

BÖLÜM 2

ÖĞRENME VE BELLEK İLE İLİŞKİLİ HAYVAN DAVRANIŞ MODELLERİ

Soner BİTİKTAŞ¹

GİRİŞ

Öğrenme ve bellek bozukluklarını değerlendirmek için insanları araştırma modeli olarak kullanmak hem etik açıdan hem de uygulamadaki zorluklar açısından sıkıntılı olduğu için 20. yüzyılın başından itibaren hayvan modelleri ve davranış testleri kullanılmaya başlanmıştır. Bellek, insanlarda genellikle sözlü veya yazılı yanıtlar yoluyla değerlendirilirken, hayvanlarda açık davranışların analiziyle değerlendirilebilir. Öğrenme ve bellek ile ilgili hayvan davranış testlerine geçmeden önce bu kavramlarla ilgili bazı bilgileri özetlemek faydalı olacaktır.

Merkezi sinir sisteminin yüksek seviyeli işlevlerinden olan bellek, deneyimler sonucunda organizmanın geliştirdiği / değiştirdiği öğrenme davranışının anlık, kısa süreli veya uzun süreli olarak daha kolayca ve daha mükemmel bir şekilde tekrarlanabilmesi ve davranış üzerinde istikrarlı bir değişimin kazanımı olarak tanımlanabilir. Bellek, bilgiyi saklama, sürdürme ve geri çağırma yeteneğidir. Belleğin oluşturulması ve kullanılması için kodlama, depolama ve geri çağırma süreçlerine gereksinim duyulur (1, 2). Kodlama, nesnelere algısal ve anlamsal yönlerini ve bu bilgilerin birbirlerine göre uzay ve zamanda nasıl konumlandıklarını içeren çok farklı bilgi türlerini bir araya getirerek ilişkilendirmektir (3). Anıların yalnızca küçük bir kısmı uzun süreli bellekte depolanır ve bu deneyimlerin yalnızca küçük bir kısmı geri alınabilir. Anılar genellikle sonraki provalarla güçlendirilir. Kapsamlı hayvan araştırmalarından elde edilen kanıtlar, uzun süreli belleğin, sinaptik plastisite olarak adlandırılan, protein sentezlerinin aracılık ettiği bir süreç olan yeni sinapsların oluşmasına bağlı olduğunu göstermektedir (4). Bu konsolidasyon sürecinin tamamlanması biraz zaman alacaktır, ancak sinaptik etkinlikte daha ince değişikliklerle anıların kısa süreler için korunabileceğine dair kanıtlar vardır, bu süreç yeni protein sentezine bağlı değildir ve aktif bölge ile ilgili veziküllerin konumunda kaymalar gibi nispeten hızlı bir şekilde elde edilebilir

¹ Dr. Öğr. Üyesi, Kafkas Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fiziyoloji AD., soner_bitiktas@hotmail.com

(3). Belleği oluşturan bilgilerin bir bölümünün hatırlanması ya da hatırlatılması bir aşinalık hissine sebep olur ve kısmi bilginin ilişkilendirildiği bir bellek izini aktifleştirerek anıların hatırlanmasına, diğer bir ifadeyle belleğin geri çağırılmasına sebep olur. Geri çağırma, daha önce kodlanmış bilgilerin uzun süreli bellekten alınması anlamına gelir ve maksatlı olarak hatırlama veya dolaylı olarak hazırlama, koşullandırma veya beceri öğrenme ölçütleriyle açık olarak ölçülebilir (5). Medial temporal lob yapılarından en önemlisi olan hipokampus açık bellekte kodlama, depolama ve geri çağırma gibi genel amaçlı bir merkez olarak benzersiz bir rol oynarken örtük bellek için benzer bir merkez yoktur, ancak bazal gangliyonlardan striatumun böyle bir rol oynadığına dair düşünceler vardır.

