamlı etkisi vardır ($F_{(3,81)}$= 3,508, p= 0,032) (Tablo 4.11). Platformu bulana kadar katedilen mesafe ortalamaları, gruplar açısından incelendiğinde her bir grupta günler arasında sabit bir azalma olmadığı görülmektedir. Stres uygulanan ÇZ grubunda 3 ve 4. günler arasında anlamlı bir fark yokken SK grubunda 4. güne kadar azalma devam etmektedir. Stres uygulanmayan ÇZ grubunda 3 ve 4. günler arasında, SK grubunda ise 2, 3 ve 4. günler arasında anlamlı bir fark görülmemiştir.

Tablo 4-11: MWM öğrenme alıştırmalarında platformu bulana kadar katedilen mesafe

Platformu bulana kadar katedilen mesafe (cm)			
	N	x̄	SE
Stres etkisi			
Stres (+)	15	894,618	45,513
Stres (-)	16	820,184	47,11
Barınma etkisi			
ÇZ	16	879,448	45,513
SK	15	835,353	47,11

Zaman etkisi		Ortalama	SE
1		1302,365[a]	53,394
2		965,035[b]	44,866
3		637,366[c]	47,908
4		524,836[d]	56,95
*Stres*barınma*zaman etkileşimi*			
Stres (+) ÇZ	1	1361,594[a]	104,931
	2	983,258[b]	88,172
	3	739,877[c]	94,15
	4	583,88[c]	111,919

SK	1	1341,7[a]	104,931
	2	1053,305[b]	88,172
	3	671,998[c]	94,15
	4	421,328[d]	111,919
Stres (-) ÇZ	1	1386,645[a]	104,931
	2	1034,149[b]	88,172
	3	510,895[c]	94,15
	4	435,287[c]	111,919
SK	1	1119,52[a]	112,176
	2	789,43[b]	94,26
	3	626,695[b]	100,651
	4	658,851[b]	119,647

	p değeri
Stres etkisi	0,266
Barınma etkisi	0,507
Stres*barınma etkileşimi	0,988
Zaman	**< 0,001***
Stres*barınma*zaman etkileşimi	**0,032***

Ortalama ($\bar{x}$), standart hata (SE) ve p değerleri sunulmuştur.

* Zamanın ana etkisi ve stres*barınma*zaman etkileşiminin istatistiksel olarak anlamlı etkisi gözlenmiştir ($p< 0,05$).

a,b,c,d: Her bir grup için aynı sütunda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki farklılıklar önemlidir ($p < 0,05$).

Öğrenme ve hafızanın değerlendirilmesi amacıyla gerçekleştirilen MWM testinde stres ve barınmanın sıçanların ortalama platformu bulma süresi üzerinde etkisini belirlemek için 4 gün ard arda uygulanan öğrenme alıştırmalarından elde edilen veriler tekrarlı ölçümler için iki yönlü varyans analizi ile kıyaslanmıştır. Varyans analizi sonuçlarına göre sıçanların platformu bulma süresi ile zaman arasında istatistiksel olarak anlamlı fark izlenmiştir ($F_{(3,84)}= 33,156$, $p< 0,001$). Ancak, stres faktörünün ($F_{(1,28)}= 0,945$, $p= 0,339$), barınma faktörünün ($F_{(1,28)}= 0,22$, $p= 0,643$) ve bu faktörlerin etkileşiminin ($F_{(1,28)}= 0,958$, $p= 0,336$) ortalama platformu bulma süresi üzerinde anlamlı bir etkisi bulunmamaktadır (Tablo 4.12).

Tablo 4-12: MWM öğrenme alıştırmalarında platformu bulma süresi

	Platformu bulma süresi (sn)		
	N	x̄	SE
Stres etkisi			
Stres (+)	16	38,085	1,974
Stres (-)	16	35,371	1,974
Barınma etkisi			
Zenginleştirme kafesi	16	37,382	1,974
Standart kafes	16	36,073	1,974
Zaman etkisi		Ortalama	SE
1		50,034[a]	1,73
2		41,444[b]	1,905
3		30,281[c]	2,13
4		25,151[d]	2,819

	p değeri
Stres etkisi	0,339
Barınma etkisi	0,643
Stres*barınma etkileşimi	0,336
Zaman	**< 0,001***

		Platformu bulma süresi grup ortalamaları			
Gruplar	N	1. gün	2. gün	3. gün	4. gün
SK	8	43,608	36,852	32,222	34,338
SK+KÖHS	8	54,074	43,232	29,406	17,786
ÇZ	8	50,105	44,232	23,365	20,932
ÇZ+KÖHS	8	52,267	41,6	34,61	29,065

Ortalama (x̄), standart hata (SE) ve p değerleri sunulmuştur.

* Zamanın istatistiksel olarak anlamlı etkisi gözlenmiştir (p< 0,05).

a,b,c,d: Aynı sütunda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki farklılıklar önemlidir (p < 0,05).

Stres ve barınma etkisinin MWM platform kadranında geçirilen süre ortalamaları üzerinde etkisini belirlemek amacıyla sıçanların 4 günlük öğrenme alıştırmalarından elde edilen veriler kullanılmıştır. Platform kadranında geçirilen süre ortalamaları tekrarlı ölçümler için iki yönlü varyans analizi ile kıyaslanmıştır. Varyans analizi sonuçlarına göre sıçanların platform kadranında geçirdikleri süre ile zaman arasında istatistiksel olarak anlamlı fark izlenmiştir ($F_{(3,78)}$= 17,261, p< 0,001). Ancak, stres faktörünün ($F_{(1,26)}$= 0,604, p= 0,444), barınma faktörünün ($F_{(1,26)}$= 0,624, p= 0,437) ve bu faktörlerin etkileşiminin ($F_{(1,26)}$= 0,257, p= 0,617) platform kadranında geçirilen süre ortalaması üzerinde anlamlı bir etkisi bulunmamaktadır (Tablo 4.13).

Tablo 4-13: MWM platform kadranında geçirilen ortalama süre değerleri

Platform kadranında geçirilen ortalama süre (sn)			
	N	x̄	SE
Stres etkisi			
Stres (+)	16	10,072	0,584
Stres (-)	16	9,453	0,541
Barınma etkisi			
ÇZ	16	10,77	8,341
SK	16	9,448	8,871
Zaman etkisi		x̄	SE
1		12,676 [a]	0,539
2		10,798 [b]	0,715
3		8,765 [c]	0,715
4		6,811 [d]	0,662

	p değeri
Stres etkisi	0,444
Barınma etkisi	0,437
Stres*barınma etkileşimi	0,617
Zaman	**< 0,001***

Platform kadranında geçirilen süre grup ortalamaları

Gruplar	N	1. gün	2. gün	3. gün	4. gün
SK	8	10,368	8,244	6,602	7,602
SK+KÖHS	8	13,608	10,912	8,846	5,578
ÇZ	8	13,203	12,21	7,342	7,121
ÇZ+KÖHS	8	12,917	9,842	10,107	7,747

Ortalama ($\bar{x}$), standart hata (SE) ve p değerleri sunulmuştur.

* Zamanın istatistiksel olarak anlamlı etkisi gözlenmiştir ($p< 0,05$).

a,b,c,d: Aynı sütunda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki farklılıklar önemlidir ($p < 0,05$).

Stres ve barınmanın MWM'deki ortalama hız üzerine etkisini belirlemek amacıyla sıçanların 4 günlük öğrenme alıştırmalarından elde edilen hız ortalamaları kullanılmıştır. Bu veriler, tekrarlı ölçümler için iki yönlü varyans analizi ile kıyaslanmıştır. Varyans analizi sonuçlarına göre sıçanların ortalama hızları ile zaman arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur ($F_{(3,63)}= 1,713$, $p= 0,204$). Ayrıca, stres faktörünün ($F_{(1,21)}= 3,927$, $p= 0,061$), barınma faktörünün ($F_{(1,21)}= 1,375$, $p= 0,254$) ve bu faktörlerin etkileşiminin ($F_{(1,26)}= 0,204$, $p= 0,656$), ortalama hız üzerinde anlamlı bir etkisi bulunmamaktadır (Tablo 4.14).

Tablo 4-14: MWM öğrenme alıştırmaları ortalama hız değerleri

	Ortalama hız (cm/sn)		
	N	$\bar{x}$	SE
Stres etkisi			
Stres (+)	16	22,436	1,11
Stres (-)	16	25,507	1,081
Barınma etkisi			
Zenginleştirme kafesi	16	23,062	0,982
Standart kafes	16	24,88	1,199
Zaman etkisi		$\bar{x}$	SE
1		26,089 [a]	0,751
2		23,704 [b]	0,465
3		21,569 [c]	0,751
4		24,523 [a,b,c]	2,695

	p değeri
Stres etkisi	0,061
Barınma etkisi	0,254
Stres*barınma etkileşimi	0,656
Zaman	0,204

		Hız değerleri grup ortalamaları			
Gruplar	N	1. gün	2. gün	3. gün	4. gün
SK	8	25,116	25,293	21,982	34,672
SK+KÖHS	8	25,75	23,914	20,969	21,341
ÇZ	8	27,51	23,992	23,698	21,788
ÇZ+KÖHS	8	25,845	21,888	18,535	21,632

Ortalama ($\bar{x}$), standart hata (SE) ve p değerleri sunulmuştur.

a,b,c: Aynı sütunda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki farklılıklar önemlidir ($p < 0,05$).

Öğrenme alıştırmalarını takip eden gün (5. gün) platform kaldırılarak MWM hafıza testi gerçekleştirilmiştir. Hafıza testinde katedilen mesafe üzerine stres ve barınma faktörlerinin etkisini belirlemek amacıyla bağımsız örnekler için iki faktörlü varyans analizi yapılmıştır. Stresin ($F= 0,016$, $p= 0,9$). ve barınmanın ($F= 1.201$, $p= 0,283$) ana etkileri ayrıca stres ve barınma faktörlerinin etkileşimleri ($F_{(3,27)}= 0,534$, $p= 0,471$) istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır (Tablo 4.15).

Tablo 4-15: MWM hafıza testinde katedilen mesafe değeri

		Grup	N	$\bar{x}$	SE	p değeri
Katedilen mesafe	Stres	Stres (+)	15	1250,827	49,152	0,9
		Stres (-)	16	1242,119	47,485	
	Barınma	ÇZ	15	1209,03	49,152	0,283
		SK	16	1283,915	47,485	

Gruplar	N	Katedilen mesafe grup ortalamaları
SK	8	1349,608
SK+KÖHS	8	1390,164
ÇZ	8	1229,639
ÇZ+KÖHS	7	1196

Ortalama ($\bar{x}$), standart hata (SE) ve p değerleri sunulmuştur.

Stres ve barınma faktörlerinin MWM hafıza testinde sıçanların hızı üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla bağımsız örnekler için iki faktörlü varyans analizi yapılmıştır. Stresin (F= 0,009, p= 0,926) ve barınmanın (F=1,285, p=0,267) ana etkileri ayrıca stres ve barınma faktörlerinin etkileşimleri ($F_{(1,27)}$= 0,492, p= 0,489) istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır (Tablo 4.16).

Tablo 4-16: MWM hafıza testi hız parametresi

		Grup	N	x̄	SE	p değeri
Hız	Stres	Stres (+)	15	20,855	0,821	0,926
		Stres (-)	16	20,748	0,794	
	Barınma	ÇZ	15	20,154	0,821	0,267
		SK	16	21,448	0,794	

Gruplar	N	Hız grup ortalamaları
SK	8	22,512
SK+KÖHS	8	23,193
ÇZ	8	20,5
ÇZ+KÖHS	7	19,933

Ortalama (x̄), standart hata (SE) ve p değerleri sunulmuştur.

Stres ve barınma faktörlerinin MWM hafıza testinde hedef kadranda geçirilen süre üzerine etkisi olup olmadığını ortaya koymak amacı ile Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. Analiz sonucunda stres faktörünün (U= 112, p= 0,77) ve barınma faktörünün (U= 118,5 p= 0,953) hedef kadranda geçirilen süre üzerine etkisi gözlenmemiştir (Tablo 4.17).

Tablo 4-17: MWM hafıza testinde hedef kadranında geçirilen süre

		Grup	N	Sıra Ortalaması	Medyan	Min	Maks	p değeri
Hedef kadranda geçirilen süre	Stres	Stres (+)	15	16,53	15,52	11,56	23,16	0,77
		Stres (-)	16	15,5	15,56	8,44	33,32	
	Barınma	ÇZ	15	15,9	14,88	8,44	23,16	0,953
		SK	16	16,09	16,02	10	33,32	

Gruplar	N	Hedef kadranda geçirilen süre ortalamaları
SK	8	14,096
SK+KÖHS	8	14,84
ÇZ	8	14,93
ÇZ+KÖHS	7	15,35

Min (minimum değer), maks (maksimum değer) ve p değerleri sunulmuştur.

4.5. PCR Bulguları

4.5.1. Amigdala GR, CRH ve CRHR1 gen ekspresyonları

Stres ve barınma faktörlerinin amigdaladaki GR ve CRH gen ekspresyonları üzerinde etkisi olup olmadığını ortaya koymak amacı ile Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. Analiz sonucunda stres faktörünün A-GR gen ekspresyonu üzerinde anlamlı etkisi olduğu görülmüştür (U= 75, p= 0,047); stresin gen ekspresyonunu azalttığı saptanmıştır. A-CRH gen ekspresyonu üzerinde ise stresin anlamlı bir etkisi olmadığı saptanmıştır (U= 80, p= 0,44). Barınma faktörünün A-GR gen ekspresyonu üzerinde anlamlı etkisi gözlenmezken (U= 97, p= 0,254); A-CRH üzerinde anlamlı etki bulunmuştur (U= 38, p= 0,005) (Tablo 4.18). Çevresel zenginleştirme uygulaması gen ekspresyonunu artırmıştır.

Tablo 4-18: Amigdaladaki GR ve CRH gen ekspresyonları üzerine stres ve barınma etkisi

	Grup	N	Sıra Ortalaması	Median	Min	Maks	P değeri
A-GR	Stres (+)	16	13,19	0,868	0,021	2,091	**0,047***
	Stres (-)	16	19,81	1,736	0,017	3,478	
A-CRH	Stres (+)	15	13,33	0,209	0,05	3	0,44
	Stres (-)	13	15,85	0,284	0,023	8,933	
A-GR	ÇZ	16	18,44	1,64	0,017	3,478	0,254
	SK	16	14,56	1,035	0,021	2,134	
A-CRH	ÇZ	14	18,79	0,436	0,168	4,598	**0,005***
	SK	14	10,21	0,079	0,02	8,933	

		Gen ekspresyonları grup ortalamaları	
Gruplar	N	A-GR	A-CRH
SK	8	1,373	2,066
SK+KÖHS	8	0,696	0,445
ÇZ	8	1,676	1,471
ÇZ+KÖHS	8	1,237	0,691

Min (minimum değer), maks (maksimum değer) ve p değerleri sunulmuştur.
* İstatistiksel olarak anlamlıdır (p< 0,05).

Stres ve barınma faktörlerinin amigdaladaki A-CRHR1 gen ekspsresyonları üzerinde etkisi olup olmadığını analiz etmek için bağımsız örnekler için iki faktörlü varyans analizi yapılmıştır. Stresin (F= 3,053, p= 0,92) ve barınmanın (F= 0,114, p= 0,738) ana etkileri istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır. Stres ve barınma faktörlerinin A-CRHR1 gen ekspresyonu üzerinde istatistiksel önemde etkileşimi gözlenmemiştir ($F_{(1,28)}$= 0,695, p= 0,412) (Tablo 4.19).

Tablo 4-19: Amigdaladaki CRHR1 gen ekspresyonları üzerine stres ve barınma etkisi

		Grup	N	x̄	SE	p değeri
A-CRHR1	Stres	Stres (+)	16	0,919	0,214	0,092
		Stres (-)	16	1,144	0,214	
	Barınma	ÇZ	16	1,234	0,214	0,738
		SK	16	1,132	0,214	

	Gen ekspresyonları grup ortalaması	
Gruplar	N	A-CRHR1
SK	8	1,522
SK+KÖHS	8	0,742
ÇZ	8	1,372
ÇZ+KÖHS	8	1,096

Ortalama (x̄), standart hata (SE) ve p değerleri sunulmuştur.

4.5.2. Hipotalamus GR, CRH ve CRHR1 gen ekspresyonları

Stres ve barınma faktörlerinin hipotalamustaki GR, CRH ve CRHR1 gen ekspresyonları üzerinde etkisi olup olmadığını ortaya koymak amacı ile Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. Analiz sonucunda stres faktörünün HT-GR gen ekspresyonu (U= 55, p= 0,017), ve HT-CRHR1 gen ekspresyonu (U= 47, p= 0,01) üzerinde anlamlı etkisi olduğu görülmüştür; stresin gen ekspresyonunu azalttığı saptanmıştır. Ancak HT-CRH gen ekspresyonu üzerinde, stres faktörünün anlamlı etkisi yoktur (U= 89, p= 0,505). Barınma faktörünün de hipotalamustaki GR (U= 102, p= 0,683), CRH (U= 82, p= 0,331) ve CRHR1 gen ekspresyonları (U= 91, p= 0,561) üzerinde etkisi olmadığı gözlenmiştir (Tablo 4.20).

Tablo 4-20: Hipotalamustaki GR, CRH ve CRHR1 gen ekspresyonları üzerine stres ve barınma etkisi

	Grup	N	Sıra Ortalaması	Medyan	Min	Maks.	p değeri
HT-GR	Stres (+)	16	11,94	0,343	0,061	2,061	**0,017***
	Stres (-)	14	19,57	0,805	0,31	2,747	
HT-CRH	Stres (+)	16	13,93	0,603	0,139	1,653	0,505
	Stres (-)	14	16,14	0,823	0,39	2,588	
HT-CRHR1	Stres (+)	16	10,86	0,392	0,07	1,299	**0,01***
	Stres (-)	14	18,87	1,021	0,083	3,204	
HT-GR	ÇZ	15	16,2	0,484	0,124	2,619	0,683
	SK	15	14,8	0,531	0,061	2,747	
HT-CRH	ÇZ	14	16,64	0,952	0,325	2,588	0,331
	SK	15	13,47	0,603	0,139	1,388	
HT-CRHR1	ÇZ	14	14	0,505	0,07	2,102	0,561
	SK	15	15,93	0,682	0,083	3,204	

	Gen ekspresyonu grup ortalamaları		
Gruplar	HT-GR	HT-CRH	HT-CRHR1
SK	1,052	0,854	1,384
SK+KÖHS	0,424	0,616	0,552
ÇZ	1,037	1,025	0,971
ÇZ+KÖHS	0,807	0,941	0,476

* Stres faktörünün istatistiksel olarak anlamlı etkisi gözlenmiştir (p< 0,05).