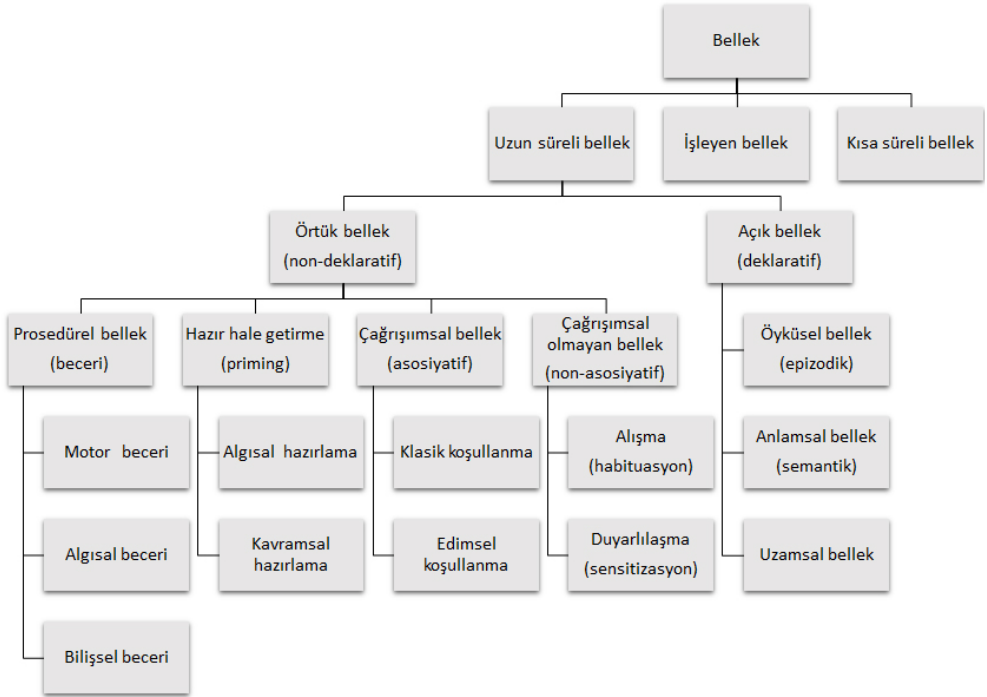
BELLEĞİN SINIFLANDIRILMASI

Belleğin sınıflandırılması birçok araştırmacı tarafından farklı şekillerde yapılmıştır. Bilginin depoda kalış süresine göre kısa süreli bellek ve uzun süreli bellek olmak üzere 2 sınıfa ayrılabilir. İşleyen bellek, bilişsel bir görevi gerçekleştirmek için gereken bilgilerin geçici olarak çevrimiçi depolanmasını, işlenmesini ve dönüştürülmesini destekleyen çok bileşenli bir bilişsel sistemdir. Bazı araştırmacılar işleyen belleği farklı bir sınıf olarak değerlendirmektedir. İşleyen bellekte eski ve yeni bilgiler sürekli olarak aktif tutulur ve kullanılır böylece işleyen bellek, hem kısa süreli hem de uzun süreli bellekten bazı özellikleri paylaşır (6). İlk karşılaşılan bilgi anlık belleğe girer bu bilgiler ya saniyeler içerisinde silinip kaybolur ya da kısa süreli belleğe girer. Kısa süreli belleğe giren bilgi de dakikalar içerisinde kaybolur ya da uzun süreli belleğe aktarılır. Uzun süreli bellek önem sırasına göre bazı bilgileri saatler sonra unutturur ya da ömür boyu saklayabilir. Bilginin uzun süreli bellekte kodlanmasında protein sentezlerine gereksinim duyulur.

Şekil 1'de gösterildiği gibi daha çok bilinç durumuna göre yapılan sınıflandırmada uzun süreli bellek; bilincin eşlik ettiği "açık bellek (deklaratif)" ve doğrudan deneyim yoluyla üretilen ve anıları geri çağırma için proaktif süreçler gerektirmeyen "örtük bellek (non-deklaratif)" olarak ayrılır (7). Açık bellek bilginin içeriğine göre semantik bellek (anlamsal) ve epizodik bellek (öyküsel) olmak üzere iki alt grupta sınıflandırılır. Bazı araştırmacılar epizodik belleğin içerisinde gösterse de genel olarak uzamsal bellek, açık belleğin bir diğer alt sınıfı olarak kabul edilir. Uzamsal bellek, hipokampusu dayalı bir açık bellek biçimidir ve çevreden gelen farklı ipuçları arasında bir ilişki kurarak bir zihinsel haritanın oluşturulmasına izin verir (8). Semantik bellek gerçeklerle, epizodik bellek ise olaylarla ilişkilidir. Semantik bellek genel dünya bilgisini içerir; nasıl, ne zaman, nerede öğrenildiği genellikle önemlidir. Epizodik bellek ise daha önceden deneyimlenen kişisel anıların edinildiği

zamana ve yere özgü bilgileri içerir. İnsanlar “hatırlama” hissini epizodik bellekle ilişkilendirirken, semantik bellek “bilme” olarak deneyimlenir (9).

Örtük bellek, “önceki yaşantının, sonraki davranışımızı, bilinçli bir farkındalık olmadan etkilemesidir” diye tanımlanır (10). Bilinçli bellek içeriği gerektirmeden performans yoluyla ifade edilen bir yetenekler bütünüdür. Motor ve algısal beceriler örtük belleğin oluşmasında çok önemlidir. Prosedürel bellek, beceriye dayalı bilgiyi ifade eder. Öğrenilenler, edinilmiş prosedürlerle ilişkilendirilmiştir ve performans yoluyla ifade edilir. Beceriye dayalı öğrenmenin yaygın günlük örnekleri arasında bisiklete binmeyi öğrenme (motor beceri öğrenme), yeni bir alfabe okumayı öğrenme (algısal beceri öğrenme) ve satranç oynamayı öğrenme (bilişsel beceri öğrenme) sayılabilir. Önceden öğrenilen bilgiler bilinçli bir farkındalık olmadan yeni karşılaşılan durum için bir zemin oluşturur, bu duruma hazır hale getirme (priming) olgusu denir. Hazır hale getirme, uyarının modalite gibi algısal özelliklerine dayanan ve semantik kodlamadan yararlanmayan algısal hazırlama ve uyarının anlamsal özelliklerine dayanan ve algısal özelliklerdeki değişikliklerden etkilenmeyen kavramsal hazırlama olarak alt bölümlere ayrılır.