4.5.3. Hipokampus GR, CRH ve CRHR1 gen ekspresyonları

Stres ve barınma faktörlerinin hipokampustaki GR ve CRHR1 gen ekspresyonları üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla bağımsız örnekler için iki faktörlü varyans analizi yapılmıştır. Stresin HC-GR (F= 0,074, p= 0,788) ile HC-CRHR1 (F= 0,146, p= 0,705) ve barınmanın HC-GR (F= 0,005, p= 0,945) ile HC-CRHR1 (F= 0,136, p= 0,715) gen ekspresyonları üzerinde anlamlı etkisi gözlenmemiştir. Stres ve barınma etkileşimi HC-GR ($F_{(1,28)}$= 0,028, p= 0,868) ve HC-CRHR1 ($F_{(1,28)}$= 0,086, p= 0,772) ekspresyonlarında istatitiksel olarak önemli değildir (Tablo 4.21).

Tablo 4-21: Hipokampustaki GR ve CRHR1 gen ekspresyonları üzerine stres ve barınma etkisi

	Grup	N	x̄	SE	p değeri
HC-GR	Stres (+)	16	1,181	0,218	0,788
	Stres (-)	16	1,265	0,218	
HC-CRHR1	Stres (+)	16	1,126	0,171	0,705
	Stres (-)	16	1,218	0,171	
HC-GR	ÇZ	16	1,212	0,218	0,945
	SK	16	1,234	0,218	
HC-CRHR1	ÇZ	16	1,217	0,171	0,715
	SK	16	1,127	0,171	

		Gen ekspresyonları grup ortalaması	
Gruplar	N	HC-GR	HC-CRHR1
SK	8	1,301	1,209
SK+KÖHS	8	1,165	1,045
ÇZ	8	1,228	1,227
ÇZ+KÖHS	8	1,196	1,205

Ortalama (x̄), standart hata (SE) ve p değerleri sunulmuştur.

Hipokampustaki CRH gen ekspreyonu üzerinde stresin anlamlı bir etkisinin olup olmadığını ortaya koymak için yapılan Mann Whitney U testinin sonucuna göre stres uygulanan ve uygulanmayan gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır (U= 117, p= 0,922). Ancak barınma etkisinin HC-CRH gen ekspresyonu üzerinde anlamlı etkisi olduğu gözlenmiştir (U= 0, p< 0,001) (Tablo 4.22). Çevresel zenginleştirme uygulaması gen ekspresyonunu azaltmıştır.

Tablo 4-22: Hipokampustaki CRH gen ekspreyonu üzerine stres ve barınma etkisi

	Grup	N	Sıra Ortalaması	Median	Min	Maks.	p değeri
HC-CRH	Stres (+)	16	15,81	0,221	0,003	1,454	0,922
	Stres (-)	15	16,2	0,018	0,003	2,09	
HC-CRH	ÇZ	16	8,5	0,006	0,003	0,018	**p< 0,001***
	SK	15	24	1,076	0,433	2,09	

	Gen ekspresyonu grup ortalaması	
Gruplar	N	HC-CRH
SK	7	1,207
SK+KÖHS	8	1,065
ÇZ	8	0,007
ÇZ+KÖHS	8	0,005

Min (minimum değer), maks (maksimum değer) ve p değerleri sunulmuştur.

* Barınma faktörünün istatistiksel olarak anlamlı etkisi gözlenmiştir(p<0,05).

4.5.4. Prefrontal korteks GR, CRH ve CRHR1 gen ekspresyonları

Stres ve barınma faktörlerinin prefrontal korteksteki GR ve CRHR1 gen ekspresyonları üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla bağımsız örnekler için iki faktörlü varyans analizi yapılmıştır. Stresin FC-GR (F= 0,114, p= 0,738) ve FC-CRHR1 (F= 0,854, p= 0,363) gen ekspresyonları üzerinde anlamlı etkisi gözlenmemiştir. Barınmanın FC-GR (F= 1,432, p= 0,241) ve FC-CRHR1 (F= 0,137, p= 0,714) gen ekspresyonları üzerinde etkisi olmadığı görülmüştür. Stres ve barınma etkileşimi FC-GR ($F_{(1,28)}$= 0,634, p= 0,432) ve FC-CRHR1 ($F_{(1,28)}$= 0,017, p= 0,898) gen ekspresyonlarında istatistiksel önemde bir değişime neden olmamıştır (Tablo 4.23).

Tablo 4-23: Prefrontal korteksteki GR ve CRHR1 gen ekspresyonları üzerine stres ve barınma etkisi

	Grup	N	Ortalama	SE	p değeri
FC-GR	Stres (+)	16	1,065	0,137	0,738
	Stres (-)	16	1,131	0,137	
FC-CRHR1	Stres (+)	15	0,944	0,122	0,363
	Stres (-)	16	1,103	0,122	
FC-GR	ÇZ	16	0,982	0,137	0,241
	SK	16	1,214	0,137	
FC-CRHR1	ÇZ	16	0,992	0,122	0,714
	SK	16	1,056	0,122	

		Gen ekspresyonları grup ortalaması	
Gruplar	N	FC-GR	FC-CRHR1
SK	8	1,169	1,146
SK+KÖHS	8	1,258	0,964
ÇZ	8	1,092	1,06
ÇZ+KÖHS	8	0,466	0,923

Ortalama ($\bar{x}$), standart hata (SE) ve p değerleri sunulmuştur.

Prefrontal korteksteki CRH gen ekspresyonu üzerine stresin anlamlı bir etkisinin olup olmadığını ortaya koymak için yapılan Mann-Whitney U testinin sonucuna göre stres faktörünün (U= 105, p= 0,572) ve barınma faktörünün (U= 102, p= 0,495) FC-CRH gen ekspresyonu üzerinde etkisi olmadığı gözlenmiştir (Tablo 4.24).

Tablo 4-24: Prefrontal korteksteki CRH gen ekspreyonu üzerine stres ve barınma etkisi

	Grup	N	Sıra Ortalaması	Medyan	Min	Maks	p değeri
FC-CRH	Stres (+)	15	15	1,005	0,086	1,973	0,572
	Stres (-)	16	16,94	0,929	0,034	3,711	
FC-CRH	ÇZ	16	17,13	1,045	0,086	3,711	0,495
	SK	15	14,8	0,656	0,286	2,436	

		Gen ekspresyonu grup ortalaması
Gruplar	N	FC-CRH
SK	8	1,062
SK+KÖHS	7	0,766
ÇZ	8	1,325
ÇZ+KÖHS	8	1,065

Min (minimum değer), maks (maksimum değer) ve p değerleri sunulmuştur.

5. TARTIŞMA

Kronik stres, stresöre uzun süre veya tekrarlı maruz kalınması sonucunda organizmanın verdiği fizyolojik yanıtlardır. HPA ekseninin aktive olmasıyla başlayan kronik stres yanıtı, çeşitli beyin bölgelerinde fonksiyonel ve morfolojik değişikliklere neden olmaktadır. Bu değişiklikler sonucu hafıza ve öğrenme bozuklukları, depresyon, anksiyete gibi durumlar ortaya çıkabilmektedir (Lupien ve ark., 2009).

Yetişkin sıçanlarda ÇZ'nin kronik stresin zararlı etkilerini hafiflettiğini gösteren çok sayıda çalışma mevcuttur (Costa ve ark., 2021; Shen ve ark., 2019; Shilpa ve ark., 2017; Wright ve Conrad, 2008). Çevresel zenginleştirme, erken dönemlerde uygulandığında başarının yüksek olduğu bilinmektedir (Simpson ve Kelly, 2011). Buna karşın ÇZ'nin geç dönem etkileriyle ilgili çalışmalar az sayıdadır. Örneğin yaşlılık döneminde uygulanan ÇZ'nin, yaşa bağlı bellek kayıplarını hafiflettiğine ilişkin sınırlı sayıda çalışmaya rastlanmıştır (Kumar ve ark., 2012; Stein ve ark., 2016). ÇZ uygulanan çalışmaların sadece %2'sinde 1 yaş üzeri sıçanlar kullanılmıştır (Simpson ve Kelly, 2011). Bu çalışmada kronik öngörülemeyen hafif stres protokolü uygulanan yaşlı sıçanlarda ÇZ'nin, stresin fizyolojik, davranışsal ve nörobiyolojik olası olumsuz etkilerini değiştirip değiştirmeyeceği araştırılmıştır. Bu amaçla da vücut ağırlığı, adrenal ağırlık, kortikosteron seviyeleri, sükroz tercih testi ile birlikte çeşitli beyin bölgelerindeki GR, CRH ve CRHR1 gen ekspresyonları incelenmiştir. Ayrıca öğrenme ve hafızayla ilgili testler yapılmıştır.

Kronik öngörülemeyen hafif stres modeline maruz bırakılan hayvanlarda vücut ağırlığının azaldığı daha önceki çalışmalarda bildirilmiştir (Nielsen ve ark., 2000; Willner ve ark., 1996). Bu çalışmada da KÖHS uygulanan hayvanlarda başlangıç ağırlığına göre vücut ağırlığında zamanla azalma gözlenmiştir. Vücut ağırlığının azalması strese maruz kalmanın göstergesidir (Westenbroek ve ark., 2005). Ancak barınma değişkenine göre istatistiki olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir. Literatürde standart koşullarda barındırılan Wistar soyu sıçanların ağırlığının 85. haftaya kadar artması, 85 ile 163. haftalar arası sabit kalıp sonrasında azalması fizyolojik sürecin bir sonucu olarak değerlendirilmiştir (Nistiar ve ark., 2012). Çalışmamızda KÖHS uygulanan gruplarda başlangıç ağırlığına göre zamanla

azalma meydana gelmesi stres ile ilişkiliyken (Willner ve ark., 1996), stres uygulanmayan gruplardaki hayvanların vücut ağırlıklarında zamanla artış olmaması yaşlanma ile açıklanmaktadır (Nistiar ve ark., 2012).

Çalışmamızda tüm sıçanların kortikosteron seviyelerinin en düşük ve en yüksek ölçümleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmiştir. Bu durum diurnal kortikosteron salgısının normal ritminde çalıştığını göstermektedir (Lightman ve ark., 2020). Ancak çalışmamızda stresin ve barınmanın en düşük ve en yüksek kortikosteron seviyeleri üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı tespit edilmiştir (Bourke ve Neigh, 2011). Ayrıca yaşlı sıçanlarda stres ve barınma faktörlerinin adrenal ağırlık ve rölatif adrenal ağırlık üzerine de etkisi olmadığı gözlenmiştir. ÇZ'nin ve stresin sıçanlarda kortikosteron seviyeleri üzerine etkisi olduğu bilinmektedir (Castelhano-Carlos ve ark., 2014; Moncek ve ark., 2004). Ancak nörokimyasal ve endokrin değişiklikler kronik stresin oluşturduğu etkileri her zaman yansıtmayabilir (Harris ve ark., 1998; Moncek ve ark., 2004; Westenbroek ve ark., 2005). Bazı çalışmalar KÖHS uygulanan sıçanlarda adrenal ağırlık ve kortikosteron seviyeleri üzerine stresin etkisinin olmadığını göstermiştir (Bourke ve Neigh, 2011; Harris ve ark., 1998). Literatürde adrenal ağırlık ve kortikosteron seviyelerinde değişiklik olmamasına rağmen vücut ağırlığının veya kilo alımının azalması strese maruz kalmanın göstergesi olarak kullanılmaktadır (Haidkind ve ark., 2003; Westenbroek ve ark., 2005). Çalışmamızda da stres uygulaması sonrasında kortikosteron seviyeleri ve adrenal ağırlıklarda artış görülmese de KÖHS uygulanan grupta zamana bağlı olarak ağırlık kaybı oluşması stresin etkisi olabileceğini göstermektedir.

Kronik öngörülemeyen stres modeli ile anhedoni, çaresizlik gibi depresyon belirtileri deney hayvanlarında oluşturulabilmektedir (Willner, 2005; Willner ve ark., 1996). Anhedoni, sükroz tercih testi ile ölçülmektedir. Bu testte sükroz tüketiminde azalma anhedoninin göstergesi olarak tanımlanır (Willner ve ark., 1987). Çalışmamızda STT'de, yapılan uygulamaların ana etkilerinde anlamlı bir fark görülmemesine rağmen stres, barınma ve zaman faktörlerinin etkileşiminin STT üzerinde anlamlı etkisi olduğu tespit edilmiştir. Zamana bağlı olarak stres uygulanan ÇZ grubunda sükroz tüketiminin azaldığı, SK grubunda ise arttığı görülmüştür. Daha önceki bir çalışmada stres uygulanan SK grubunda sükroz tüketiminin arttığı, çalışmalar arasındaki tutarsız sonuçların STT ve stres prosedürlerindeki

farklılıklardan kaynaklanabileceği rapor edilmiştir (Brenes Sáenz ve ark., 2006). Çalışmamızda stres uygulanan ÇZ grubunda sükroz tüketimi azalışı, zenginleştirilmiş ortama adaptasyon sonrası STT testinin bireysel kafeslerde yapılmasından dolayı oluşan stresten kaynaklanmış olabilir. ÇZ grubuyla ilgili bulgumuza benzer şekilde, ÇZ uygulamasının STT'de sükroz tüketimini azalttığı daha önce yapılan bir çalışmada da bildirilmiştir. Benzer çalışmalarda açıklandığı gibi biz de şişe konumu seçim davranışının verileri etkilemiş olabileceğini düşünmekteyiz (Brenes Sáenz ve ark., 2006; Simpson ve ark., 2012). Başka bir çalışmada ise Wistar soyu sıçanlarda KÖHS uygulamasının sükroz alımı üzerine önemli bir etkisinin olmadığı rapor edilmiştir. Aynı zamanda sıçanların cinsiyetine, yaşına ve soyuna bağlı olarak da testin sonucunun değişebildiği bildirilmiştir (Bourke ve Neigh, 2011; Karisetty ve ark., 2017; Nielsen ve ark., 2000; Pucilowski ve ark., 1993). Literatürde, anhedonik ve strese dayanıklı kemirgenler ayrım yapılmadan araştırmaya dahil edildiklerinde STT sonuçlarında tutarsızlıklar olabileceği de bildirilmiştir (Li ve ark., 2010). Bu strese dayanıklılık farklılıkları, verilerimizdeki STT ile ilgili beklenmedik durumu açıklayabilir (Remus ve ark., 2015). Stres uygulanmayan ÇZ ve SK gruplarında ise zaman açısından sükroz tüketiminde fark gözlenmemiştir. Literatürde yer alan başka çalışmalarda da ÇZ uygulamasının STT üzerinde anlamlı etkisinin olmadığı rapor edilmiştir (Shilpa ve ark., 2017). Laboratuvarlar arasında farklı protokoller uygulanması ve çeşitlilik gözlenmesi, sükroz tercih testini kullanan çalışmalar arasında karşılaştırma yapılmasını zorlaştırmaktadır (Fonseca-Rodrigues ve ark., 2022). STT'nin yukarıda da açıklandığı gibi ırk, soy ve protokol farklılıkları durumlarında tutarsız sonuçlara neden olduğu belirtilmiştir. Sonuç olarak verilerimiz, çalışmalarda bildirilen STT sonuçlarının birbirleriyle tutarsız olması sebebiyle STT testinin anhedoni için güvenli bir ölçüm olmadığı görüşünü desteklemektedir (Forbes ve ark., 1996; Nielsen ve ark., 2000).

Zorunlu yüzme testinde sıçanların hareketsiz kalma süresinin uzaması çaresizlik davranışı ile ilişkilendirilmektedir (Porsolt ve ark., 1977). Stres uygulamasının zorunlu yüzme testi ile değerlendirilen çaresizlik davranışını tetiklediği bilinmektedir (Crema ve ark., 2013). Ancak çalışmamızda sıçanların hareketsiz kalma süresi için KÖHS uygulanan gruplar ile uygulanmayan gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Daha önceki çalışmalarda da kronik stresin

FST'de hareketsizlik süresini etkilemediği rapor edilmiştir (Bourke ve Neigh, 2011; Haidkind ve ark., 2003). Literatürde yaşlanmanın hetorojen doğası gereği, yaşlılarda bilişsel işlevler ve depresyon durumlarında bireysel olarak varyasyon olabileceği bildirilmiştir. Çalışmamızda stresin FST mobilite süresi üzerine etkisinin gözlenmeme sebebinin literatürde bahsedilen varyasyon olabileceğini düşünmekteyiz (Balietti ve ark., 2019; Cui ve ark., 2006; Koh ve ark., 2007). Stresin FST üzerindeki etkisi konusundaki veriler çok çeşitlidir, uygulanan stres tipine ve yaşlanmaya bağlı olarak da değişebilmektedir (Bogdanova ve ark., 2013; Turner ve ark., 2012). Bu durumların bizim sonuçlarımızı açıklayabileceğini düşünmekteyiz. Çalışmamızda ÇZ'nin de sıçanların mobilite süresi üzerine etkisi gözlenmemiştir. Literatürde ÇZ'nin mobilite süresini arttırdığı bilinmektedir (Porsolt ve ark., 1977; Porsolt ve ark., 1978). Sonuçlarımızla uyumlu olarak az sayıda çalışmada ÇZ'nin mobilite süresini etkilemediği de bildirmiştir (Cui ve ark., 2006; Simpson ve ark., 2012). ÇZ nin mobilite süresini etkilediğini bildiren çalışma sonuçları ile bizim sonuçlarımız arasındaki uyumsuzluk, bizim çalışmamızda ÇZ'ye yaşlılık döneminde (21 ay) (Nistiar ve ark., 2012) başlanması ve 8 hafta uygulanan ÇZ'nin yaşlılık dönemi için kısa olmasından kaynaklanmış olabilir (Fuchs, Herbeaux, ve ark., 2016)

Kronik stresin sıçanlarda EPM testi ile değerlendirilen kaygı davranışını tetiklediği bildirilmiştir (Walf ve Frye, 2007). Çalışmamızda kaygı davranışını belirleyen parametrelere bakıldığında stres uygulamasının anlamlı etkisi olmadığı görüldü. Buna karşın EPM testinde KÖHS uygulanan gruplar ile uygulanmayan gruplar arasında toplam mesafe açısından anlamlı fark vardır. Stres uygulanan gruplardaki sıçanların daha fazla mesafe katettiği görüldü. Literatürde az sayıda da olsa stresin EPM testinde etkisi olmadığına dair veriler paylaşılmıştır (Bourke ve Neigh, 2011). Sonuçlarımızla uyumlu olarak daha önce yapılan çalışmalarda 3-8 haftalık KÖHS uygulamasının sıçanlarda lokomotor aktivite artışına neden olduğu bildirilmiştir (Harris ve ark., 1998; Spasojevic ve ark., 2016). Ancak bazı çalışmalar stresin keşif davranışını engelleyerek lokomotor aktiviteyi azalttığını rapor etmiştir (Hu ve ark., 2017; Katz, 1982). Stresin lokomotor aktiviteyi etkilemediğine dair çalışma da mevcuttur (Abelaira ve ark., 2013). Çalışmamızda stres uygulanan grupların daha fazla mesafe katetmesi lokomotor aktivitenin artmasından kaynaklanıyor olabilir (Karisetty ve ark., 2017; Mineur ve ark., 2006). Bazı

çalışmalarda lokomotor aktivite testi veya EPM'de aktivite artışı ile anksiyete arasında ters ilişki olduğu bildirilse de (Milner ve Crabbe, 2008; O'Leary ve ark., 2013), ikisi arasında herhangi bir ilişkinin olmadığını bildiren çalışmalar da bulunmaktadır (Abelaira ve ark., 2013; Şahin ve ark., 2015). Çalışmamızda KÖHS, kaygı davranışını tetiklememiş olsa da hiperlokomotor aktiviteye sebep oldu. Bu bulgumuzun stres göstergesi olduğunu düşünmekteyiz (Grønli ve ark., 2005; Mineur ve ark., 2006). Çalışmamızda ayrıca ÇZ'nin sıçanların EPM testi ile ölçülen kaygı davranışları üzerine etkisi gözlenmemiştir. Literatürde ÇZ'nin kronik stres ve depresyon kaynaklı kaygı davranışlarını iyileştirdiği rapor edilmiştir (Bhagya ve ark., 2017; Mahati ve ark., 2016). Ancak erkek sıçanlarda ÇZ'nin stresin anksiyojenik etkisini elimine etmediğini gösteren çalışmalar da bulunmaktadır (Bogdanova ve ark., 2013; Kentner ve ark., 2018; Simpson ve ark., 2012). Yaşlılık döneminde uygulanan ÇZ'nin sıçanların anksiyete ile ilgili davranışlarında değişime neden olmadığı, stresin anksiyojenik etkisini elimine etmediği çalışmamız özelinde söylenebilir.

Çalışmamızda öğrenme ve hafızayı değerlendirmek için gerçekleştirilen MWM testinin öğrenme aşamasında platformu bulana kadar katedilen mesafe, platformu bulma süresi ve platform kadranında geçirilen süre parametrelerinde zamanın etkisinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir. Bu parametreler ile ilgili değerlerin zamanla azalması tüm hayvanlarda öğrenmenin gerçekleştiğini göstermektedir. Ancak çalışmamızda barınma ve stresin ana etkisinin öğrenme ve bellek fonksiyonu üzerine anlamlı bir etkisi görülmemiştir. Buna karşın stres, barınma ve zaman etkileşiminin sıçanların öğrenme alıştırmalarındaki platformu bulana kadar katettiği mesafe üzerine etkisi vardır. Platformu bulana kadar katedilen mesafe ortalamalarında, zamanla azalma olduğu, ancak her grup kendi içinde değerlendirildiğinde her bir grupta günler arasında tutarlı bir azalma olmadığı görülmektedir. Stres uygulanan ÇZ grubunda üçüncü güne kadar katedilen mesafe azalırken, SK grubunda dördüncü güne kadar katedilen mesafe azalmaya devam etmiştir. Stres uygulanmayan ÇZ grubunda da üçüncü güne kadar mesafe ortalaması azalmış, SK grubunda ise ikinci günden sonra anlamlı bir azalma olmamıştır. Stres uygulanan ÇZ grubunda öğrenmenin daha erken tamamlandığı, SK grubunda ise öğrenmenin son güne kadar uzadığı izlenmiştir. Bu bulgular stres durumunda ÇZ uygulamasının öğrenme üzerinde olumlu etkisi olduğu şeklinde

yorumlanabilir (Morris, 1984). Stres uygulanmayan ÇZ grubunda ise platformu bulana kadar katedilen mesafe ortalamalarında üçüncü ve dördüncü günler arasında, SK grubunda ise ikinci, üçüncü ve dördüncü günler arasında anlamlı bir fark izlenmemiştir. Bu bulgumuzun, stres yokluğunda ÇZ uygulamasının öğrenme süreçleri üzerinde etkisi olmadığına işaret edebileceğini düşünmekteyiz. Geçmiş çalışmalar yaşlı sıçanlarda geç dönem ve erken dönem ÇZ uygulamalarının öğrenme süreçleri üzerinde farklı etkileri olduğunu göstermektedir (Fuchs, Cosquer, ve ark., 2016; Simpson ve Kelly, 2011). Bu farklılıklar, diğer çalışmaların ÇZ uygulamasına daha erken dönemde başlaması veya daha uzun süre uygulaması gibi nedenlerle açıklanabilir. Ayrıca stres uygulanmayan SK grubunda katedilen mesafenin ikinci günden sonra değişmemesi fakat stres uygulanan SK grubunda mesafe azalmasının son güne kadar sürmesini de stresin öğrenme sürecini uzattığı yönünde değerlendirdik. Yaşlı sıçanlarda öğrenme ve hafıza bozuklukları ile ilgili genlerin araştırıldığı bir çalışmada sıçanların MWM'deki navigasyon örüntüleri incelendiğinde, yaşlı-üstün öğrenici olan grubun allosentrik ve egosentrik stratejileri beraber kullandığı, yaşlı-bozulmuş öğrenmeye sahip olan grubun ise bu stratejileri kullanamadığı görülmüştür (Burger ve ark., 2007). Bu bulgu, MWM testinde katedilen mesafe parametresinin değerlendirilirken öğrenme stratejilerinin önemli rol oynayabileceğini göstermektedir. Ancak bizim çalışmamızda grupların öğrenme stratejileri ayrıca incelenmemiştir.

Öğrenme ve hafıza değerlendirilmesi amacıyla yapılan diğer bir test ise NOR testidir. NOR'de KÖHS uygulanan gruplar ile uygulanmayan gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır. Daha önce yapılan bir çalışmada da genç sıçanlarda barınma ve stres etkilerinin NOR testindeki parametrelerde anlamlı farklılıklara sebep olmadığı bulunmuştur (Castelhano-Carlos ve ark., 2014). Sonuçlarımızda ÇZ'nin de sıçanların NOR testindeki öğrenme ve hafıza parametereleri üzerine etkisi olmadığı saptanmıştır. Literatürde 22 aylık sıçanlarda 3 aylık ÇZ uygulamasının bilişsel işlev üzerine olumlu etkileri gösterilmiştir (Kobayashi ve ark., 2002). Diğer bir çalışmada, 22 aylık Fischer 344 soy sıçanlarda 1 aylık ÇZ uygulamasının öğrenme ve hafıza parametrelerini olumlu yönde etkilediği rapor edilmiştir (Cortese ve ark., 2018). Ancak Fischer 344 soyu ÇZ çalışmalarında sık kullanılan soylardan değildir. Bu farklılık davranış deneylerinin sonuçlarını etkileyebilir (McDermott ve Kelly, 2008; Simpson ve

Kelly, 2011). Yaşlı sıçanlarda ÇZ protokolüne geç dönemde başlanması (21 aylık) ve kısa dönem uygulanması (8 hafta) bilişsel olarak gerileyen sıçanlarda öğrenmeyi ve hafızayı olumlu yönde değiştirmek için yeterli olmayabilir. ÇZ'nin yaşlılık döneminde olumlu etkilerini görmek için daha uzun süre uygulanması gerekebilir. ÇZ'nin bilişsel olarak gerileyen sıçanlarda uzamsal belleği kurtarmada başarısız olduğunu gösteren çalışmalar da mevcuttur (Fuchs, Herbeaux, ve ark., 2016). Sonuçlarımızda stresin ve ÇZ'nin NOR testinde etkisinin görülmemesi, uygulanan stres etkenlerinin ve ÇZ uygulamalarının yapısı ve uygulandığı dönemle ilgili olabilir. Ayrıca yaşlı sıçanlardaki nesne tanıma eksikliklerinin, bu sıçanların yeni nesnelere eski nesne gibi davranmasıyla ilgili olduğu bildirilmiştir (Burke ve ark., 2010). Bu durum, NOR testi üzerine stres ve ÇZ'nin etkisinin olmamasıyla ilişkilendirilebilir.

Strese karşı otonomik, davranışsal ve endokrin tepkilerin etkinleştirilmesinde amigdala, hipotalamus, hipokampus ve prefrontal korteks önemli rol oynar (Lupien ve ark., 2009). Çalışmamızda bu beyin bölgelerinde stres yanıtının düzenlenmesinde rol oynayan GR, CRH ve CRHR1 gen ekspresyonları değerlendirilmiştir.

Çalışmamızda yaşlı sıçanlarda kronik stres, amigdaladaki GR gen ekspresyonunu azaltmıştır. Kronik stresin yaşlanmanın negatif etkilerini arttırabileceği bilinmektedir (Kerr ve ark., 1991; Simon ve ark., 2006). Bizim bulgumuzdan farklı olarak başka bir çalışmada, akut stres uygulamasının amigdalada GR artışına ve aynı zamanda davranış testlerinde de anksiyojenik etkiye neden olduğu bildirilmiştir (Novaes ve ark., 2017). Verilerimizle uyumlu olarak bir çalışmada akut stresin amigdalada GR gen ekspresyonunu azalttığı bildirilmiştir (Han ve ark., 2014). Stres ve kaygı arasındaki ilişkiyi inceleyen çalışmalarda amigdalanın önemi vurgulanmış olsa da (LeDoux, 2000; Rodrigues ve ark., 2009); literatürde amigdaladaki GR gen ekspresyon düzeyi değişimleri birbirleriyle tutarsızdır. Bu da tür, soy, yaş gibi deneğe özgü faktörler, uygulanan stres protokollerindeki farklılıklar ile MR ve GR oranındaki farklılıklar ile açıklanabilir (Han ve ark., 2014). Moleküler bulgulara ek olarak, stres gruplarının EPM testi ile değerlendirilen anksiyojenik davranışlarında istatistiksel olarak anlamlı farklar gözlenmemiştir. Bu davranışsal bulgu anksiyetenin belirteçlerinden biri olarak değerlendirilen GR düzeylerinde artış olmaması ile uyumludur.

Sonuçlarımıza göre, barınma faktörünün amigdaladaki GR gen ekspresyonu üzerinde anlamlı etkisi yoktur. Daha önce yapılan bir çalışmada da sonuçlarımızla benzer şekilde ÇZ'nin amigdalada GR gen ekspresyonunda etkisi olmadığı bildirilmiştir (Shilpa ve ark., 2017). Barınma etkisi araştırılan başka bir çalışmada ise ÇZ'nin farelerde amigdaladaki GR gen ekspresyonunu azalttığı rapor edilmiştir (Ragu Varman ve ark., 2012). Sonuç olarak, ÇZ uygulamasının GR gen ekspresyonunu etkilememesi daha önce yapılan çalışmalar ile uyumlu olmakla beraber, diğer çalışmalardan elde edilen farklı sonuçların sebebi hayvan türündeki ve ÇZ protokolündeki farklılıklar olabilir.

Çalışmamızda kronik stresin yaşlı sıçanlarda amigdalada CRH ve CRHR1 gen ekspresyonu üzerine anlamlı bir etkisi olmadığı gösterilmiştir. Hipotalamus dışında, amigdalada da CRH içeren nöronlar ve çok miktarda CRHR1 bulunur. HT PVN'den ve amigdaladan salgılanan CRH, HPA ekseninin ve strese karşı davranışsal tepkilerin birincil düzenleyicisi olarak tanımlanır (Bakshi ve Kalin, 2000). Daha önceki çalışmalarda amigdala merkezi nukleusunda CRH artışının stres kaynaklı kaygı ile ilişkili olabileceği rapor edilmiştir (Roozendaal ve ark., 2002; Regev ve ark., 2012). CRH'nin merkezi etkilerini daha iyi anlamak için yapılan bir çalışmada lentiviral yapılarla amigdalada CRH üretimi artırılmıştır. Bu durum, hayvanlarda hipotalamik PVN'de CRH mRNA seviyesini artırmış, glukokortikoid geri bildirimini azaltmıştır. Sonuçta amigdalanın stres yanıtında HPA geri bildirimi üzerine etkisi gösterilmiştir (Flandreau ve ark., 2012). Ek olarak anksiyete davranışı sergilendiği rapor edilmiştir (Flandreau ve ark., 2012; Keen-Rhinehart ve ark., 2009). Bazı çalışmalarda ise stresin ardından plazma kortikosteron ve PVN CRH mRNA seviyelerinde değişiklik olmamasına rağmen amigdala CRH sistemi aktive olmuştur. Stres yanıtında amigdaladaki CRH aktivasyonunun bağımsız olarak da gerçekleştiği gösterilmiştir (Liang ve ark., 1992; Makino ve ark., 1999). CRH ile birlikte CRHR1'in de anksiyete ile ilişkisi birçok çalışmada rapor edilmiştir. Bunların amigdalada uzun süreli aktivasyonunun kalıcı bir anksiyojenik etkiye neden olabileceği bildirilmiştir (Rainnie ve ark., 2004; Shekhar ve ark., 2005). Bu durum stresli uyaranlara daha fazla yanıt verme ile sonuçlanabilir (Adamec ve ark., 2010). Çalışmamızda stresin anksiyojenik etkisi hem davranış testlerinde hem de amigdaladaki gen ekspresyonlarında görülmedi. Çeşitli stres modellerinin amigdalanın CRH sistemi üzerinde etkileri gösterilmiştir (Hsu ve ark., 1998; Merlo

ve ark., 1995). Az sayıda literatür sonuçlarımızla uyumlu olarak stresin amigdaladaki CRH (Hendriksen ve ark., 2012) ve CRHR1 gen ekspresyonu üzerine etkisinin olmadığını bildirmiştir (Nappit ve Rivest, 1995; Pacak ve ark., 1996). Başka bir çalışmada ise akut stres uygulamasında CRHR1 gen ekspresyonu artarken tekrarlı stres uygulanan diğer grupta değişiklik olmadığı rapor edilmiştir (Hendriksen ve ark., 2012). Farklı stresörlerin fiziksel ve psikolojik bileşenleri amigdala CRH sistemi üzerinde farklı sonuçlar vermekte, etki mekanizmaları farklılık göstermektedir. Örneğin bazı fiziksel stresörler amigdala CRH mRNA seviyelerinin azalmasına yol açarken (Watts, 1996) psikolojik stresörlerin amigdala CRH mRNA miktarını arttırdığı bildirilmiştir (Makino ve ark., 1999). Stres protokolünün psikolojik ve fiziksel bileşenleri arasındaki denge amigdala CRH ve CRHR1 duyarlılığını belirleyebilir (Makino ve ark., 1999). Limbik stres yollarının daha yüksek dereceli duygusal işleme içeren stres faktörlerine duyarlı olduğu ancak basit fiziksel tehditlere karşı duyarsız olduğu hipotezi de bu sonuçları desteklemektedir. Çalışmamızda da amigdalada CRH ve CRHR1 gen ekspesyonu üzerine stresin etkisinin olmaması kullandığımız stres protokolünden kaynaklanabilir (Branchi ve ark., 2013). Stres protokolüne ek olarak literatürdeki bu farklılıkların nedeni açık olmamakla birlikte kullanılan hayvanın fizyolojik özellikleri ve prosedürel farklılıklar olabilir. CRH ve özellikle CRHR1 gen ekspresyonunun farklı deneysel koşullara göre değişimi hakkında detaylı çalışmalara ihtiyaç vardır (Bakshi ve Kalin, 2000).

Çalışmamızda çevresel zenginleştirme uygulaması amigdaladaki CRH gen ekspresyonunu arttırmış, CRHR1'de ise anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Başka bir çalışmada ÇZ, amigdaladaki CRH ve CRHR1 gen ekspresyonunu etkilememiştir (Hendriksen ve ark., 2012). Sonuçlarımızın aksine diğer çalışmalarda ÇZ, amigdalada stres kaynaklı CRH ve CRHR1 artışını engellemiştir (Hendriksen ve ark., 2012; Smail ve ark., 2020; Sztainberg ve ark., 2010). Ayrıca ÇZ'nin amigdalada CRH gen ekspresyonunu azalttığı, yetişkin farelerde de CRHR1 gen ekspresyonunu azaltarak anksiyolitik etki gösterdiği rapor edilmiştir (Ragu Varman ve ark., 2012; Sztainberg ve ark., 2010). Ancak farelerde yapılan bu çalışmada kullanılan hayvanlarda ÇZ maruziyetine laktasyon bitiminden hemen sonra başlanmıştır. Bizim çalışmamızda ise yaşlılık döneminde başlanması sonuçlardaki farklılığın sebebi olabilir. Literatürde ÇZ uygulamasına bağlı amigdalada CRH

mRNA artışına rastlanmamıştır. Ancak stres kaynaklı CRH artışı olabilir (Gray ve Bingaman, 1996). ÇZ uygulaması ve/veya davranış testleri de hafif stres etkisi yaratabilir. Çalışmamızda da bu uygulamaların akut stres yanıtındaki (Benaroya-Milshtein ve ark., 2004; Roy ve ark., 2001) gibi CRH mRNA artışına sebep olduğunu düşünmekteyiz. Ek olarak, psikolojik stres etkeni gibi çeşitli uygulamalara amigdala CRH sisteminin daha duyarlı olduğu, dolayısıyla amigdalada CRH artışının HT'den bağımsız olarak da gerçekleşebileceği bildirilmiştir (Makino ve ark., 1999). Bu da uygulanan ÇZ uygulamasının hafif stres etkeni olarak amigdalayı etkilemiş olabileceği görüşümüzü desteklemektedir. Sonuç olarak ÇZ uygulamasının amigdalada CRH gen ekspresyonunu azaltması (Ragu Varman ve ark., 2012) veya etkilememesi beklenirken (Hendriksen ve ark., 2012) çalışmamızda artış gözlenmiştir. Literatürde, amigdalaya kronik olarak CRH uygulamasının sıçanlarda bellek artışına neden olduğu bildirilmiştir (Liang ve Lee, 1988). Başka bir çalışma ise amigdalanın farklı bölümlerindeki CRH'nin stres kaynaklı davranışlarda olası farklı rolleri olduğunu göstermektedir (Regev ve ark., 2011). CRH artışının hafıza konsolidasyonunu iyileştirme etkisi göz önünde bulundurulursa (Roozendaal ve ark., 2002) ÇZ grubunda öğrenmenin daha erken tamamlanması ile amigdalada CRH gen ekspresyonu artışının ilişkisi olabilir.

Çalışmamızda yaşlı sıçanlarda kronik stresin hipotalamusta GR gen ekspresyonunu azalttığı, ÇZ'nin ise etkisinin olmadığı saptanmıştır. Bazı çalışmalarda kronik stresin hipotalamusta GR mRNA seviyesini değiştirmediği rapor edilse de (Mizoguchi ve ark., 2003; Sapolsky ve ark., 1984) verilerimizle uyumlu olarak stres ve KÖHS uygulamasının hipotalamusta GR gen ekspresyonunu azalttığı çalışmalar mevcuttur (Herman ve ark., 1995; Lu ve ark., 2015). GR ekspresyonundaki azalma, HPA ekseninin glukokortikoid geri bildirimindeki azalmayı gösterir (Herman ve ark., 1995). Fakat bizim çalışmamızda stres uygulaması sonucu kortikosteron seviyelerinde artış görülmediğinden, GR seviyesindeki azalmanın kortikosterondan kaynaklanmadığını düşünmekteyiz. Diğer yandan kronik kısıtlama stresi uygulanan bir çalışmada da 14. günün sonunda hipotalamusta GR seviyesi önemli ölçüde azalırken kortikosteron, kısıtlama stresi sonrası birinci saatte bazal seviyeye ulaşmıştır (Gądek-Michalska ve ark., 2013). GR seviyesi ile kortikosteron seviyesi değişimi zamana göre paralel değildir. Beyin bölgelerinde GR seviyesindeki değişikliklerin genellikle HPA ekseni, ACTH ve

kortikosteron yanıtları ile ilişkili olmayabileceği gösterilmiştir (Wei ve ark., 2004). Çalışmamızda da kronik stres sonrası glukokortikoid seviyesi artmasa da GR seviyesi azalmıştır. Hipotalamusta GR gen ekspresyonunun azalması uyguladığımız stresin etkili olduğunu göstermektedir.