Şekil 1. Belleğin sınıflandırılması.

Klasik koşullanma, reflektif aktivitelerin nötr ipuçlarıyla önceden ilişkilendirilmesini içerir. Örneğin, göz kırpmaya ile ilişkili klasik koşullandırmada, göze koşulsuz uyarıcı olarak hava üflemeinden hemen önce koşullu uyarıcı olarak bir ses verilir; hava üfleme, koşulsuz tepki olarak reflektif bir göz kırpmaya hareketine neden olurken ses verilmesi, hava üfleme beklentisiyle koşullu bir göz kırpmaya hareketi ortaya çıkarır (11). Davranıştan önce gelen uyarıcılar tarafından tetiklenen klasik koşullu tepkilerin aksine edimsel davranışlar, yanıtı izleyen olayların sonuçları tarafından şekillendirilir ve sürdürülür. Edimsel davranışta, organizmanın kendiliğinden yaptığı bir davranışın ardından, bir uyarıcı verilir. Bu uyarıcı beğenilirse davranış tekrar edilir, beğenilmezse tekrarlanmaz (12).

Çağrışımsal olmayan bellek (non-asosiyatif), organizmanın belirli bir anda duyuşal sistemlerini etkileyen duyuşal girdinin büyük çoğunluğunu oluşturan alakasız uyarıcıları görmezden gelmeyi öğrenme yeteneği olarak tanımlanan alışma (habitüasyon) ve ağırlı bir uyarıcıdan sonra hafif bir dokunmaya karşı bile daha kuvvetli bir tepki verilmesi gibi yoğun veya zararlı bir uyarıcıdan sonra çeşitli uyarıcılara verilen artmış bir yanıt olarak tanımlanan duyarlılaşma (sensitizasyon) olmak üzere ikiye ayrılır. (13). Groves ve Thompson'ın ikili süreç teorisine göre, duyarlılık uyarıcının başında hüküm süren ve yanıt genliğinde ilk geçici artışa sebep olan mekanizma iken, alışma uyarıcının devam ettiği ilerleyen zamanlarda görülen yanıtın azalması mekanizmasıdır (14).

Bellek, bilgiyi beyinde kaydederek öğrenmenin temelini oluşturur. Öğrenme, davranışı ve belleği değiştiren bilgilerin edinilmesidir. Öğrenme, kalıcı davranış değişikliklerinin altında yatan uzun süreli güçlenme gibi çoklu nöronal mekanizmaların sonucudur (2).

ÖĞRENME VE BELLEK İLE İLGİLİ NÖROANATOMİK YAPILAR

Öğrenme ve bellek ile ilgili çalışmaların yüzyıllık bir geçmişi vardır. Özellikle son yıllarda teknolojinin gelişimine bağılı olarak kullanılan nörogörüntüleme, hayvan lezyon çalışmaları ve hayvan davranış testleri sayesinde açık ve örtük belleğin nöronal temelini anlaşılmada bir dizi yol gösterici ilke ortaya konmuştur. Hayvanlar üzerinde yapılan araştırmalar, belirli beyin yapılarının bellekteki rolü hakkında ek kanıtlar sağlamıştır.

Açık bellek için son derece önemli rol oynayan medial temporal lob; hipokampus (ammon boynuzu; CA alanları, dentat girus, subiculum), entorinal korteks, parahipokampal korteks, peririnal korteks ve amigdalayı içerir. Bellek çalışmalarında eşsiz bir yeri olan H.M. isimli hastada, epilepsi tedavisi için bilateral medial temporal lobektomi yapıldıktan sonra şiddetli bellek bozuklukları görülmüştür.