Sonuçlarımıza göre ÇZ'nin HT'deki GR gen ekspresyonuna etkisinin olmadığı saptanmıştır. Benzer bir çalışmada da ÇZ'nin GR gen ekspresyonunu etkilemediği bildirilmiştir (Francis ve ark., 2002). Başka bir çalışmada da verilerimizle uyumlu olarak ÇZ uygulamasının hipotalamusta GR gen ekspresyonunu etkilemediği bildirilmiş olsa da aynı çalışmada ÇZ'nin, GR protein ekspresyonunu azalttığı bildirilmiştir. Fakat mRNA ve protein seviyeleri arasında farklılıklar olabileceği de bilinmektedir (Fan ve ark., 2021).

Çalışmamızda yaşlı sıçanlarda kronik stresin hipotalamusta CRH gen ekspresyonunu etkilemediği, CRHR1 gen ekspresyonunu ise azalttığı bulunmuştur. Ayrıca yaşlı sıçanlarda barınma faktörününün CRH ve CRHR1 gen ekspresyonu üzerinde anlamlı etkisi yoktur. Hipotalamus PVN'si beyindeki CRH'nin ana kaynağıdır ve stres yanıtının bütünleştirici merkezi olarak tanımlanır (Stratakis ve Chrousos, 1995). HT PVN'den ve amigdaladan salınan CRH, HPA ekseninin ve strese karşı davranışsal tepkilerin birincil düzenleyicisi olarak tanımlanır (Bakshi ve Kalin, 2000). Bulgularımızdan farklı olarak, kronik stresin hipotalamusta CRH ve CRHR1 gen ekspresyonunu arttırdığına dair sonuçlar çoğunluktadır (Eraslan ve ark., 2015; Herman ve ark., 1995; Imaki ve ark., 1996; Martí ve ark., 1999). Başka bir çalışmada ise akut kısıtlama stresi uygulanan farelerin PVN'sinde CRH mRNA düzeyi 2 saat sonra artmış, 4 saat sonra ise bazal seviyeye düşmüştür. Bu çalışmada verilerin zamanla değişimine ilişkin tutarsızlığa dikkat çekilmiştir (Greetfeld ve ark., 2009). Fare ve sıçanlar arasında yapılan bir stres karşılaştırma çalışmasında ise PVN'de CRHR1 mRNA ekspresyonu sıçanlarda artarken farelerde değişmemiştir. Bu literatür, rodent çalışmaları değerlendirilirken tür farklılıklarının önemini vurgulamıştır (Imaki ve ark., 2003). CRHR1 geni susturulmuş farelerde yapılan başka bir çalışmada, hafıza performansını etkilemek için CRH'nin CRHR1 ile etkileşiminin gerekli olduğu bildirilmiştir (Contarino ve ark., 1999). Sonuçlarımızda da HT CRHR1'in stres grubunda azalması ile MWM testinde stres uygulanan SK grubunda öğrenmenin son güne kadar uzaması bulguları tutarlıdır. Ancak stres uygulanan ve uygulanmayan gruplar arasındaki farklılığın literatürle uyumlu

olmaması, azalmanın stres ile ilgili olmayıp çalışma mekanizmasındaki bir farklılıktan kaynaklanmış olabileceğini düşündürmektedir.

Sonuçlarımızla uyumlu olarak ÇZ'nin hipotalamustaki CRH (Francis ve ark., 2002) ve CRHR1 (Fan ve ark., 2021) gen ekspresyonu üzerine etkisinin olmadığını bildiren çalışmalar bulunmaktadır. Ayrıca daha önce de belirtildiği gibi sonucumuz psikolojik bir stres etkenine yanıt olarak amigdala CRH sisteminin PVN CRH sisteminden çok daha hassas olduğunu bildiren çalışmayla uyumludur (Makino ve ark., 1999). Çünkü çalışmamızda ÇZ uygulaması, amigdala CRH gen ekspresyonunda artışa sebep olmasına karşın HT'de CRH gen ekspresyonunu değiştirmemiştir. Bu uyumsuz sonuçların nedeni açık olmamakla birlikte kullanılan sıçanların soyu, yaşı veya stres prosedürlerindeki farklılıklar olabilir (Bakshi ve Kalin, 2000).

Çalışmamızda yaşlı sıçanlara uygulanan kronik stresin ve barınmanın hipokampusta GR gen ekspresyonu üzerinde anlamlı etkisi gözlenmemiştir. Hipokampus, epizodik ve uzamsal belleğin yanı sıra duygudurum düzenlemesinde de önemli role sahiptir (McEwen ve ark., 2015). Hipokampus, stres kaynaklı glukokortikoid salgılanmasını sonlandırmakla sorumlu geri bildirim mekanizmasının önemli bir parçasıdır (Miller ve O'Callaghan, 2005). Streste glukokortikoid etkisine bağlı olarak hipokampusta glukokortikoid reseptörlerinin aşağı regülasyonunun oluştuğu bilinmektedir (Gómez ve ark., 1996; Sapolsky ve ark., 1984). Literatürde farklı stres uygulamalarının HC'de GR gen ekspresyonunu azalttığı bildirilmiştir (Kitraki ve ark., 1999; Park ve ark., 2015; Shilpa ve ark., 2017). Çalışmamızla uyumlu olarak stres uygulamasının HC'de GR gen ekspresyonunu değiştirmediği de rapor edilmiştir (Lam ve ark., 2019; Osacka ve ark., 2021; Palumbo ve ark., 2020). Bizim çalışmamızda uygulanan kronik stres, kortikosteron salgılanmasını arttırmadığı için hipokampusta GR mRNA seviyelerinde değişim olmaması beklenebilir.

Çalışmamızda ÇZ'nin hipokampusta GR mRNA üzerine etkisi olmamasını destekleyecek şekilde başka bir çalışmada da ÇZ'nin GR gen ekspresyonu üzerine etkisinin olmadığı bildirilmiştir (Francis ve ark., 2002). Çalışmamızın aksine bazı araştırmalar, ÇZ'nin hipokampusta GR gen ekspresyonunda artışa neden olduğunu rapor etmiştir (Mohammed ve ark., 1993; Olsson ve ark., 1994; Sampedro-Piquero ve ark., 2014). Böylece çevresel zenginleştirmenin, yaşlanan hipokampusu

glukokortikoid nörotoksisitesinden koruma potansiyeline sahip olabileceği bildirilmiştir (Mohammed ve ark., 1993). Uygulanan ÇZ'nin hipokampus GR mRNA üzerine etkisinin olmaması ÇZ'nin tipi, süresi ve uygulandığı dönemle ilgili olabilir (Fox ve ark., 2006; Simpson ve Kelly, 2011).

Çalışmamızda kronik stresin hipokampusta CRH ve CRHR1 gen ekspresyonu üzerine anlamlı etkisi saptanmamıştır. Benzer bir çalışmada da CRH ve CRHR1 gen ekspresyon miktarının kronik kısıtlama stresi gibi stresörlerden etkilenmediği rapor edilmiştir (Nappit ve Rivest, 1995). Kronik veya erken dönem stresin ardından, hipokampusdaki patolojik olarak yüksek CRH seviyeleri zararlı olabilir (Brunson ve ark., 2005; Ivy ve ark., 2010). Örneğin CRH'yi aşırı eksprese eden farelerde kronik stres ve aşırı uyarılmanın öğrenme davranışı için zararlı olduğu gösterilmiştir (Heinrichs ve ark., 1996). Hipokampusta CRHR1 gen ekspresyonunun KÖHS uygulamasıyla arttığı bildirilmiştir (Iredale ve ark., 1996). CRHR1 geninin stres protokollerindeki metodolojik farklılıklara göre değişimi hakkında sınırlı bilgi olması verilerin yorumlanmasını zorlaştırmaktadır (Bakshi ve Kalin, 2000). Stresin hipokampus üzerindeki etkileri değişken ve karmaşıktır, stresin süresi, yaş ve cinsiyetten etkilenir (McEwen ve ark., 2011). Çalışmamızda hipokampusta CRH ve CRHR1 mRNA seviyelerinde değişim olmaması, uygulanan stres protokolünden kaynaklanabilir.

Barınmanın hipokampusta CRH gen ekspresyonu üzerine anlamlı etkisi olduğu gözlenmiştir. Çalışmamızda çevresel zenginleştirme uygulaması yaşlı sıçanlarda hipokampustaki CRH gen ekspresyonunu azaltmıştır. Bir çalışmada ÇZ uygulamasının CRH gen ekspresyonuna etkisinin olmadığı bildirilmiştir (Kentner ve ark., 2018). Başka bir çalışmada ise ÇZ'nin anneden ayırma stresi uygulanan sıçanlarda CRH'nin epigenetik mekanizmalarla yukarı regülasyonunu önemli ölçüde azalttığı ve hafıza fonksiyonunu iyileştirdiği bildirilmiştir (A. Wang ve ark., 2014). Diğer bir çalışmada verilerimizle uyumlu olarak ÇZ'nin CRH mRNA miktarını azalttığı ve anksiyolitik etki gösterdiği rapor edilmiştir. Bu durumun nedenlerinin ortaya çıkarılması için daha çok çalışmaya ihtiyaç vardır (Yang ve ark., 2016). Çalışmamızda ÇZ kaynaklı HC'de meydana gelen CRH gen ekspresyonundaki azalmanın hipokampusa bağımlı davranışsal performansta görülen artışla ilişkili olduğu düşünülebilir. MWM'de öğrenme, ÇZ gruplarında 3.

günde tamamlanmıştır. ÇZ uygulanmayan gruplarda son güne kadar devam ettiği gözlenmiştir. Böylece çalışmamızda, sıçanlarda ÇZ'nin hem davranış testlerinde hem de hipokampal CRH gen ekspresyonunda olumlu etkisi olduğu saptanmıştır.

Barınma etkisinin hipokampusta CRHR1 gen ekspresyonu üzerine anlamlı etkisi görülmemiştir. Spesifik olarak CRHR1'in anksiyojenik etkisi bilinmektedir (Müller ve ark., 2003; X.-D. Wang ve ark., 2012). Literatürde erişkin sıçanlarda ÇZ uygulamasının HC'de CRHR1'i azaltarak anksiyolitik etki gösterdiği rapor edilmiştir (Kentner ve ark., 2018; Yang ve ark., 2016). CRHR1 gen ekspresyonunun farklı deneysel koşullara (stres modeli, ÇZ protokolü vb.) göre değişimi hakkında detaylı çalışmalara ihtiyaç olduğu bildirilmiştir (Bakshi ve Kalin, 2000).

Çalışmamızda yaşlı sıçanlara uygulanan kronik stres ve zenginleştirmenin prefrontal kortekste GR, CRH ve CRHR1 gen ekspresyonları üzerinde anlamlı etkisi saptanmamıştır. PFC, kronik stres ve depresyon patolojisinde önemli bir beyin bölgesidir. PFC amigdala, hipotalamus gibi duygusal davranışı ve stres tepkilerini yöneten beyin bölgeleri ile bağlantılıdır (Klein ve ark., 2010). HC ve amigdala ile olan bağlantıları sayesinde stres tepkisi başlatmada en üsttedir. Fizyolojik reaktivitenin en önemli limbik düzenleyicisidir (Ulrich-Lai ve Herman, 2009). Öngörülemeyen stresin olumsuz etkilerinin artan amigdala ve azalan PFC aktiviteleri ile dolaşımdaki yüksek kortikosteron seviyelerinin ortak etkisinden kaynaklandığı bildirilmiştir (Kim ve Kim, 2019). Literatürde, kronik stresin depresyon ve anksiyete benzeri davranışları indüklediği ve stres kaynaklı glukokortikoid seviyesindeki artışın PFC'de GR gen ekspresyonunu azalttığı rapor edilmiştir (Chiba ve ark., 2012; Mizoguchi ve ark., 2003). Ancak PFC'de stres kaynaklı GR artışının bildirildiği bir çalışmada ise GR artışı, PFC ve/veya hipokampustaki geri bildirim yeteneğinin zayıflaması ve HPA ekseninin bozulmasıyla ilişkilendirilmiştir (Tripathi ve ark., 2019). HPA ekseni aktivitesindeki bozukluğun PFC disfonksiyonu veya hipokampal atrofi kaynaklı olabileceği yorumu yapılmıştır (Mizoguchi ve ark., 2003). Yaşlı sıçanlarda da PFC'de azalmış GR gen ekspresyonu, yaşlanmanın davranışsal ve nöroendokrin değişikliklere katkı sağladığını göstermiştir. Kognitif bozukluğu olan yaşlı sıçanlarda PFC'de GR gen ekspresyonu azalmıştır (Bizon ve ark., 2001). Bu sonuçlar, yaşlı sıçanlarda deney başlangıcında kognitif değerlendirmenin önemini desteklemektedir (Balietti ve ark.,

2019). Ancak sonuçlarımızı destekleyen bir çalışmada hem stres hem de ÇZ'nin PFC'de GR gen ekspresyonunu etkilemediği bildirilmiştir (Shilpa ve ark., 2017). Başka bir çalışmada da ÇZ'nin PFC'de GR gen ekspresyonunu arttırdığı rapor edilmiştir (Garrido ve ark., 2013). ÇZ'nin gen ekspresyonu üzerindeki farklı sonuçları ÇZ süresi ve uygulama farklılıklarından kaynaklanabilir. Kronik stres uygulamasının PFC'de GR gen ekspresyonunda etkisinin olmaması ise, uygulanan stres protokolünün yapısından ve plazma kortikosteron salgılanmasını arttırmamasından kaynaklanabilir. Verilerimizde olduğu gibi bir çalışmada da kronik stres prefrontal kortekste CRH gen ekspresyon seviyesini etkilememiştir (Chen ve ark., 2008). Başka bir çalışmada akut stresin, PFC'deki PKA sinyal yolunu aktive ederek, CRHR1 eksprese eden nöronlarda siklik AMP aktivasyonuna yol açtığı; böylece CRHR1 artışına neden olduğu bildirilmiştir (Uribe-Mariño ve ark., 2016). Diğer bir çalışmada ise kronik stres uygulanan dişi farelerde prefrontal kortekste CRH gen ekspresyonu artarken erkek farelerde anlamlı bir etki gözlenmemiştir (Karisetty ve ark., 2017) ve bu çalışma, PFC'nin kronik strese karşı cinsiyete özgü yanıtını göstermektedir. Dişilerin kronik stresin zararlı etkilerine karşı daha savunmasız olduğu belirtilmiştir (Karisetty ve ark., 2017). Çalışmamızda da erkek sıçanların PFC'sinde CRH ve CRHR1 seviyelerinde anlamlı bir fark gözlenmemesi kronik stresin zararlı etkilerine dayanıklılık olarak yorumlanabilir. Çalışmamızda ÇZ, PFC'de CRH ve CRHR1 gen ekspresyonunu etkilememiştir. Bir çalışmada ÇZ, prefrontal kortekste CRH gen ekspresyonunu arttırırken CRHR1 gen ekspresyonunu azaltmıştır. Zenginleştirilmiş çevredeki farelerde artan PFC CRH ve azalan CRHR1 mRNA ekspresyonu, zenginleştirme koşullarının hayvanlar için stresli olabileceği olasılığı ile açıklanmıştır (McQuaid ve ark., 2013). Literatür ile sonuçlarımız arasındaki farklılık, ÇZ'nin uygulama süresi, yapısı ve uygulama dönemiyle ilişkili olabilir (Simpson ve Kelly, 2011).

Özetle, çalışmamızda stres uygulanan grupta zamanla vücut ağırlıklarının azalması, EPM'de bu grupta lokomotor aktivite artışı olması uygulanan KÖHS'in etkili olduğunu göstermektedir. MWM'de ise ÇZ uygulamasının stres uygulanan grupta öğrenme üzerine olumlu etkisi olduğu bulunmuştur. Stresin ve çevresel zenginleştirmenin GR, CRH ve CRHR1 mRNA seviyeleri üzerindeki etkilerinin beyin bölgesine, stres tipi ve süresine, çevresel zenginleştirmenin yapısı ve uygulama dönemine spesifik olarak farklı şekillerde gerçekleştiği gözlenmiştir.

Sonuç olarak kronik stres ve çevresel zenginleştirmenin yaşlılarda nörobiyolojik ve kognitif fonksiyonları etkilediğini söyleyebiliriz. Bu etkilerin tam olarak nasıl gerçekleştiğini ve altında yatan mekanizmaları açıklayacak daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. Yaptığımız bu çalışmanın da yaşlanma ile ilgili nörobiyolojik ve nörodejeneratif araştırmalara katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

Abelaira, H. M., Réus, G. Z., Ribeiro, K. F., Steckert, A. V, Mina, F., Rosa, D. V. F., Santana, C. V, Romano-Silva, M. A., Dal-Pizzol, F., ve Quevedo, J. (2013). Effects of lamotrigine on behavior, oxidative parameters and signaling cascades in rats exposed to the chronic mild stress model. *Neuroscience Research*, *75*(4), 324–330. https://doi.org/10.1016/j.neures.2013.02.002

Adamec, R., Fougere, D., ve Risbrough, V. (2010). CRF receptor blockade prevents initiation and consolidation of stress effects on affect in the predator stress model of PTSD. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*, *13*(6), 747–757. https://doi.org/10.1017/S1461145709990496

Aguilera, G. (1998). Corticotropin releasing hormone, receptor regulation and the stress response. In *Trends in Endocrinology and Metabolism*. https://doi.org/10.1016/S1043-2760(98)00079-4

Aguilera, G. (2011). HPA axis responsiveness to stress: Implications for healthy aging. *Experimental Gerontology*, *46*(2–3), 90–95. https://doi.org/10.1016/j.exger.2010.08.023

Aleisa, A. M., Alzoubi, K. H., Gerges, N. Z., ve Alkadhi, K. A. (2006). Chronic psychosocial stress-induced impairment of hippocampal LTP: Possible role of BDNF. *Neurobiology of Disease*, *22*(3), 453–462. https://doi.org/10.1016/J.NBD.2005.12.005

Anon. (2017). T042-Technical Bulletin NanoDrop Spectrophotometers 260/280 and 260/230 Ratios. *T042-Technical Bulletin*, 1–2. www.nanodrop.com

Antunes, M., ve Biala, G. (2012). The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. *Cognitive processing, 13*(2), 93-110. https://doi.org/10.1007/s10339-011-0430-z

Arias, N., Méndez, M., ve Arias, J. L. (2015). The recognition of a novel-object in a novel context leads to hippocampal and parahippocampal c-Fos involvement. *Behavioural Brain Research*, *292*, 44–49. https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.06.012

Autelitano, D. J., Lundblad, J. R., Blum, M., ve Roberts, J. L. (1989). Hormonal regulation of POMC gene expression. *Annual Review of Physiology*, *51*, 715–726. https://doi.org/10.1146/annurev.ph.51.030189.003435

Bakos, J., Hlavacova, N., Rajman, M., Ondicova, K., Koros, C., Kitraki, E., Steinbusch, H. W. M., ve Jezova, D. (2009). Enriched environment influences hormonal status and hippocampal brain derived neurotrophic factor in a sex dependent manner. *Neuroscience 164*(2), 787-797. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.08.054

Bakshi, V. P., ve Kalin, N. H. (2000). Corticotropin-Releasing Hormone and Animal Models of Anxiety: Gene-Environment Interactions. In *Biol Psychiatry* (Vol. 48).

Bale, T. L. (2005). Sensitivity to stress: Dysregulation of CRF pathways and disease development. *Hormones and Behavior, 48*(1), 1-10. https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2005.01.009

Bale, T. L., ve Vale, W. W. (2004). CRF and CRF Receptors : Role in Stress Responsivity and Other Behaviors. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, *44,* 525. https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.44.101802.121410

Balietti, M., Pugliese, A., Fabbietti, P., di Rosa, M., ve Conti, F. (2019). Aged rats with different performances at environmental enrichment onset display different modulation of habituation and aversive memory. *Neurobiology of Learning and Memory*, *161*, 83–91. https://doi.org/10.1016/j.nlm.2019.04.001

Barker, G. R. I., ve Warburton, E. C. (2011). When is the hippocampus involved in recognition memory? *Journal of Neuroscience*, *31*(29), 10721–10731. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6413-10.2011

Bartlett, J. M. S., ve Stirling, D. (2003). A short history of the polymerase chain reaction. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *226*, 3–6. https://doi.org/10.1385/1-59259-384-4:3

Bassani, T. B., Bonato, J. M., Machado, M. M. F., Cóppola-Segovia, V., Moura, E. L. R., Zanata, S. M., Oliveira, R. M. M. W., ve Vital, M. A. B. F. (2017). Decrease in Adult Neurogenesis and Neuroinflammation Are Involved in Spatial Memory Impairment in the Streptozotocin-Induced Model of Sporadic Alzheimer's Disease in Rats. *Molecular Neurobiology*, 1–17. https://doi.org/10.1007/s12035-017-0645-9

Bayne, K., ve Würbel, H. (2014). The impact of environmental enrichment on the outcome variability and scientific validity of laboratory animal studies. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)*, *33*(1), 273–280. https://doi.org/10.20506/rst.33.1.2282

Becker, C., Hammerle-Fickinger, A., Riedmaier, I., ve Pfaffl, M. W. (2010). mRNA and microRNA quality control for RT-qPCR analysis. *Methods (San Diego, Calif.)*, *50*(4), 237–243. https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2010.01.010

Benaroya-Milshtein, N., Hollander, N., Apter, A., Kukulansky, T., Raz, N., Wilf, A., Yaniv, I., ve Pick, C. G. (2004). Environmental enrichment in mice decreases anxiety, attenuates stress responses and enhances natural killer cell activity. *The European Journal of Neuroscience*, *20*(5), 1341–1347. https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2004.03587.x

Benefiel, A. C., Dong, W. K., ve Greenough, W. T. (2022). Mandatory "Enriched" housing of laboratory animals: The need for evidence-based evaluation. *ILAR journal, 46*(2), 95-105. https://academic.oup.com/ilarjournal/article/46/2/95/911322

Bevins, R. A., ve Besheer, J. (2006). Object recognition in rats and mice: A one-trial non-matching-to-sample learning task to study "recognition memory." *Nature Protocols 1*(3), 1306-1311. https://doi.org/10.1038/nprot.2006.205

Bhagya, V. R., Srikumar, B. N., Veena, J., ve Shankaranarayana Rao, B. S. (2017). Short-term exposure to enriched environment rescues chronic stress-induced impaired hippocampal synaptic plasticity, anxiety, and memory deficits. *Journal of Neuroscience Research, 95*(8), 1602-1610. https://doi.org/10.1002/jnr.23992

Bingham, W. E., ve Griffiths, W. J. (1952). The effect of different environments during infancy on adult behavior in the rat. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, *45*(4), 307–312. https://doi.org/10.1037/h0062513

Birch, A. M., ve Kelly, Á. M. (2019). Lifelong environmental enrichment in the absence of exercise protects the brain from age-related cognitive decline. *Neuropharmacology,145, 59-74*. https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.03.042

Bizon, J. L., Helm, K. A., Han, J. S., Chun, H. J., Pucilowska, J., Lund, P. K., & Gallagher, M. (2001). Hypothalamic–pituitary–adrenal axis function and corticosterone receptor expression in behaviourally characterized young and aged Long–Evans rats. *European Journal of Neuroscience, 14*(10), 1739-1751. https://doi.org/10.1046/j.0953-816x.2001.01781.x

Bogdanova, O. v., Kanekar, S., D'Anci, K. E., ve Renshaw, P. F. (2013). Factors influencing behavior in the forced swim test. In *Physiology and Behavior, 118*, 227–239. Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2013.05.012

Bourin, M., Petit-Demoulière, B., Dhonnchadha, B. N., ve Hascöet, M. (2007). Animal models of anxiety in mice. *Fundamental ve Clinical Pharmacology*, *21*(6), 567–574. https://doi.org/10.1111/j.1472-8206.2007.00526.x

Bourke, C. H., ve Neigh, G. N. (2011). Behavioral effects of chronic adolescent stress are sustained and sexually dimorphic. *Hormones and Behavior*, *60*(1), 112–120. https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2011.03.011

Branchi, I., Santarelli, S., D'Andrea, I., ve Alleva, E. (2013). Not all stressors are equal: early social enrichment favors resilience to social but not physical stress in male mice. *Hormones and Behavior*, *63*(3), 503–509. https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2013.01.003

Brandeis, R., Brandys, Y., ve Yehuda, S. (1989). The use of the Morris Water Maze in the study of memory and learning. *The International Journal of Neuroscience*, *48*(1–2), 29–69. https://doi.org/10.3109/00207458909002151

Breault, D. T., ve Majzoub, J. A. (2003). Corticotropin-Releasing Hormone (CRH). In *Encyclopedia of Hormones*, pp. 297–305. Academic Press.

Brenes Sáenz, J. C., Villagra, O. R., ve Fornaguera Trías, J. (2006). Factor analysis of Forced Swimming test, Sucrose Preference test and Open Field test on enriched, social and isolated reared rats. *Behavioural Brain Research*, *169*(1), 57–65. https://doi.org/10.1016/J.BBR.2005.12.001

Brunson, K. L., Kramár, E., Lin, B., Chen, Y., Colgin, L. L., Yanagihara, T. K., Lynch, G., ve Baram, T. Z. (2005). Mechanisms of Late-Onset Cognitive Decline after Early-Life Stress. *Journal of Neuroscience 25*(41), 9228-9338. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2281-05.2005

Buckingham, J. C. (2006). Glucocorticoids: exemplars of multi-tasking. *British Journal of Pharmacology*, *147*, 258–268. https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706456

Burger, C., Cecilia López, M., Feller, J. A., Baker, H. v., Muzyczka, N., ve Mandel, R. J. (2007). Changes in transcription within the CA1 field of the hippocampus are associated with age-related spatial learning impairments. *Neurobiology of Learning and Memory*, *87*(1), 21–41. https://doi.org/10.1016/j.nlm.2006.05.003

Burke, D. A., Magnuson, D. S. K., Nunn, C. D., Fentress, K. G., Wilson, M. L., Shum-Siu, A. H., Moore, M. C., Turner, L. E., King, W. W., ve Onifer, S. M. (2007). Use of environmentally enriched housing for rats with spinal cord injury: the need for

standardization. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS*, *46*(2), 34–41.

Burke, S. N., Wallace, J. L., Nematollahi, S., Uprety, A. R., ve Barnes, C. A. (2010). Pattern separation deficits may contribute to age-associated recognition impairments. *Behavioral Neuroscience*, *124*(5), 559–573. https://doi.org/10.1037/a0020893

Bustin, S. A., Beaulieu, J. F., Huggett, J., Jaggi, R., Kibenge, F. S. B., Olsvik, P. A., Penning, L. C., ve Toegel, S. (2010). MIQE précis: Practical implementation of minimum standard guidelines for fluorescence-based quantitative real-time PCR experiments. *BMC Molecular Biology*, *11*(1), 1-5. https://doi.org/10.1186/1471-2199-11-74

Cannon, W. B. (1914). The Emergency Function of the Adrenal Medulla in Pain and the Major Emotions. *American Journal of Physiology-Legacy Content, 33(*2), 356-372.

Cannon W.B. (1922). Bodily changes in pain, hunger, fear and rage; an account of recent researches into the function of emotional excitement. In *D. Appleton*.

Carroll, J. C., Iba, M., Bangasser, D. A., Valentino, R. J., James, M. J., Brunden, K. R., Lee, V. M. Y., ve Trojanowski, J. Q. (2011). Chronic stress exacerbates tau pathology, neurodegeneration, and cognitive performance through a corticotropin-releasing factor receptor-dependent mechanism in a transgenic mouse model of tauopathy. *Journal of Neuroscience*, *31*(40), 14436-14449. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3836-11.2011

Castelhano-Carlos, M., Costa, P. S., Russig, H., ve Sousa, N. (2014). PhenoWorld: a new paradigm to screen rodent behavior. *Translational Psychiatry*, *4*(6), e399. https://doi.org/10.1038/tp.2014.40

Chao, O. Y. H., Pum, M. E., ve Huston, J. P. (2013). The interaction between the dopaminergic forebrain projections and the medial prefrontal cortex is critical for memory of objects: Implications for Parkinson's disease. *Experimental Neurology*, *247*, 373–382. https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2013.01.003

Chen, J.-X., Tang, Y.-T., ve Yang, J.-X. (2008). Changes of glucocorticoid receptor and levels of CRF mRNA, POMC mRNA in brain of chronic immobilization stress rats. *Cellular and Molecular Neurobiology*, *28*(2), 237–244. https://doi.org/10.1007/s10571-007-9170-0

Chiba, S., Numakawa, T., Ninomiya, M., Richards, M. C., Wakabayashi, C., ve Kunugi, H. (2012). Chronic restraint stress causes anxiety- and depression-like behaviors, downregulates glucocorticoid receptor expression, and attenuates glutamate release induced by brain-derived neurotrophic factor in the prefrontal cortex. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, *39*(1), 112–119. https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2012.05.018

Chomczynski, P., ve Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, *162*(1), 156–159. https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90021-2

Chrousos, G. P. (1995). The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune-mediated inflammation. *The New England Journal of Medicine*, *332*(20), 1351–1362. https://doi.org/10.1056/NEJM199505183322008

Cizza, G., Calogero, A. E., Brady, L. S., Bagdy, G., Bergamini, E., Blackman, M. R., Chrousos, G. P., ve Gold, P. W. (1994). Male Fischer 344/N rats show a progressive central impairment of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis with advancing age. *Endocrinology*, *134*(4), 1611–1620. https://doi.org/10.1210/endo.134.4.8137722

Contarino, A., Dellu, F., Koob, G. F., Smith, G. W., Lee, K. F., Vale, W., ve Gold, L. H. (1999). Reduced anxiety-like and cognitive performance in mice lacking the corticotropin-releasing factor receptor 1. *Brain Research*, *835*(1), 1–9. https://doi.org/10.1016/S0006-8993(98)01158-5

Cortese, G. P., Olin, A., O'Riordan, K., Hullinger, R., ve Burger, C. (2018). Environmental enrichment improves hippocampal function in aged rats by enhancing learning and memory, LTP, and mGluR5-Homer1c activity. *Neurobiology of Aging*, *63*, 1–11. https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2017.11.004

Costa, R., Carvalho, M. S. M., Brandão, J. D. P., Moreira, R. P., Cunha, T. S., Casarini, D. E., ve Marcondes, F. K. (2021). Modulatory action of environmental enrichment on hormonal and behavioral responses induced by chronic stress in rats: Hypothalamic renin-angiotensin system components. *Behavioural Brain Research*, *397*, 112928. https://doi.org/10.1016/j.bbr.2020.112928

Crema, L. M., Pettenuzzo, L. F., Schlabitz, M., Diehl, L., Hoppe, J., Mestriner, R., Laureano, D., Salbego, C., Dalmaz, C., ve Vendite, D. (2013). The effect of unpredictable chronic mild stress on depressive-like behavior and on hippocampal

A1 and striatal A2A adenosine receptors. *Physiology and Behavior*, *109*(1), 1–7. https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2012.11.001

Cryan, J. F., Markou, A., ve Lucki, I. (2002). Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. *Trends in Pharmacological Sciences*, *23*(5), 238–245. https://doi.org/10.1016/s0165-6147(02)02017-5

Cui, M., Yang, Y., Yang, J., Zhang, J., Han, H., Ma, W., Li, H., Mao, R., Xu, L., Hao, W., ve Cao, J. (2006). Enriched environment experience overcomes the memory deficits and depressive-like behavior induced by early life stress. *Neuroscience Letters*, *404*(1–2), 208–212. https://doi.org/10.1016/j.neulet.2006.05.048

Dallman, M. F., Akana, S. F., Cascio, C. S., Darlington, D. N., Jacobson, L., ve Levin, N. (1987). Regulation of ACTH secretion: variations on a theme of B. *Recent Progress in Hormone Research*, *43*, 113–173. https://doi.org/10.1016/b978-0-12-571143-2.50010-1

Dantzer, R., ve Mormède, P. (1983). Stress in farm animals: a need for reevaluation. *Journal of Animal Science*, *57*(1), 6–18. https://doi.org/10.2527/jas1983.5716

de Kloet, E. R., Joëls, M., ve Holsboer, F. (2005). Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nature Reviews. Neuroscience*, *6*(6), 463–475. https://doi.org/10.1038/nrn1683

de Kloet, E. R., Meijer, O. C., de Nicola, A. F., de Rijk, R. H., ve Joëls, M. (2018). Importance of the brain corticosteroid receptor balance in metaplasticity, cognitive performance and neuro-inflammation. In *Frontiers in Neuroendocrinology*, 49, 124-145. https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2018.02.003

de Kloet, E. R., ve Molendijk, M. L. (2016). Coping with the Forced Swim Stressor: Towards Understanding an Adaptive Mechanism. *Neural Plasticity*, *2016*, 1–13. https://doi.org/10.1155/2016/6503162

de Kloet, E. R., Oitzl, M. S., ve Joëls, M. (1999). Stress and cognition: are corticosteroids good or bad guys? *Trends in Neurosciences*, *22*(10), 422–426. https://doi.org/10.1016/s0166-2236(99)01438-1

de Kloet, E. R., Vreugdenhil, E., Oitzl, M. S., ve Joëls, M. (1998). Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. In *Endocrine Reviews*, *19*(3), 269-301. https://doi.org/10.1210/er.19.3.269

De Spiegelaere, W., Dern-Wieloch, J., Weigel, R., Schumacher, V., Schorle, H., Nettersheim, D., Bergmann, M., Brehm, R., Kliesch, S., Vandekerckhove, L., ve

Fink, C. (2015). Reference gene validation for RT-qPCR, a note on different available software packages. *PloS One*, *10*(3), e0122515. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122515

Delidow, B. C., Lynch, J. P., Peluso, J. J., ve White, B. A. (2003). Polymerase Chain Reaction: Basic Protocols. *PCR Protocols*, *15*, 1–30. https://doi.org/10.1385/0-89603-244-2:1

Dhabhar, F. S., McEwen, B. S., ve Spencer, R. L. (1997). Adaptation to prolonged or repeated stress--comparison between rat strains showing intrinsic differences in reactivity to acute stress. *Neuroendocrinology*, *65*(5), 360–368. https://doi.org/10.1159/000127196

D'Hooge, R., ve de Deyn, P. P. (2001). Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Research Reviews*, *36*(1), 60–90. https://doi.org/10.1016/S0165-0173(01)00067-4

Dias-Ferreira, E., Sousa, J. C., Melo, I., Morgado, P., Mesquita, A. R., Cerqueira, J. J., Costa, R. M., ve Sousa, N. (2009). Chronic stress causes frontostriatal reorganization and affects decision-making. *Science, 19*(3), 269-301. https://doi.org/10.1126/science.1171203

Die, J. V, ve Román, B. (2012). RNA quality assessment: a view from plant qPCR studies. *Journal of Experimental Botany*, *63*(17), 6069–6077. https://doi.org/10.1093/jxb/ers276

Dong, H., Keegan, J. M., Hong, E., Gallardo, C., Montalvo-Ortiz, J., Wang, B., Rice, K. C., ve Csernansky, J. (2018). Corticotrophin releasing factor receptor 1 antagonists prevent chronic stress-induced behavioral changes and synapse loss in aged rats. *Psychoneuroendocrinology*, *90*, 92–101. https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2018.02.013

Eckert, K. A., ve Kunkel, T. A. (1991). DNA Polymerase Fidelity and the Polymerase Chain Reaction, *Genome Research, 1*(1), 17-24.

Ennaceur, A., ve Delacour, J. (1988). A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behavioural Brain Research*, *31*(1), 47–59. https://doi.org/10.1016/0166-4328(88)90157-x

Eraslan, E., Akyazi, İ., Ergül-Ekiz, E., ve Matur, E. (2015). Noise Stress-Induced Changes in mRNA Levels of Corticotropin-Releasing Hormone Family Molecules and Glucocorticoid Receptors in the Rat Brain. In *Folia Biologica 61*(2), 66.

Fan, Z., Chen, J., Li, L., Wang, H., Gong, X., Xu, H., Wu, L., ve Yan, C. (2021). Environmental enrichment modulates HPA axis reprogramming in adult male rats exposed to early adolescent stress. *Neuroscience Research*, *172*, 63–72. https://doi.org/10.1016/J.NEURES.2021.04.007

Flak, J. N., Jankord, R., Solomon, M. B., Krause, E. G., ve Herman, J. P. (2011). Opposing effects of chronic stress and weight restriction on cardiovascular, neuroendocrine and metabolic function. *Physiology ve Behavior*, *104*(2), 228–234. https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2011.03.002

Flandreau, E. I., Ressler, K. J., Owens, M. J., ve Nemeroff, C. B. (2012). Chronic overexpression of corticotropin-releasing factor from the central amygdala produces HPA axis hyperactivity and behavioral anxiety associated with gene-expression changes in the hippocampus and paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Psychoneuroendocrinology*, *37*(1), 27–38. https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2011.04.014

Fonseca-Rodrigues, D., Gonçalves, J., Laranjeira, I., Almeida, A., ve Pinto-Ribeiro, F. (2022). Sucrose intake and preference by Wistar Han rats are not influenced by sex or food/water deprivation. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *216*, 173387. https://doi.org/10.1016/J.PBB.2022.173387

Forbes, N. F., Stewart, C. A., Matthews, K., ve Reid, I. C. (1996). Chronic mild stress and sucrose consumption: Validity as a model of depression. *Physiology and Behavior*, *60*(6), 1481–1484. https://doi.org/10.1016/S0031-9384(96)00305-8

Forgays, D. G., ve Read, J. M. (1962). Crucial periods for free-environmental experience in the rat. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, *55*, 816–818. https://doi.org/10.1037/h0047092

Fox, C., Merali, Z., ve Harrison, C. (2006). Therapeutic and protective effect of environmental enrichment against psychogenic and neurogenic stress. In *Behavioural Brain Research,175*(1), 1-8. https://doi.org/10.1016/j.bbr.2006.08.016

Francis, D. D., Diorio, J., Plotsky, P. M., ve Meaney, M. J. (2002). Environmental enrichment reverses the effects of maternal separation on stress reactivity. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *22*(18), 7840–7843.