(15). Hipokampusun CA alanlarındaki lezyonlar, özellikle yeni bellek oluşmasını ciddi şekilde bozarak anterograd amneziye yol açar (16) bununla birlikte sadece entorinal korteks lezyonları zayıf, kısa süreli bellek bozukluklarına neden olur (17). Peririnal korteks lezyonları, görsel ve dokunsal görevlerde uzun süreli bellek bozukluklarına neden olur (18) ve hipokampal lezyonların etkilerini şiddetlendirir. Hipokampal oluşumun, uzun süreli bellek depolarından bilgileri geri çağırma rol oynayabileceği, parahipokampal korteksin ise yeni karşılaşılan ve tanıdık olmayan uyaranlara yönelimi güçlendirdiği düşünülmektedir (11). Amigdalanın da hipokampus gibi açık bellek ile ilişkili bir yapı olduğuna dair eski bilgilerin, komşu korteks veya lif yollarına zarar vermeden sadece amigdalaya zarar veren stereotaksik lezyonlarla yapılan detaylı araştırmalar sonucunda doğru olmadığı gösterilmiştir (19). Amigdala daha çok duygu, davranış, motivasyon, ve koku alma gibi çeşitli işlevlerle ilişkilidir.

Sadece dorsomedial talamusunda hasar olan bazı hastalar herhangi bir bellek bozukluğu sergilemezken (20), mamiller cisim ve dorsomedial talamus çekirdeği gibi diensefalik yapılardaki hasara eşlik eden Korsakoff sendromlu hastalarda, bellek bozuklukları gözlemlenmiştir. Bu sonuçlardan elde edilen bilgiler ışığında diensefalonun açık bellek için kritik bir yapı olmadığı, ancak Korsakoff sendromlu hastalarda medial temporal lob ile diensefalon arasındaki mamillotalamik ve amigdalofugal yollarda kesinti oluşmasından dolayı bellek bozuklukları geliştiği düşünülmektedir (21).

Bazal ön beyinden çıkarak hipokampus ve diğer yapılar üzerinde sonlanan kolinerjik nöronların güçlü bir modülatör etkisi vardır. Bazal ön beyin lezyonları hipokampustaki nöronal aktiviteyi etkili bir şekilde azaltarak bellek bozukluklarına neden olur. Sınırlı bazal ön beyin lezyonlarını takiben birkaç şiddetli açık bellek bozukluğu görülmesine rağmen, bu etkinin bazal ön beyinden mi kaynaklandığı yoksa bazal ön beyinin yaptığı projeksiyonlar ile hipokampusun nöronal aktivitesini bozmasından mı kaynaklandığı net değildir (22).

Nörofizyolojik çalışmalar, hayvan lezyon çalışmaları ve nörogörüntüleme çalışmaları, dorsolateral prefrontal korteksin işleyen bellek için önemli olduğunu göstermiştir. Frontal dopamin seviyesindeki azalmanın, işleyen bellek için gerekli olan muhakeme süreçlerini bozduğu öne sürülmüştür (23). Anterior prefrontal korteksin, açık bellekte tanıma ve hatırlama gibi belleğin geri çağırılmasında yer aldığına dair çalışmalar mevcuttur. (24) Sağ anterior prefrontal bölgenin rolü tam olarak tanımlanmamış olmasına rağmen belleğin geri çağırılmasıyla ilgili olduğu düşünülmektedir. Bununla ilgili yapılan çalışmalardan birinde sağ anterior prefrontal korteks lezyonu olan bir hastada tanıma yeteneğinin önemli ölçüde bozulduğu gösterilmiştir (25).

Sol temporal lobdaki kortikal bölgeler, semantik bellek ile ilişkili olarak nesne adlarının hatırlanması için özellikle önemlidir. Sol temporal lob lezyonu olan hastalarla ilgili bir çalışmada, kişileri, hayvanları ve aletleri adlandırma yeteneğinin ciddi şekilde bozulduğu göstermiştir. (26). Ayrıca sol inferior prefrontal korteksin de semantik bellek için önemli olduğu, medial temporal veya diensefalik bölgelerin ise epizodik bellekte bozulmalar gösterilmiştir (27, 28).

Bu zamana kadar yapılan araştırmalar sonucunda açık belleğin nöronal temelinin merkezinde medial temporal lob bulunur. Anterior talamus, forniks ve intralaminar talamik çekirdekler gibi diensefalik yapıların da açık bellek için kritik rol oynadığını biliyoruz. H.M isimli hastada gözlemlenen retrograd amnezi belli bir zaman dilimine kadar olan anıların hatırlanamamasına neden olurken çocukluk yılları gibi daha eski zamanlardaki anıların kusursuz bir şekilde hatırlandığını göstermektedir. Bu durum bize her ne kadar farklı bellek tiplerinin oluşmasında belirli beyin bölgelerinin kritik öneme sahip olduğunu gösterse de bilgilerin kısa süreli bellekten uzun süreli belleğe aktarılmasında ve depolanmasında beynin çok daha geniş bölgelerinin gerekli olduğunu göstermektedir. Bu açıdan serebral korteks son derece önemlidir ve açık bellek için son depolama bölgesi olarak görev yapar. Serebral korteksteki depolama alanı özgü iken (görsel, işitsel vb.), medial temporal lob ve diensefalon, çok çeşitli uyarılar tarafından yeni anıların oluşumu için gereklidir. Açık belleğin arayıp bulma stratejilerinin oluşturulması veya alınan bilgilerin işlenmesi gibi bazı biçimleri, dorsolateral ve anterior prefrontal kortekslere gereksinim duyar (11).