Fuchs, F., Cosquer, B., Penazzi, L., Mathis, C., Kelche, C., Majchrzak, M., ve Barbelivien, A. (2016). Exposure to an enriched environment up to middle age

allows preservation of spatial memory capabilities in old age. *Behavioural Brain Research*, *299*, 1–5. https://doi.org/10.1016/J.BBR.2015.11.019

Fuchs, F., Herbeaux, K., Aufrere, N., Kelche, C., Mathis, C., Barbelivien, A., ve Majchrzak, M. (2016). Late enrichment maintains accurate recent and remote spatial memory only in aged rats that were unimpaired when middle aged. *Learning & Memory, 23*(6), 303-312. https://doi.org/10.1101/lm.041236

Gądek-Michalska, A., Spyrka, J., Rachwalska, P., Tadeusz, J., ve Bugajski, J. (2013). Influence of chronic stress on brain corticosteroid receptors and HPA axis activity. *Pharmacological Reports, 65*(5), 1163–1175. https://doi.org/10.1016/s1734-1140(13)71474-9

Garrido, P., de Blas, M., Ronzoni, G., Cordero, I., Antón, M., Giné, E., Santos, A., del Arco, A., Segovia, G., ve Mora, F. (2013). Differential effects of environmental enrichment and isolation housing on the hormonal and neurochemical responses to stress in the prefrontal cortex of the adult rat: relationship to working and emotional memories. *Journal of Neural Transmission*, *120*(5), 829–843. https://doi.org/10.1007/s00702-012-0935-3

Gómez, F., Lahmame, A., de Kloet, E. R., ve Armario, A. (1996). Hypothalamic-pituitary-adrenal response to chronic stress in five inbred rat strains: differential responses are mainly located at the adrenocortical level. *Neuroendocrinology*, *63*(4), 327–337. https://doi.org/10.1159/000126973

Gray, T. S., ve Bingaman, E. W. (1996). The amygdala: Corticotropin-releasing factor, steroids, and stress. In *Critical Reviews in Neurobiology*, *10*(2). https://doi.org/10.1615/CritRevNeurobiol.v10.i2.10

Greetfeld, M., Schmidt, M. v, Ganea, K., Sterlemann, V., Liebl, C., ve Müller, M. B. (2009). A single episode of restraint stress regulates central corticotrophin- releasing hormone receptor expression and binding in specific areas of the mouse brain. *Journal of Neuroendocrinology*, *21*(5), 473–480. https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2009.01865.x

Grønli, J., Murison, R., Fiske, E., Bjorvatn, B., Sørensen, E., Portas, C. M., ve Ursin, R. (2005). Effects of chronic mild stress on sexual behavior, locomotor activity and consumption of sucrose and saccharine solutions. *Physiology ve Behavior*, *84*(4), 571–577. https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2005.02.007

Gunnar, M., ve Quevedo, K. (2007). The neurobiology of stress and development. *Annual Review of Psychology*, *58*, 145–173. https://doi.org/10.1146/annurev.psych.58.110405.085605

Gupta, D., ve Morley, J. E. (2014). Hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis and aging. *Comprehensive Physiology*, *4*(4), 1495–1510. https://doi.org/10.1002/cphy.c130049

Guyton, A. C., ve Hall, J. E. (2013). *Tibbi fizyoloji.* (12nd ed.) (Ed. & Trans. Berrak Çağlayan Yeğen). Nobel Tıp Kitabevi.

Haidkind, R., Eller, M., Harro, M., Kask, A., Rinken, A., Oreland, L., ve Harro, J. (2003). E ffects of partial locus coeruleus denervation and chronic mild stress on behaviour and monoamine neurochemistry in the rat. In *European Neuropsychopharmacology, 13*. www.elsevier.com/locate/euroneuro

Han, F., Ding, J., ve Shi, Y. (2014). Expression of amygdala mineralocorticoid receptor and glucocorticoid receptor in the single-prolonged stress rats. *BMC Neuroscience*, *15*, 77. https://doi.org/10.1186/1471-2202-15-77

Harati, H., Majchrzak, M., Cosquer, B., Galani, R., Kelche, C., Cassel, J. C., ve Barbelivien, A. (2011). Attention and memory in aged rats: Impact of lifelong environmental enrichment. *Neurobiology of Aging*, *32*(4), 718–736. https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2009.03.012

Harris, R. B. S., Zhou, J., Youngblood, B. D., Smagin, G. N., Ryan, D. H., Harris, R. B. S., Zhou, J., Youngblood, B. D., Smagin, G. N., ve Ryan, D. H. (1998). Failure to Change Exploration or Saccharin Preference In Rats Exposed to Chronic Mild Stress. *Physiology and Behavior, 63*(1), 91-100.

Hayward, R. (2005). Historical keywords: Stress. *The Lancet*, *365*(9476), 2001. www.thelancet.com

Hendriksen, H., Bink, D. I., Daniels, E. G., Pandit, R., Piriou, C., Slieker, R., Westphal, K. G. C., Olivier, B., ve Oosting, R. S. (2012). Re-exposure and environmental enrichment reveal NPY-Y1 as a possible target for post-traumatic stress disorder. *Neuropharmacology*, *63*(4), 733–742. https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2012.05.028

Herman, J. P., Adams, D., ve Prewitt, C. (1995). Regulatory changes in neuroendocrine stress-integrative circuitry produced by a variable stress paradigm. *Neuroendocrinology*, *61*(2), 180–190. https://doi.org/10.1159/000126839

Herman, J. P., Larson, B. R., Speert, D. B., ve Seasholtz, A. F. (2001). Hypothalamo-pituitary-adrenocortical dysregulation in aging F344/Brown-Norway F1 hybrid rats. *Neurobiology of Aging*, *22*(2), 323–332. https://doi.org/10.1016/s0197-4580(00)00242-6

Herman, J. P., Mcklveen, J. M., Ghosal, S., Kopp, B., Wulsin, A., Makinson, R., Scheimann, J., ve Myers, B. (2016). Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical stress response. *Comprehensive Physiology, 6*(2), 603. https://doi.org/10.1002/cphy.c150015

Herman, J. P., Ostrander, M. M., Mueller, N. K., ve Figueiredo, H. (2005). Limbic system mechanisms of stress regulation: Hypothalamo-pituitary- adrenocortical axis. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, *29*(8), 1201–1213. https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2005.08.006

Herringa, R. J., Nanda, S. A., Hsu, D. T., Roseboom, P. H., ve Kalin, N. H. (2004). The effects of acute stress on the regulation of central and basolateral amygdala CRF-binding protein gene expression. *Molecular Brain Research*, *131*(1–2), 17–25. https://doi.org/10.1016/j.molbrainres.2004.08.005

Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., ve Watson, R. (1993). Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Bio/Technology (Nature Publishing Company)*, *11*(9), 1026–1030. https://doi.org/10.1038/nbt0993-1026

Holsboer, F. (2000). The corticosteroid receptor hypothesis of depression. *Neuropsychopharmacology : Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, *23*(5), 477–501. https://doi.org/10.1016/S0893-133X(00)00159-7

Hölscher, C. (1999). Stress impairs performance in spatial water maze learning tasks. *Behavioural Brain Research*, *100*(1–2), 225–235. https://doi.org/10.1016/s0166-4328(98)00134-x

Hsu, D. T., Chen, F. L., Takahashi, L. K., ve Kalin, N. H. (1998). Rapid stress-induced elevations in corticotropin-releasing hormone mRNA in rat central amygdala nucleus and hypothalamic paraventricular nucleus: An in situ hybridization analysis. *Brain Research*, *788*(1–2), 305–310. https://doi.org/10.1016/S0006-8993(98)00032-8

Hu, C., Luo, Y., Wang, H., Kuang, S., Liang, G., Yang, Y., Mai, S., ve Yang, J. (2017). Re-evaluation of the interrelationships among the behavioral tests in rats exposed to

chronic unpredictable mild stress. *PLoS ONE*, *12*(9). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185129

Hutchinson, K. M., McLaughlin, K. J., Wright, R. L., Bryce Ortiz, J., Anouti, D. P., Mika, A., Diamond, D. M., ve Conrad, C. D. (2012). Environmental enrichment protects against the effects of chronic stress on cognitive and morphological measures of hippocampal integrity. *Neurobiology of Learning and Memory*, *97*(2), 250–260. https://doi.org/10.1016/J.NLM.2012.01.003

Kim, E. J., ve Kim, J. J. (2019). Amygdala, Medial Prefrontal Cortex and Glucocorticoid Interactions Produce Stress-Like Effects on Memory. *Frontiers in Behavioral Neuroscience, 13,* 210. https://doi.org/10.3389/fnbeh.2019.00210

Imaki, T., Katsumata, H., Konishi, S.-I., Kasagi, Y., ve Minami, S. (2003). Corticotropin-releasing factor type-1 receptor mRNA is not induced in mouse hypothalamus by either stress or osmotic stimulation. *Journal of Neuroendocrinology*, *15*(10), 916–924. https://doi.org/10.1046/j.1365-2826.2003.01071.x

Imaki, T., Naruse, M., Harada, S., Chikada, N., Imaki, J., Onodera, H., Demura, H., ve Vale, W. (1996). Corticotropin-releasing factor up-regulates its own receptor mRNA in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Brain Research. Molecular Brain Research*, *38*(1), 166–170. https://doi.org/10.1016/0169-328x(96)00011-3

Iredale, P. A., Terwilliger, R., Widnell, K. L., Nestler, E. J., ve Duman, R. S. (1996). Differential regulation of corticotropin-releasing factor1 receptor expression by stress and agonist treatments in brain and cultured cells. *Molecular Pharmacology*, *50*(5), 1103–1110.

Issa, A. M., Rowe, W., Gauthier, S., ve Meaney, M. J. (1990). Hypothalamic-pituitary-adrenal activity in aged, cognitively impaired and cognitively unimpaired rats. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *10*(10), 3247–3254.

Ivy, A. S., Rex, C. S., Chen, Y., Dubé, C., Maras, P. M., Grigoriadis, D. E., Gall, C. M., Lynch, G., ve Baram, T. Z. (2010). Hippocampal Dysfunction and Cognitive Impairments Provoked by Chronic Early-Life Stress Involve Excessive Activation of CRH Receptors. *Journal of Neuroscience 30*(39), 13005-13015. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1784-10.2010

Jacobson, L., ve Sapolsky, R. (1991). The Role of the Hippocampus in Feedback Regulation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenocortical Axis. *Endocrine Rewievs 12*(2), 118–134.

Jeong, Y. H. (2006). Chronic stress accelerates learning and memory impairments and increases amyloid deposition in APPV717I-CT100 transgenic mice, an Alzheimer's disease model. *The FASEB Journal*, *20*(6), 729–731. https://doi.org/10.1096/fj.05-4265fje

Jirkof, P., Rudeck, J., ve Lewejohann, L. (2019). Assessing affective state in laboratory rodents to promote animal welfare-what is the progress in applied refinement research?. *Animals,* 9(12), 1026. https://doi.org/10.3390/ani9121026

Johansson, B. B., ve Ohlsson, A.-L. (1996). Environment, Social Interaction, and Physical Activity as Determinants of Functional Outcome after Cerebral Infarction in the Rat. *Experimental Neurology, 139*(2), 322-327.

Joyal, C. C., Black, D. N., ve Dassylva, B. (2007). Critical Factor for Successful Real-Time PCR. *Sexual Abuse: Journal of Research and Treatment*, *19*(2), 155–173.

Karisetty, B. C., Joshi, P. C., Kumar, A., ve Chakravarty, S. (2017). Sex differences in the effect of chronic mild stress on mouse prefrontal cortical BDNF levels: A role of major ovarian hormones. *Neuroscience*, *356*, 89–101. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.05.020

Katz, R. J. (1982). Animal model of depression: Pharmacological sensitivity of a hedonic deficit. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *16*(6), 965–968. https://doi.org/10.1016/0091-3057(82)90053-3

Keen-Rhinehart, E., Michopoulos, V., Toufexis, D. J., Martin, E. I., Nair, H., Ressler, K. J., Davis, M., Owens, M. J., Nemeroff, C. B., ve Wilson, M. E. (2009). Continuous expression of corticotropin-releasing factor in the central nucleus of the amygdala emulates the dysregulation of the stress and reproductive axes. *Mol Psychiatry*, *14*(1), 37–50. https://doi.org/10.1038/mp.2008.91

Kempermann, G. (2019). Environmental enrichment, new neurons and the neurobiology of individuality. In *Nature Reviews Neuroscience*, *20*(4), 235-245. https://doi.org/10.1038/s41583-019-0120-x

Kentner, A. C., Lima, E., Migliore, M. M., Shin, J., ve Scalia, S. (2018). Complex Environmental Rearing Enhances Social Salience and Affects Hippocampal Corticotropin Releasing Hormone Receptor Expression in a Sex-Specific Manner.

Neuroscience, *369*, 399–411. https://doi.org/10.1016/J.NEUROSCIENCE.2017.11.035

Kerr, D. S., Campbell, L. W., Applegate, M. D., Brodish, A., ve Landfield, P. W. (1991). Chronic stress-induced acceleration of electrophysiologic and morphometric biomarkers of hippocampal aging. *The Journal of Neuroscience:The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *11*(5), 1316–1324.

Kim, D. W. (2001). Real time quantitative PCR. *Experimental ve Molecular Medicine*, *33*(1), 101–109. https://doi.org/10.1016/b978-012372185-3/50024-9

Kim, J. J., ve Diamond, D. M. (2002). The stressed hippocampus, synaptic plasticity and lost memories. *Nature Reviews Neuroscience*, *3*(6), 453–462. https://doi.org/10.1038/nrn849

Kitchener, P., Di Blasi, F., Borrelli, E., ve Piazza, P. V. (2004). Differences between brain structures in nuclear translocation and DNA binding of the glucocorticoid receptor during stress and the circadian cycle. *The European Journal of Neuroscience*, *19*(7), 1837–1846. https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2004.03267.x

Kitraki, E., Karandrea, D., ve Kittas, C. (1999). Long-lasting effects of stress on glucocorticoid receptor gene expression in the rat brain. *Neuroendocrinology*, *69*(5), 331–338. https://doi.org/10.1159/000054435

Kobayashi, S., Ohashi, Y., ve Ando, S. (2002). Effects of enriched environments with different durations and starting times on learning capacity during aging in rats assessed by a refined procedure of the Hebb-Williams maze task. *Journal of Neuroscience Research*, *70*(3), 340–346. https://doi.org/10.1002/jnr.10442

Koh, S., Magid, R., Chung, H., Stine, C. D., ve Wilson, D. N. (2007). Depressive behavior and selective down-regulation of serotonin receptor expression after early-life seizures: reversal by environmental enrichment. *Epilepsy & Behavior, 10*(1), 26-31.

Konkle, A. T. M., Kentner, A. C., Baker, S. L., Stewart, A., ve Bielajew, C. (2010). Environmental-enrichment-related variations in behavioral, biochemical, and physiologic responses of Sprague-Dawley and Long Evans rats. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science:JAALAS*, *49*(4), 427–436.

Koob, G. F., ve Bloom, F. E. (1985). Corticotropin-releasing factor and behavior. *Federation Proceedings*, *44*(1 Pt 2), 259–263.

Koob, G. F., ve Heinrichs, S. C. (1999). A role for corticotropin releasing factor and urocortin in behavioral responses to stressors. *Brain Research*, *848*(1–2), 141–152. https://doi.org/10.1016/s0006-8993(99)01991-5

Kovács, K. J. (2013). CRH: The link between hormonal-, metabolic- and behavioral responses to stress. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, *54*, 25–33. https://doi.org/10.1016/J.JCHEMNEU.2013.05.003

Kumar, A., Rani, A., Tchigranova, O., Lee, W. H., ve Foster, T. C. (2012). Influence of late-life exposure to environmental enrichment or exercise on hippocampal function and CA1 senescent physiology. *Neurobiology of Aging*, *33*(4), 828.e1-828.e17. https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2011.06.023

Kumar, V., Bhat, Z. A., ve Kumar, D. (2013). Animal models of anxiety: A comprehensive review. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, *68*(2), 175–183. https://doi.org/10.1016/j.vascn.2013.05.003

Lam, V. Y. Y., Raineki, C., Ellis, L., Yu, W., ve Weinberg, J. (2019). *Interactive effects of prenatal alcohol exposure and chronic stress in adulthood on anxiety-like behavior and central stressrelated receptor mRNA expression: Sex- and time-dependent effects*. 8–19. https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2018.06.018.Interactive

Lambert, K., Hyer, M., Bardi, M., Rzucidlo, A., Scott, S., Terhune-cotter, B., Hazelgrove, A., Silva, I., ve Kinsley, C. (2016). Natural-enriched environments lead to enhanced environmental engagement and altered neurobiological resilience. *Neuroscience*. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.05.037

LeDoux, J. E. (2000). Emotion circuits in the brain. *Annual Review of Neuroscience*, *23*, 155–184. https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.23.1.155

Leggio, M. G., Mandolesi, L., Federico, F., Spirito, F., Ricci, B., Gelfo, F., ve Petrosini, L. (2005). Environmental enrichment promotes improved spatial abilities and enhanced dendritic growth in the rat. *Behavioural Brain Research*, *163*(1), 78–90. https://doi.org/10.1016/j.bbr.2005.04.009

Leistner, C., ve Menke, A. (2020). Hypothalamic–pituitary–adrenal axis and stress. *Handbook of Clinical Neurology*, *175*, 55–64. https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64123-6.00004-7

Leonard, B. E., ve Myint, A. (2009). The psychoneuroimmunology of depression. *Human Psychopharmacology*, *24*(3), 165–175. https://doi.org/10.1002/hup.1011

Levi L. (1971). Society, Stress and disease, Vol. 1, The psychosocial environment and psychosomatic disease. *London: Oxford University Press*.

Li, Y., Wang, K., Chen, L., Zhu, X., ve Zhou, J. (2016). Quantification of mRNA Levels Using Real-Time Polymerase Chain Reaction (PCR). *Methods in Molecular Biology, 1406*, 73–79. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3444-7_6

Li, Y., Zheng, X., Liang, J., ve Peng, Y. (2010). Coexistence of Anhedonia and anxiety-independent increased novelty-seeking behavior in the chronic mild stress model of depression. *Behavioural Processes*, *83*(3), 331–339. https://doi.org/10.1016/j.beproc.2010.01.020

Liang, K. C., Ft Melia, K., Campeau, S., Falls, W. A., D Miserendino, M. J., Davis, M., ve Waf, necticut. (1992). Lesions of the Central Nucleus of the Amygdala, but Not the Paraventricular Nucleus of the Hypothalamus, Block the Excitatory Effects of Corticotropin-releasing Factor on the Acoustic Startle Reflex. In *The Journal of Neuroscience*, *72*(6), 2313-2320.