Örtük bellek için önemli olan beyin bölgeleri, gerçekleştirilecek olan görevler ile ilişkili bölgeleri içerir. Örneğin, örtük bellek görsel bir görevle ilişkili ise görsel kortekslere dayanır motor bir görevle ilişkili ise motor kortekslere ve bazal ganglionlar, serebellum gibi subkortikal motor yapılara dayanır. Bazal ganglionlar, motor işlevlerle beraber bilişsel ve algısal işlevlerde de rol oynamaktadır (29). Algısal beceri öğrenme ile ilişkili yapılan testlerde sol alt oksipitotemporal korteks aktivasyonunda öğrenmeye bağlı bir artış olduğu gösterilmiştir. Bunların dışında klasik koşullanma gibi örtük bellek alt sınıflarından bazıları görevin doğasına bağlı olarak hipokampusu ihtiyaç duyar.

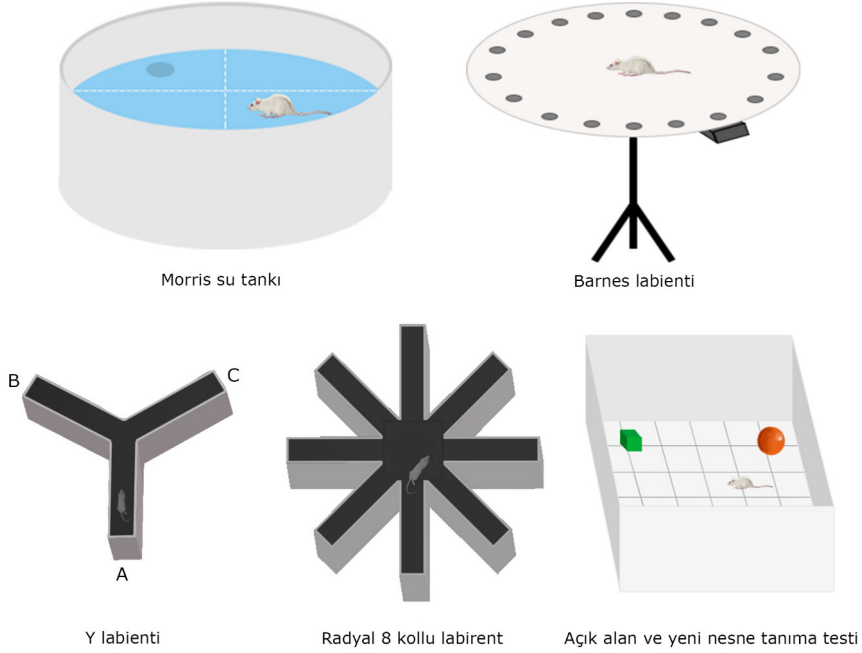
HAYVAN DAVRANIŞ TESTLERİ

Bellek, insanlarda genellikle sözlü veya yazılı yanıtlar yoluyla değerlendirildiği için sonuçlar objektif olmayabilir ayrıca insanlarda invazif uygulamaların zorluğu ve etik sıkıntılarının bulunmasından dolayı, araştırmacılar bellek bozukluklarını değerlendirmek için 20. yüzyılın başından beri birçok bilimsel inceleme yaparak

hayvan modellerini geliştirmişlerdir. Hayvan davranış testleriyle anksiyete seviyesi, lokomotor aktivitenin ölçülmesi gibi birçok değerlendirme yapılabilmektedir. Bu bölümde daha çok öğrenme ve bellek ile ilgili Şekil 2’de gösterilen hayvan davranış testleri üzerinde durulacaktır.