Liang, K. C., ve Lee, E. H. (1988). Intra-amygdala injections of corticotropin releasing factor facilitate inhibitory avoidance learning and reduce exploratory behavior in rats. *Psychopharmacology*, *96*(2), 232–236. https://doi.org/10.1007/BF00177566

Lightman, S. L., Birnie, M. T., ve Conway-Campbell, B. L. (2020). Dynamics of ACTH and Cortisol Secretion and Implications for Disease. Endocrine Reviews, *41*(3), bnaa002. https://doi.org/10.1210/endrev/bnaa002

Lin, J., ve Redies, C. (2012). Histological evidence: housekeeping genes beta-actin and GAPDH are of limited value for normalization of gene expression. *Development Genes and Evolution*, *222*(6), 369–376. https://doi.org/10.1007/s00427-012-0420-x

Lissner, L. J., Wartchow, K. M., Toniazzo, A. P., Gonçalves, C. A., ve Rodrigues, L. (2021). Object recognition and Morris water maze to detect cognitive impairment from mild hippocampal damage in rats: A reflection based on the literature and experience. In *Pharmacology Biochemistry and Behavior,* 210. Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/j.pbb.2021.173273

Livak, K. J., ve Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-ΔΔCT method. *Methods*, *25*(4), 402–408. https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262

Lu, J., Wu, X. Y., Zhu, Q. bin, Li, J., Shi, L. G., Wu, J. L., Zhang, Q. J., Huang, M. L., ve Bao, A. M. (2015). Sex differences in the stress response in SD rats. *Behavioural Brain Research*, *284*, 231–237. https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.02.009

Luine, V., Martinez, C., Villegas, M., Magariños, A. M., ve McEwen, B. S. (1996). Restraint stress reversibly enhances spatial memory performance. *Physiology ve Behavior*, *59*(1), 27–32. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8848486

Lupien, S. J., McEwen, B. S., Gunnar, M. R., ve Heim, C. (2009). Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition. In *Nature Reviews Neuroscience*, *10*(6), 434-445. https://doi.org/10.1038/nrn2639

Mahati, K., Bhagya, V., Christofer, T., Sneha, A., ve Shankaranarayana Rao, B. S. (2016). Enriched environment ameliorates depression-induced cognitive deficits and restores abnormal hippocampal synaptic plasticity. *Neurobiology of Learning and Memory*, *134*, 379–391. https://doi.org/10.1016/J.NLM.2016.08.017

Mahoney, D. J., Carey, K., Fu, M. H., Snow, R., Cameron-Smith, D., Parise, G., ve Tarnopolsky, M. A. (2004). Real-time RT-PCR analysis of housekeeping genes in human skeletal muscle following acute exercise. *Physiological Genomics*, *18*, 226–231. https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00067.2004

Makino, S., Shibasaki, T., Yamauchi, N., Nishioka, T., Mimoto, T., Wakabayashi, I., Gold, P. W., ve Hashimoto, K. (1999). Psychological stress increased corticotropin-releasing hormone mRNA and content in the central nucleus of the amygdala but not in the hypothalamic paraventricular nucleus in the rat. *Brain Research*, *850*(1–2), 136–143. https://doi.org/10.1016/S0006-8993(99)02114-9

Martí, O., Harbuz, M. S., Andrés, R., Lightman, S. L., ve Armario, A. (1999). Activation of the hypothalamic-pituitary axis in adrenalectomised rats: potentiation by chronic stress. *Brain Research*, *821*(1), 1–7. https://doi.org/10.1016/s0006-8993(98)01212-8

Mason, J. W. (1975). A historical view of the stress field. *Journal of Human Stress*, *1*(1), 6-12. https://doi.org/10.1080/0097840X.1975.9940399

Mason JW. (1971). A re-evaluation of the concept of 'non-specificity' in stress theory. *Psychiatr Res*.

Matthews, K., Forbes, N., Reid, I. C., Forbes, N., ve Reid, I. C. (1995). Sucrose Consumption as an Hedonic Measure Following Chronic Unpredictable Mild Stress. In *Physiology ve Behavior*, 57(2), 241-248.

Matys, T., Pawlak, R., Matys, E., Pavlides, C., McEwen, B. S., ve Strickland, S. (2004). Tissue plasminogen activator promotes the effects of corticotropin-releasing factor on the amygdala and anxiety-like behavior. *Proceeding of the National Academy of Sciences,* 101(46), 16345-16350. www.pnas.orgcgidoi10.1073pnas.0407355101

McDermott, C., ve Kelly, J. P. (2008). Comparison of the behavioural pharmacology of the Lister-Hooded with 2 commonly utilised albino rat strains. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, *32*(8), 1816–1823. https://doi.org/10.1016/J.PNPBP.2008.08.004

McEwen, B. S. (2006). Protective and damaging effects of stress mediators: central role of the brain. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, *8*(4), 367–381. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17290796

McEwen, B. S., Gianaros, P. J., ve Milliken, M. (2011). Stress-and Allostasis-Induced Brain Plasticity. *Annual Review of Medicine, 62*, 431. https://doi.org/10.1146/annurev-med-052209-100430

McEwen, B. S., Gray, J. D., ve Nasca, C. (2015). 60 Years of Neuroendocrinology Redefining neuroendocrinology: stress, sex and cognitive and emotional regulation. *Journal of Endocrinology*, *226*, 67–83. https://doi.org/10.1530/JOE-15-0121

McEwen, B. S., Mirsky, A. E., ve Hatch, M. M. (2007). Physiology and Neurobiology of Stress and Adaptation: Central Role of the Brain. *Physiological Reviews, 87*(3), 873-904. https://doi.org/10.1152/physrev.00041.2006.-The

McQuaid, R. J., Audet, M. C., Jacobson-Pick, S., ve Anisman, H. (2013). Environmental enrichment influences brain cytokine variations elicited by social defeat in mice. *Psychoneuroendocrinology*, *38*(7), 987–996. https://doi.org/10.1016/J.PSYNEUEN.2012.10.003

Meaney, M. J., Aitken, D. H., Sharma, S., ve Viau, V. (1992). Basal ACTH, corticosterone and corticosterone-binding globulin levels over the diurnal cycle, and age-related changes in hippocampal type I and type II corticosteroid receptor binding capacity in young and aged, handled and nonhandled rats. *Neuroendocrinology*, *55*(2), 204–213. https://doi.org/10.1159/000126116

Meaney, M. J., Aitken, D. H., van Berkel, C., Bhatnagar, S., ve Sapolsky, R. M. (1988). Effect of neonatal handling on age-related impairments associated with the hippocampus. *Science, 239*(4841), 766–768. https://doi.org/10.1126/science.3340858

Meijer, O. C., Topic, B., Steenbergen, P. J., Jocham, G., Huston, J. P., ve Oitzl, M. S. (2005). Correlations between hypothalamus-pituitary-adrenal axis parameters depend on age and learning capacity. *Endocrinology*, *146*(3), 1372–1381. https://doi.org/10.1210/en.2004-0416

Miller, D. B., ve O'Callaghan, J. P. (2005). Aging, stress and the hippocampus. *Ageing Research Reviews*, *4*(2), 123–140. https://doi.org/10.1016/J.ARR.2005.03.002

Milner, L. C., ve Crabbe, J. C. (2008). Three murine anxiety models: Results from multiple inbred strain comparisons. *Genes, Brain and Behavior*, *7*(4), 496–505. https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2007.00385.x

Mineur, Y. S., Belzung, C., ve Crusio, W. E. (2006). c. *Behavioural Brain Research*, *175*(1), 43–50. https://doi.org/10.1016/j.bbr.2006.07.029

Mizoguchi, K., Ishige, A., Aburada, M., ve Tabira, T. (2003). Chronic stress attenuates glucocorticoid negative feedback: Involvement of the prefrontal cortex and hippocampus. *Neuroscience*, *119*(3), 887–897. https://doi.org/10.1016/S0306-4522(03)00105-2

Mohammed A, A. H., Henriksson, B. G., Soderstrom, S., Ebendal, T., Olsson, T., ve Seckl, J. R. (1993). Environmental influences on the central nervous system and their implications for the aging rat. *Behavioural Brain Research, 57*(2), 183-191.

Moncek, F., Duncko, R., Johansson, B. B., ve Jezova, D. (2004). Effect of Environmental Enrichment on Stress Related Systems in Rats. *Journal of Neuroendocrinology, 16*(5), 423-431.

Morris, R. (1984). Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*, *11*(1), 47-60. https://doi.org/10.1016/0165-0270(84)90007-4

Morris, R. (1981). Spatial localization does not require the presence of local cues. *Learning and Motivation*, *12*(2), 239–260. https://doi.org/10.1016/0023-9690(81)90020-5

Müller, M. B., Zimmermann, S., Sillaber, I., Hagemeyer, T. P., Deussing, J. M., Timpl, P., Kormann, M. S. D., Droste, S. K., Kühn, R., Reul, J. M. H. M., Holsboer, F., ve Wurst, W. (2003). Limbic corticotropin-releasing hormone receptor 1 mediates anxiety-related behavior and hormonal adaptation to stress. *Nature Neuroscience*, *6*(10), 1100–1107. https://doi.org/10.1038/nn1123

Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., ve Horn, G. (1986). Specific Enzymatic Amplification of DNA In Vitro: The Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantative Biology, 51*, 263-273.

Munck, A., Guyre, P. M., ve Holbrook, N. J. (1984). Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions. *Endocrine Reviews*, *5*(1), 25–44. https://doi.org/10.1210/edrv-5-1-25

Myers, B., McKlveen, J. M., ve Herman, J. P. (2012). Neural Regulation of the Stress Response: The Many Faces of Feedback. *Cellular and Molecular Neurobiology, 32*(5), 683-694. https://doi.org/10.1007/s10571-012-9801-y

Nappit, R. E., ve Rivest, S. (1995). Ovulatory Cycle Influences the Stimulatory Effect of Stress on the Expression of Corticotropin-Releasing Factor Receptor Messenger Ribonucleic Acid in the Paraventricular Nucleus of the Female Rat Hypothalamus. *Endocrinology, 136*(9), 4073-4083.

Natelson, B. H., Ottenweller, J. E., Cook, J. A., Pitman, D., McCarty, R., ve Tapp, W. N. (1988). Effect of stressor intensity on habituation of the adrenocortical stress response. *Physiology ve Behavior*, *43*(1), 41–46. https://doi.org/10.1016/0031-9384(88)90096-0

Nielsen, C. K., Arnt, J., ve Sánchez, C. (2000). Intracranial self-stimulation and sucrose intake differ as hedonic measures following chronic mild stress: interstrain and interindividual differences. In *Behavioural Brain Research*, 107. www.elsevier.com/locate/bbr

Nilsen, T. W. (2013). The fundamentals of RNA purification. *Cold Spring Harbor Protocols*, *2013*(7), 618–624. https://doi.org/10.1101/pdb.top075838

Nistiar, F., Racz, O., Lukacinova, A., Hubkova, B., Novakova, J., Lovasova, E., ve Sedlakova, E. (2012). Age dependency on some physiological and biochemical parameters of male Wistar rats in controlled environment. *Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, *47*(9), 1224–1233. https://doi.org/10.1080/10934529.2012.672071

Nolan, T., Hands, R. E., ve Bustin, S. A. (2006). Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nature Protocols*, *1*(3), 1559–1582. https://doi.org/10.1038/nprot.2006.236

Novaes, L. S., dos Santos, N. B., Batalhote, R. F. P., Malta, M. B., Camarini, R., Scavone, C., ve Munhoz, C. D. (2017). Environmental enrichment protects against stress-

induced anxiety: Role of glucocorticoid receptor, ERK, and CREB signaling in the basolateral amygdala. *Neuropharmacology*, *113*, 457–466. https://doi.org/10.1016/J.NEUROPHARM.2016.10.026

O'Leary, T. P., Gunn, R. K., ve Brown, R. E. (2013). What are we measuring when we test strain differences in anxiety in mice? *Behavior Genetics*, *43*(1), 34–50. https://doi.org/10.1007/s10519-012-9572-8

Olsson, T., Mohammed, A. H., Donaldson, L. F., Henriksson, B. G., ve Seckl, J. R. (1994). Glucocorticoid receptor and NGFI-A gene expression are induced in the hippocampus after environmental enrichment in adult rats. In *Molecular Brain Research*, *23*(4), 349-353.

Osacka, J., Koprdova, R., Tillinger, A., Pirnik, Z., ve Kiss, A. (2021). Haloperidol and aripiprazole impact on the BDNF and glucocorticoid receptor levels in the rat hippocampus and prefrontal cortex: Effect of the chronic mild stress. *Endocrine Regulations*, *55*(3), 153–162. https://doi.org/10.2478/enr-2021-0016

Pacak, K., Pacak, P., Miklo´, M., ve Palkovits, M. (2001). *Pediatric and Reproductive Endocrinology Branch (K.P.), National Institute of Child Health and Human Development and Clinical Neurocardiology Section*, *22*(4), 502-548. https://academic.oup.com/edrv/article/22/4/502/2424153

Pacak, K., ve Palkovits, M. (2001). Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders. *Endocrine Reviews*, *22*(4), 502–548. https://doi.org/10.1210/edrv.22.4.0436

Pacak, K., Palkovits, M., Makino, S., Kopin, I. J., ve Goldstein, D. S. (1996). Brainstem Hemisection Decreases Corticotropin-Releasing Hormone mRNA in the Paraventricular Nucleus but not in the Central Amygdaloid Nucleus. In *Journal of Neuroendocrinology, 8*(8), 543-551.

Palkovits, M., Brownstein, M. J., ve Vale, W. (1985). Distribution of corticotropin-releasing factor in rat brain. *Federation Proceedings*, *44*(1 Pt 2), 215–219.

Palumbo, M. C., Dominguez, S., ve Dong, H. (2020). Sex differences in hypothalamic–pituitary–adrenal axis regulation after chronic unpredictable stress. *Brain and Behavior*, *10*(4), 1–10. https://doi.org/10.1002/brb3.1586

Park, H. J., Lee, S., Jung, J. W., Kim, B. C., Ryu, J. H., ve Kim, D. H. (2015). Glucocorticoid- and long-term stress-induced aberrant synaptic plasticity are

mediated by activation of the glucocorticoid receptor. *Archives of Pharmacal Research*, *38*(6), 1204-1212. https://doi.org/10.1007/s12272-015-0548-0

Pellow, S., Chopin, P., File, S. E., ve Briley, M. (1985). Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*, *14*(3), 149–167. https://doi.org/10.1016/0165-0270(85)90031-7

Petit-Demouliere, B., Chenu, F., ve Bourin, M. (2005). Forced swimming test in mice: a review of antidepressant activity. *Psychopharmacology*, *177*(3), 245–255. https://doi.org/10.1007/s00213-004-2048-7

Pich, E. M., Lorang, M., Yeganeh, M., de Fonseca, F. R., Raber, J., Koob, G. F., ve Weiss, F. (1995). Increase of extracellular corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity levels in the amygdala of awake rats during restraint stress and ethanol withdrawal as measured by microdialysis. *Journal of Neuroscience*, *15*(8), 5439–5447. https://doi.org/10.1523/jneurosci.15-08-05439.1995

Porsolt, R. D., Anton, G., Blavet, N., ve Jalfre, M. (1978). Behavioural Despair in Rats: A New Model Sensitive to Antidepressant Treatments. In *European Journal of Pharmacology, 47*(4), 379-391.

Porsolt, R. D., le Pichon, M., ve Jalfre, M. (1977). Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature*, *266*(5604), 730–732. https://doi.org/10.1038/266730a0

Pucilowski, O., Overstreet, D. H., Rezvani, A. H., Janowsky, D. S., Overstreet, D. H., Rezvani, A. H., ve Janowsky, D. S. (1993). Chronic Mild Stress-Induced Anhedonia: Greater Effect in a Genetic Rat Model of Depression. In *Physiology ve Behavior*, *54*(6), 1215-1220.

Rabasa, C., Muñoz-Abellán, C., Daviu, N., Nadal, R., ve Armario, A. (2011). Repeated exposure to immobilization or two different footshock intensities reveals differential adaptation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Physiology ve Behavior*, *103*(2), 125–133. https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2011.02.022

Radulovic, J., Rü, A., Liepold, T., ve Spiess, J. (1999). Modulation of Learning and Anxiety by Corticotropin-Releasing Factor (CRF) and Stress: Differential Roles of CRF Receptors 1 and 2. *Journal of Neuroscience, 19*(12), 5016-5025.

Ragu Varman, D., Marimuthu, G., ve Emmanuvel Rajan, K. (2012). Environmental enrichment exerts anxiolytic effects in the Indian field mouse (Mus booduga).

Applied Animal Behaviour Science, *136*(2–4), 166–173. https://doi.org/10.1016/J.APPLANIM.2011.12.003

Rainnie, D. G., Bergeron, R., Sajdyk, T. J., Patil, M., Gehlert, D. R., ve Shekhar, A. (2004). Corticotrophin releasing factor-induced synaptic plasticity in the amygdala translates stress into emotional disorders. *The Journal of Neuroscience:The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *24*(14), 3471–3479. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5740-03.2004

Reger, M. L., Hovda, D. A., ve Giza, C. C. (2010). Ontogeny of Rat Recognition Memory Measured by the Novel Object Recognition Task. *Developmental Psyhocbiology 51*(8), 672-678. https://doi.org/10.1002/dev.20402

Regev, L., Neufeld-Cohen, A., Tsoory, M., Kuperman, Y., Getselter, D., Gil, S., ve Chen, A. (2011). Prolonged and site-specific over-expression of corticotropin-releasing factor reveals differential roles for extended amygdala nuclei in emotional regulation. *Molecular Psychiatry*, *16*(7), 714–728. https://doi.org/10.1038/mp.2010.64

Regev, L., Tsoory, M., Gil, S., ve Chen, A. (2012). Site-specific genetic manipulation of amygdala corticotropin-releasing factor reveals its imperative role in mediating behavioral response to challenge. *Biological Psychiatry*, *71*(4), 317–326. https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2011.05.036

Remus, J. L., Stewart, L. T., Camp, R. M., Novak, C. M., ve Johnson, J. D. (2015). Interaction of Metabolic Stress with Chronic Mild Stress in Altering Brain Cytokines and Sucrose Preference. *Behavioral Neuroscience, 129*(3), 321-330. https://doi.org/10.1037/bne0000056

Reul, J. M. H. M., ve de Kloet, E. R. (1985). Two receptor systems for corticosterone in rat brain: Microdistribution and differential occupation. *Endocrinology*, *117*(6), 2505-2511.https://doi.org/10.1210/endo-117-6-2505

Reul, J. M. H. M., ve Holsboer, F. (2002). Corticotropin-releasing factor receptors 1 and 2 in anxiety and depression. In *Current Opinion in Pharmacology*, *2*(1), 23-33. https://doi.org/10.1016/S1471-4892(01)00117-5

Rodrigues, S. M., LeDoux, J. E., ve Sapolsky, R. M. (2009). The influence of stress hormones on fear circuitry. In *Annual Review of Neuroscience*, *32*, 289–313. https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.051508.135620

Roozendaal, B., Brunson, K. L., Holloway, B. L., McGaugh, J. L., ve Baram, T. Z. (2002). Involvement of stress-released corticotropin-releasing hormone in the basolateral amygdala in regulating memory consolidation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *99*(21), 13908–13913. https://doi.org/10.1073/pnas.212504599

Rosenzweig, M. R., Krech, D., Bennett, E. L., ve Diamond, M. C. (1962). Effects of environmental complexity and training on brain chemistry and anatomy: a replication and extension. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, *55*, 429–437. https://doi.org/10.1037/h0041137

Rossi, C., Angelucci, A., Costantin, L., Braschi, C., Mazzantini, M., Babbini, F., Fabbri, M. E., Tessarollo, L., Maffei, L., Berardi, N., ve Caleo, M. (2006). Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is required for the enhancement of hippocampal neurogenesis following environmental enrichment. *European Journal of Neuroscience*, *24*(7), 1850–1856. https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.05059.x

Roy, V., Belzung, C., Delarue, C., ve Chapillon, P. (2001). Environmental enrichment in BALB/c mice: effects in classical tests of anxiety and exposure to a predatory odor. *Physiology ve Behavior*, *74*(3), 313–320. https://doi.org/10.1016/s0031-9384(01)00561-3

Russell, G. M., Kalafatakis, K., ve Lightman, S. L. (2015). The importance of biological oscillators for hypothalamic-pituitary-adrenal activity and tissue glucocorticoid response: coordinating stress and neurobehavioural adaptation. *Journal of Neuroendocrinology*, *27*(6), 378–388. https://doi.org/10.1111/jne.12247

Rygula, R., Abumaria, N., Flügge, G., Fuchs, E., Rüther, E., ve Havemann-Reinecke, U. (2005). Anhedonia and motivational deficits in rats: impact of chronic social stress. *Behavioural Brain Research*, *162*(1), 127–134. https://doi.org/10.1016/j.bbr.2005.03.009

Şahin, T. D., Karson, A., Balcı, F., Yazır, Y., Bayramgürler, D., ve Utkan, T. (2015). TNF-alpha inhibition prevents cognitive decline and maintains hippocampal BDNF levels in the unpredictable chronic mild stress rat model of depression. *Behavioural Brain Research*, *292*, 233–240. https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.05.062

Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., ve Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a

thermostable DNA polymerase. *Science, 239*(4839), 487–491. https://doi.org/10.1126/science.2448875

Sampedro-Piquero, P., Begega, A., ve Arias, J. L. (2014). Increase of glucocorticoid receptor expression after environmental enrichment: Relations to spatial memory, exploration and anxiety-related behaviors. *Physiology and Behavior*, *129*, 118–129. https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2014.02.048

Sampedro-Piquero, P., Castilla-Ortega, E., Zancada-Menendez, C., Santín, L. J., ve Begega, A. (2016). Environmental enrichment as a therapeutic avenue for anxiety in aged Wistar rats: Effect on cat odor exposition and GABAergic interneurons. *Neuroscience, 330, 17-25*. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.05.032

Sandi, C. (2004). Stress, cognitive impairment and cell adhesion molecules. *Nature Reviews. Neuroscience*, *5*(12), 917–930. https://doi.org/10.1038/nrn1555

Santagati, S., Garnier, M., Carlo, P., Violani, E., Picotti, G. B., ve Maggi, A. (1997). Quantitation of low abundance mRNAs in glial cells using different Ž. polymerase chain reaction PCR-based methods. *Brain Research Protocols*, *1*(3), 217-223.

Sapolsky, R. M. (1992). Do glucocorticoid concentrations rise with age in the rat? *Neurobiology of Aging*, *13*(1), 171–174. https://doi.org/10.1016/0197-4580(92)90025-s

Sapolsky, R. M. (1999). Glucocorticoids, stress, and their adverse neurological effects: relevance to aging. *Experimental Gerontology*, *34*(6), 721–732. https://doi.org/10.1016/S0531-5565(99)00047-9

Sapolsky, R. M., Krey, L. C., ve McEwen, B. S. (1984). *Stress Down-Regulates Corticosterone Receptors in a Site-Specific Manner in the Brain, 114*(1), 49-51.

Sapolsky, R. M., Krey, L. C., ve McEwen, B. S. (1986). The neuroendocrinology of stress and aging: The glucocorticoid cascade hypothesis. *Endocrine Reviews*, *7*(3), 284-301. https://doi.org/10.1210/edrv-7-3-284

Savarese, A., ve Lasek, A. W. (2018). Regulation of anxiety-like behavior and Crhr1 expression in the basolateral amygdala by LMO3. *Psychoneuroendocrinology*, *92*, 13–20. https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2018.03.016

Selye, H. (1936). A syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature*, *138(3479), 32-32*.

Selye, H. (1946). Clinical and the diseases of adaptation. *1*(6).

Selye, H. (1974). *Stress without distress*. Philadelphia.

Selye, H. (1975). Confusion and controversy in the stress field. *Journal of Human Stress*, *1*(2), 37-44. https://doi.org/10.1080/0097840X.1975.9940406

Selye H. (1976). *Stress in health and disease*. Butterworth's, Inc.

Shekhar, A., Truitt, W., Rainnie, D., ve Sajdyk, T. (2005). Role of stress, corticotrophin releasing factor (CRF) and amygdala plasticity in chronic anxiety. *Stress, 8*(4), 209-219. https://doi.org/10.1080/10253890500504557

Shen, J., Li, Y., Qu, C., Xu, L., Sun, H., ve Zhang, J. (2019). The enriched environment ameliorates chronic unpredictable mild stress-induced depressive-like behaviors and cognitive impairment by activating the SIRT1/miR-134 signaling pathway in hippocampus. *Journal of Affective Disorders*, *248*, 81–90. https://doi.org/10.1016/j.jad.2019.01.031

Shilpa, B. M., Bhagya, V., Harish, G., Srinivas Bharath, M. M., ve Shankaranarayana Rao, B. S. (2017). Environmental enrichment ameliorates chronic immobilisation stress-induced spatial learning deficits and restores the expression of BDNF, VEGF, GFAP and glucocorticoid receptors. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, *76*, 88-100. https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2017.02.025

Shoji, H., ve Mizoguchi, K. (2010). Acute and repeated stress differentially regulates behavioral, endocrine, neural parameters relevant to emotional and stress response in young and aged rats. *Behavioural Brain Research*, *211*(2), 169-177. https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.03.025

Sikand, K., Singh, J., Ebron, J. S., ve Shukla, G. C. (2012). Housekeeping gene selection advisory: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and β-actin are targets of miR-644a. *PloS One*, *7*(10), e47510. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047510

Simon, N. M., Smoller, J. W., McNamara, K. L., Maser, R. S., Zalta, A. K., Pollack, M. H., Nierenberg, A. A., Fava, M., ve Wong, K.-K. (2006). Telomere shortening and mood disorders: preliminary support for a chronic stress model of accelerated aging. *Biological Psychiatry*, *60*(5), 432–435. https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2006.02.004

Simons, S. S. (2008). What goes on behind closed doors: physiological versus pharmacological steroid hormone actions. *BioEssays : News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, *30*(8), 744–756. https://doi.org/10.1002/bies.20792

Simpson, J., Bree, D., ve Kelly, J. P. (2012). Effect of early life housing manipulation on baseline and drug-induced behavioural responses on neurochemistry in the male rat. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, *37*(2), 252–263. https://doi.org/10.1016/J.PNPBP.2012.02.008

Simpson, J., ve Kelly, J. P. (2011). The impact of environmental enrichment in laboratory rats-Behavioural and neurochemical aspects. In *Behavioural Brain Research*, 222 (1), 246-264. https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.04.002

Smail, M. A., Smith, B. L., Nawreen, N., ve Herman, J. P. (2020). Differential impact of stress and environmental enrichment on corticolimbic circuits. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, *197*, 172993. https://doi.org/10.1016/j.pbb.2020.172993

Spasojevic, N., Jovanovic, P., ve Dronjak, S. (2016). Original Article Anxiety and Hyperlocomotion Induced by Chronic Unpredictable Mild Stress Can Be Moderated with Melatonin Treatment (anxiety / CUMS / dopamine / hippocampus / locomotion / melatonin). In *Folia Biologica,* 62(6), 250.

Speisman, R. B., Kumar, A., Rani, A., Pastoriza, J. M., Severance, J. E., Foster, T. C., ve Ormerod, B. K. (2013). Environmental enrichment restores neurogenesis and rapid acquisition in aged rats. *Neurobiology of Aging*, *34*(1), 263–274. https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2012.05.023

Stein, L. R., O'dell, K. A., Funatsu, M., Zorumski, C. F., ve Izumi, Y. (2016). Short-term environmental enrichment enhances synaptic plasticity in hippocampal slices from aged rats HHS Public Access. *Neuroscience*, *329*, 294–305. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.05.020

Stephens, P. M., ve Henry, J. P. (1977). *Stress, Health, and the Social Environment : A Sociobiologic Approach to Medicine*. Springer.

Stratakis, C. A., ve Chrousos, G. P. (1995). Neuroendocrinology and pathophysiology of the stress system. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *771*, 1–18. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1995.tb44666.x

Sullivan-Gunn, M., Hinch, E., Vaughan, V., ve Lewandowski, P. (2011). Choosing a stable housekeeping gene and protein is essential in generating valid gene and protein expression results. *British Journal of Cancer*, *104*(6), 1055. https://doi.org/10.1038/bjc.2011.35

Swanson, L. W., ve Sawchenko, P. E. (1983). Hypothalamic integration: organization of the paraventricular and supraoptic nuclei. *Annual Review of Neuroscience*, *6*, 269–324. https://doi.org/10.1146/annurev.ne.06.030183.001413

Szabo, S., Tache, Y., ve Somogyi, A. (2012). The legacy of Hans Selye and the origins of stress research: A retrospective 75 years after his landmark brief "letter" to the Editor of Nature. *Stress*, *15*(5), 472–478. https://doi.org/10.3109/10253890.2012.710919

Sztainberg, Y., Kuperman, Y., Tsoory, M., Lebow, M., ve Chen, A. (2010). The anxiolytic effect of environmental enrichment is mediated via amygdalar CRF receptor type 1. *Molecular Psychiatry*, *15*(9), 905-917. https://doi.org/10.1038/mp.2009.151

Tafet, G. E., ve Nemeroff, C. B. (2016). The Links Between Stress and Depression: Psychoneuroendocrinological, Genetic, and Environmental Interactions. *Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neuroscience*, *28*(2), 77–88. https://doi.org/10.1176/appi.neuropsych.15030053

Tan, S. C., ve Yiap, B. C. (2009). DNA, RNA, and protein extraction: the past and the present. *Journal of Biomedicine ve Biotechnology*, *2009*, 574398. https://doi.org/10.1155/2009/574398

Taylor, S., Wakem, M., Dijkman, G., Alsarraj, M., ve Nguyen, M. (2010). A practical approach to RT-qPCR-Publishing data that conform to the MIQE guidelines. *Methods, 50*(4), S1-5. https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2010.01.005

Thermo Scientific, D. (2012). NanoDrop Lite: Interpretation of Nucleic Acid 260/280 Ratios. *Protocols and Product Manuals*, *T123*, 1.

Tripathi, S. J., Chakraborty, S., Srikumar, B. N., Raju, T. R., ve Shankaranarayana Rao, B. S. (2017). Inactivation of basolateral amygdala prevents chronic immobilization stress-induced memory impairment and associated changes in corticosterone levels. *Neurobiology of Learning and Memory*, *142*, 218–229. https://doi.org/10.1016/j.nlm.2017.05.005

Tripathi, S. J., Chakraborty, S., Srikumar, B. N., Raju, T. R., ve Shankaranarayana Rao, B. S. (2019). Prevention of chronic immobilization stress-induced enhanced expression of glucocorticoid receptors in the prefrontal cortex by inactivation of basolateral amygdala. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, *95*, 134–145. https://doi.org/10.1016/J.JCHEMNEU.2017.12.006

Tsai, P.-P., Pachowsky, U., Stelzer, H. D., ve Hackbarth, H. (2002). Impact of environmental enrichment in mice. 1: Effect of housing conditions on body weight, organ weights and haematology in different strains. *Labatory Animals, 36*(4), 411-419.

Turner, R. C., Seminerio, M. J., Naser, Z. J., Ford, J. N., Martin, S. J., Matsumoto, R. R., Rosen, C. L., ve Huber, J. D. (2012). Effects of aging on behavioral assessment performance: implications for clinically relevant models of neurological disease. *Journal of Neurosurgery*, *117*(3), 629–637. https://doi.org/10.3171/2012.5.JNS112224

Ulrich-Lai, Y. M., ve Herman, J. P. (2009). Neural Regulation of Endocrine and Autonomic Stress Responses. *Nature Reviews Neurosciences, 10*(6), 397-409. https://doi.org/10.1038/nrn2647

Uribe-Mariño, A., Gassen, N. C., Wiesbeck, M. F., Balsevich, G., Santarelli, S., Solfrank, B., Dournes, C., Fries, G. R., Masana, M., Labermeier, C., Wang, X.-D., Hafner, K., Schmid, B., Rein, T., Chen, A., Deussing, J. M., ve Schmidt, M. v. (2016). Prefrontal Cortex Corticotropin-Releasing Factor Receptor 1 Conveys Acute Stress-Induced Executive Dysfunction. *Biological Psychiatry*, *80*(10), 743–753. https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2016.03.2106

Vale, W., Spiess, J., Rivier, C., ve Rivier, J. (1981). Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin. *Science*, *213*(4514), 1394–1397. https://doi.org/10.1126/science.6267699

van Praag, H., Kempermann, G., ve Gage, F. H. (2000). Neural consequences of enviromental enrichment. *Nature Reviews Neuroscience*, *1*(3), 191–198. https://doi.org/10.1038/35044558

Walf, A. A., ve Frye, C. A. (2007). The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nature Protocols*, *2*(2), 322-328. https://doi.org/10.1038/nprot.2007.44

Wang, A., Nie, W., Li, H., Hou, Y., Yu, Z., Fan, Q., ve Sun, R. (2014). Epigenetic upregulation of corticotrophin-releasing hormone mediates postnatal maternal separation-induced memory deficiency. *PloS One*, *9*(4), e94394. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094394

Wang, X.-D., Labermaier, C., Holsboer, F., Wurst, W., Deussing, J. M., Müller, M. B., ve Schmidt, M. v. (2012). Early-life stress-induced anxiety-related behavior in adult

mice partially requires forebrain corticotropin-releasing hormone receptor 1. *The European Journal of Neuroscience*, *36*(3), 2360–2367. https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2012.08148.x

Watts, A. G. (1996). The Impact of Physiological Stimuli on the Expression of Corticotropin-Releasing Hormone (CRH) and Other Neuropeptide Genes 1. *Neuroendocrinology, 17*(3), 281-326.

Wei, Q., Lu, X.-Y., Liu, L., Schafer, G., Shieh, K.-R., Burke, S., Robinson, T. E., Watson, S. J., Seasholtz, A. F., ve Akil, H. (2004). Glucocorticoid receptor overexpression in forebrain: a mouse model of increased emotional lability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(32), 11851–11856. https://doi.org/10.1073/pnas.0402208101

Westenbroek, C., Snijders, T. A. B., den Boer, J. A., Gerrits, M., Fokkema, D. S., ve ter Horst, G. J. (2005). Pair-housing of male and female rats during chronic stress exposure results in gender-specific behavioral responses. *Hormones and Behavior*, *47*(5), 620–628. https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2005.01.004

Whishaw, I. Q., ve Kolb, B. (2019). Analysis of behavior in laboratory rats. *The Laboratory Rat,* 215–242. Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814338-4.00008-8

Willner, P. (1997). Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation. *Psychopharmacology*, *134*(4), 319–329. https://doi.org/10.1007/s002130050456

Willner, P. (2005). Chronic mild stress (CMS) revisited: Consistency and behavioural-neurobiological concordance in the effects of CMS. *Neuropsychobiology*, *52*(2), 90–110. https://doi.org/10.1159/000087097

Willner, P. (2017). Reliability of the chronic mild stress model of depression: A user survey. *Neurobiology of Stress*, *6*, 68–77. https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2016.08.001

Willner, P., Moreau, J., Kurre Nielsen, C., Papp, M., Sluzewska, A., Moreau, J., Nielsen, C. K., Papp, M., ve Sluzewska, A. (1996). Decreased Hedonic Responsiveness Following Chronic Mild Stress Is Not Secondary to Loss of Body Weight. In *Physiology ve Behavior*, 60(1).

Willner, P., Muscat, R., ve Papp, M. (1992). Chronic mild stress-induced anhedonia: A realistic animal model of depression. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *16*(4), 525–534. https://doi.org/10.1016/S0149-7634(05)80194-0

Willner, P., Towell, A., Sampson, D., Sophokleous, S., ve Muscat, R. (1987). Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant. *Psychopharmacology*, *93*(3), 358–364. https://doi.org/10.1007/BF00187257

Wolff, H. (1953). Osage 1: Phonemes and Historical Phonology. *International Journal of American Linguistics*, *18*, 63–68.

Wong, M. L., ve Medrano, J. F. (2005). *One-Step Versus Two-Step Real- Time PCR*. *39*(1), 7585. https://doi.org/10.2144/05391RV01

Wright, R. L., ve Conrad, C. D. (2008). Enriched environment prevents chronic stress-induced spatial learning and memory deficits. *Behavioural Brain Research*, *187*(1), 41–47. https://doi.org/10.1016/j.bbr.2007.08.025

Xu, Z., Hou, B., Zhang, Y., Gao, Y., Wu, Y., Zhao, S., ve Zhang, C. (2009). Antidepressive behaviors induced byenriched environment might be modulated by glucocorticoid levels. *European Neuropsychopharmacology*, *19*(12), 868–875. https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2009.07.004

Yang, M., Ozturk, E., Salzberg, M. R., Rees, S., Morris, M., O'Brien, T. J., ve Jones, N. C. (2016). Environmental enrichment delays limbic epileptogenesis and restricts pathologic synaptic plasticity. *Epilepsia*, *57*(3), 484–494. https://doi.org/10.1111/epi.13299

Yau, J. L. W., Olsson, T., Morris, R. G. M., Meaney, M. J., ve Seckl, J. R. (1995). Glucocorticoids, hippocampal corticosteroid receptor gene expression and antidepressant treatment: relationship with spatial learning in young and aged rats. *Neuroscience*, *66*(3), 571–581. https://doi.org/10.1016/0306-4522(94)00612-9

Zhang, L., Zhang, J., Sun, H., Liu, H., Yang, Y., ve Yao, Z. (2011). Exposure to enriched environment restores the mRNA expression of mineralocorticoid and glucocorticoid receptors in the hippocampus and ameliorates depressive-like symptoms in chronically stressed rats. *Current Neurovascular Research*, *8*(4), 286–293. https://doi.org/10.2174/156720211798121025

ETİK KURUL KARARI

STRES VE ÇEVRESEL ZENGİNLEŞTİRMENİN YAŞLI SIÇANLARDA DAVRANIŞLAR, ÖĞRENME VE BEYİNDEKİ BAZI NÖROBİYOLOJİK BELİRTEÇLER ÜZERİNE ETKİLERİ

ORİJİNALLİK RAPORU

%7	%6	%1	%2
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	%1
2	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	<%1
3	tanjuyildon.tr.gg İnternet Kaynağı	<%1
4	dergipark.org.tr İnternet Kaynağı	<%1
5	Submitted to Eskisehir Osmangazi University Öğrenci Ödevi	<%1
6	yunus.hacettepe.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
7	tip.baskent.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
8	Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) Öğrenci Ödevi	<%1