Morris Su Tankı

Morris su tankı, 1980’li yılların başında Richard Morris tarafından kemirgenlerde uzamsal öğrenme ve belleği araştırmak için geliştirildi ve günümüze kadar davranış bilimlerinde araştırmacılara büyük katkısı olan yaygın bilişsel testlerden biri haline geldi (30). Bu test ile hastalıkların ve ilaçların öğrenme ve bellek üzerine olan etkileri kolay bir şekilde değerlendirilebilir. Değişik kemirgenler için farklı özellik ve ebatlarda olabilen davranış testleri için burada sadece ratlar için kullanılacak testlerden bahsedilecektir. Morris su tankı testinde deney hayvanı, 120–200 cm çapında ve 50–60 cm yüksekliğinde, 25–30 cm derinliğinde oda sıcaklığında (25 ± 2 °C) su ile doldurulmuş dairesel bir tanka bırakılır. Hayvanın boğulmamak için kaçacağı bir platform yerleştirilir. Su tankının dört çeyreğinden birinin (hedef kadran) merkezine yerleştirilen platform 10-11 cm çapında ve su seviyesinin 1-2 cm altında kalacak şekilde konular böylece hayvanın platformu görmemesi sağlanır. Bu testte önemli olan nokta hayvanın çevredeki işaretlerden faydalananak bir bilişsel harita oluşturması ve sonraki denemelerde platformun yerini daha kısa sürede bulmasıdır. Hipokampusu bağlı uzamsal öğrenmenin test edilmesi için su tankının dışına bazı görsel işaretler konularak hayvanın platformun yerini hatırlaması istenir (31). Hayvanın kadranlarda geçirdiği süre, platforma ulaşma süreleri ve hızları gibi parametreler bilgisayar yazılımıyla desteklenen bir kamera sistemi aracılığıyla analiz edilir. Hayvanların öğrenme performanslarının değerlendirilmesi yapılacak denemeler için farklı protokoller uygulanabilmektedir. Genellikle bu denemeler 2 günden 5 güne kadar günde 3-8 kez eğitilirler, ilk denemelerinde platformu bulan hayvanların 15-30 saniye platformda durmalarına izin verilir platformu bulamayan hayvanlara yardım edilerek bulmaları sağlanır daha sonra su tankından çıkarılır, böylece hedef kadran merkezinde bulunan platformu nasıl bulacaklarını öğrenirler. Son gün denemelerinden 24 saat sonra “Prob denemesi” olarak adlandırılan deneyler gerçekleştirilir. Bu deneme için platform su tankından çıkarıldıktan sonra hayvanların davranışları 60 saniye süresince değerlendirilir. Hedef kadrana ulaşmak için harcadığı süre, hedef kadranda ve diğer kadranlarda geçirilen süre, su tankının periferinde geçirilen süre, yüzme hızı, kat edilen toplam mesafe gibi parametreler analiz edilerek hayvanların hipokampusu bağlı uzamsal bellek performansları değerlendirilir (32).



Şekil 2. Öğrenme ve bellek ile ilgili bazı hayvan davranış testleri.

Y Labirent Testi

Y labirent testi, hayvanların uzamsal işleyen belleğini ölçmek için kullanılır (33). Olumlu veya olumsuz pekiştireçler içermeyen ve çok az strese neden olarak bu test, etolojik olarak kemirgenlerin yeni alanları keşfetme konusundaki doğuştan gelen merakına dayanır (34). Y şeklindeki labirent, sıçanlar için birbirlerine 120° derece açıyla bağlı 40 cm uzunluğunda, 15 cm genişliğinde ve 30 cm yüksekliğinde (fareler için 20x10x20 cm) üç koldan oluşmaktadır (35). Labirentin içinde herhangi bir işaret bulunmamalı labirentin dış ortamında çeşitli afişler, pencere, kapı gibi ipuçları bulunmalıdır. İlk denemelerde seçilen kollarından biri bir bölme yardımıyla kapalı tutulur (yeni kol; C). belirlenen bir başlangıç kolundan labirente bırakılan kemirgenin 15 dakika süresince (farklı protokollerde farklı süreler kullanılabilir) labirentteki başlangıç kolunu (A) ve tanıdık kolu (B) öğrenmesi sağlanır. Hayvan labirentten çıkarıldıktan sonra kafesine konulur, kapalı kol açılır ve 1 dakika sonra tekrar başlangıç kolundan labirente konularak kısa süreli uzamsal bellek, 4 saat sonra konularak ise uzun-süreli uzamsal bellek performansları değerlendirilir. Hayvanın arka ayakları ve kuyruğunun bir koldan girmesi ile o kola girdiği kabul edilir (36). Uzamsal bellek performansı yeni kola (C) giriş sayısında-

ki artış ile ilişkilidir. Her üç kola da tekrar olmaksızın ardışık girişler, alternasyon (değişim) olarak tanımlanır. Alternasyon yüzdesi (önceki iki girişten farklı bir kola giriş) şu şekilde hesaplanır:

$$\text{alternasyon yüzdesi} = [\text{alternasyon sayısı} / (\text{toplam kol girişleri} - 2)] \times 100$$

Alternasyon yeteneği, hayvanların hangi kolları daha önce ziyaret ettiklerini bilmelerini gerektirir, bu nedenle, işleyen belleğin bir ölçüsüdür (37).

Radyal Kollu Labirent

Olton Testi olarak da bilinen radyal sekiz kollu labirent görevinin orijinal versiyonu, 1976'da Olton ve Samuelson tarafından geliştirildi (38). Testin klasik versiyonunda, her kola yem konulur ve hayvanın ortamda bulunan görsel-uzaysal ipuçlarını kullanarak her bir kola yalnızca bir kez girerek bütün yem ödülünü toplaması istenir. Her deneme sırasında, sıçanın daha önce girdiği kola tekrar girme sayısı 'kısa süreli işleyen bellek hatası' olarak kaydedilir ve bellek performansı değerlendirilir. Bu testte, 1-2 hafta boyunca gerçekleştirilen denemelerde artan sayıda doğru seçim yapıp yapılmadığı dikkate alınarak öğrenme performansı da değerlendirilebilmektedir.

Örnek aşaması ve seçim aşaması olmak üzere iki aşamada gerçekleştirilen başka bir versiyonda kısa süreli veya uzun süreli bellek test edilebilmektedir. Örnek aşamasında, sekiz kolun dördü kapatılarak açık olan dört kola yem konulur ve sıçanın yemleri toplamasına izin verilir. Sonra sıçanlar kafeslerine geri konulur. Radyal kollu labirentin sekiz kolu da açılarak sıçanlar 5 dakika veya 24 saat sonra tekrar labirente konularak bellek performansları değerlendirilir. Seçim aşamasında, örnek aşamasında kapalı olan dört kola yem yerleştirilerek, sıçanın kalan dört koldaki yemi bulması beklenir. Bunun için sıçanın daha önce hangi kollara girdiğini hatırlaması gerekir. Örnek ve seçim aşamaları arasındaki aralık, kısa süreli belleği veya uzun süreli belleği test etmek için ayarlanabilir (39). Seçim aşamasında yanlış kollara giriş sayıları kısa süreli ya da uzun süreli bellek hatası olarak kaydedilir (40).

Bir diğer versiyonda, bütün kollar açıkken hep aynı dört kola yem konulur ve sıçanın yem konulmayan kollara girmemesi beklenir (41). Doğru performans, bilgilerin günler boyunca uzun süreli depolanması gerektirir. Denemeler sırasında yem konulmayan yanlış kollara giriş sayısı referans bellek hatası olarak kaydedilir ve bu şekilde referans bellek performansı ölçülür. Aynı denemelerde girilen kollara yeniden giriş sayıları kaydedilerek işleyen bellek performansı da ölçülebilir.

Açık Alan Testi

Açık alan testi ilk olarak 1930'larda Calvin Hall tarafından farelerde çekingenliğin bir indeksi olarak dışkılamayı ölçmek için geliştirilmiştir (42). Kemirgenlerde

anksiyete benzeri davranışları ve lokomotor aktiviteyi değerlendirmek için en çok kullanılan etolojik testlerden biridir. Bu testte, hayvanların duvarlarla çevrili bir açık alanı özgürce keşfetmelerine izin verilir. Kemirgenler, açık alanın merkezinden kaçınıp periferde daha fazla kalıyorsa bu duruma tigmotaksis denir ve hayvanda anksiyete seviyesinin yüksek olduğu anlamına gelir (43).

Bu bölümde daha çok açık alan testinin, öğrenme ve bellek ile ilgili değerlendirmeler yapmak için nasıl kullanıldığı üzerinde durulacaktır. Açık alanın ebatları değişiklik göstermesine rağmen ideal boyutları 50 cm boy, 40 cm genişlik ve 60 cm uzunluğu olan dikdörtgen şeklinde üstü açık bir kutudur. Açık alanın zemini eşit çizgilerle bölünmelidir (44). Açık alanda alışkanlık (habitüasyon), bir hayvanı açık bir ortama taşımak ve bu yeni ortamda rahat olana kadar keşfetmesine izin vermek anlamına gelir. Hayvanın 2-10 dakika gibi belirli bir süre içinde çevreyi serbestçe aramasına izin verilir (45). 10 dakikadan uzun süren bir keşifle hayvan ya çevresini temizlemeye ya da dinlenmeye başlar, bu da keşfedilecek yeni bir şey olmadığı anlamına gelir (44). Açık alan testinde kemirgen yavaşça ortamın ortasına veya herhangi bir köşesine yerleştirilir ve keşif davranışlarının değerlendirilmesi için genellikle 5 dakikalık periyotlarda hayvanın kaç kez ayağa kalktığı ve her çizgiyi kaç kez geçtiğidir gibi belirli değişkenler kaydedilir. Kemirgenin arka ayakları üzerinde durması, doğuştan gelen keşif yeteneğini gösterir ve yeni bir çevreyle karşılaştığında daha fazla arka ayakları üzerinde durarak çevreyi araştırması ve öğrenmesi beklenir (46).

Sıçanın açık alana ilk yerleştirildiği an öğrenme oturumu olarak kabul edilir. İlk denemeden 24 saat sonra yapılan deneme uzun süreli belleği, 6 saatten az bir süre sonra yapılan deneme kısa süreli belleği ve 3 dakika gibi bir süre sonra yapılan deneme işleyen belleği için değerlendirmek için kullanılır. Aynı hayvan aynı noktadan açık alana yerleştirilerek yine hayvanın kaç kez ayağa kalktığı ve her çizgiyi kaç kez geçtiği incelenir. Öğrenme ve bellek oturumları sırasında ölçülen göstergeler arasındaki fark, mekansal belleği değerlendirmek için en kabul edilebilir kriterdir. Sağlıklı bir sıçanda ilk kez karşılaşılan bir ortamda keşif davranışının ve lokomotor aktivitenin fazla olması beklenir. Aynı çevreye tekrar tekrar maruz kalmak ise alışmaya (habitüasyon) sebep olarak bu göstergelerde azalmaya sebep olur. Öğrenme ve bellek oturumları arasında göstergelerdeki sayı değişmezse, bu bellekte tam bir silinme olarak kabul edilebilir. (47).

Yeni Nesne Tanıma Testi

Yeni nesne tanıma testi, hayvanların daha önce karşılaşılan bir nesneden ziyade yeni bir nesneyi keşfetmek için daha fazla zaman harcamaya yönelik doğal eği-

limlerine dayanan bir bellek testidir. A ve B nesnelere aynı özelliklere sahip, C nesnesi ise farklı şekil, renk ve büyüklükte olmalıdır. Nesnelere sıçanın hareket ettiremeyeceği kadar ağır olmalıdır. Deneyin gerçekleşmesi için bu 3 nesnenin ve sıçanın konulacağı bir açık alan gerekir (48). Açık alan, sıçanın barındığı odada, yerden 90 cm yükseklikte bir masa üzerine konularak böylece hayvanlarda ortam değişikliğinden dolayı stres oluşmaz. 1. gün alışma, 2. gün eğitim ve eğitimden 1 saat sonra test denemeleri gerçekleştirilir. 1. gün sıçan açık alana bırakılır ve 10 dakika boyunca ortamı keşfetmesine izin verilir. 2. gün, A ve B nesnelere açık alanın iki köşesine duvardan 15 cm uzakta olacak şekilde yerleştirilir ve sıçan, bu iki nesnenin arasına konularak. Sıçanın 5 dakika boyunca ortamı serbestçe keşfetmesine izin verilir. Sonra sıçan kafesine konularak 1 saat dinlenmesine izin verilir. Bu sırada açık alandaki kokuları yok etmek için arena alkolle temizlenmelidir. 1 saat sonra, açık alana A ve C nesnesi konularak sıçanın 5 dakika boyunca yaptığı hareketler incelenir. A ve C nesnesi için keşif süreleri kaydedilir. Deneyler kameraya kaydedilerek daha sonra analiz edilir. Böylece hayvanlar araştırmacının varlığından dolayı rahatsız olmaz. Nesnelere etrafındaki 2 cm'lik uzayda sıçanın burnuyla nesnelere dokunması ve/veya ön patileriyle dokunması keşif olarak tanımlanır. Nesnelere oturmak veya yaslanmak, keşif davranışı olarak kabul edilmez. C nesnesini keşfetmek için harcanan zamanın, her iki nesneyi keşfetmek için harcanan zamana bölünmesiyle ayırım indeksi hesaplanır. Normal sıçanlarda ayırım indeksinin %70 civarındadır. Bu orandaki azalma yani hayvanın daha çok eski nesneyle meşgul olması hayvanın bellek performansındaki bozulmaya işaret eder. Sağlıklı hayvanlar, yeni nesne üzerinde daha fazla zaman harcarlar (49).

Barnes Testi

Hipokampal bağımlı uzamsal öğrenme ve belleği değerlendirmek için kullanılan Barnes labirenti (50), Morris su tankına kıyasla hayvanda daha az strese sebep olan kuru bir alternatiftir.

Barnes labirent testi, çevresinde 18 tek tip delik (9 cm çapında) içeren yerden 90 cm yukarıda bulunacak şekilde yerleştirilir. 120 cm çapında dairesel bir platformdur. Çıkarılabilir siyah bir kaçış kafesine (30x15x10 cm) bağlanan bir delik dışında diğer tüm delikler kapalıdır. Platformdan 50 cm uzağa, görsel ipuçları yerleştirilir. En yaygın kullanılan protokolda, 4 günlük öğrenme denemeleri (15 dakika arayla günde 4 deneme) ve bu denemelerden 24 saat sonra kaçış kafesinin uzaklaştırıldığı "prob denemesi" olarak adlandırılan bellek denemesi gerçekleştirilir. Denemeler sırasında sıçanın kaçış kafesine girmesini motive etmek için yüksek ses (60 dB) (51) veya platformun üzerine parlak ışık (500 W, 1000 lux) verilir.

Bir öğrenme denemesinde sıçan merkeze bırakılır ve 3 dakika boyunca labirenti serbestçe keşfetmesine izin verilir. Koku alma ipuçlarını ortadan kaldırmak için her denemeden sonra labirent ve kaçış kafesi yüzeyleri %70 etil alkol solüsyonu ile temizlenmelidir. Barnes labirentinde, öğrenme denemelerinde kaçış kafesine girmek için geçen süre, prob denemesinde kapatılan kaçış deliğine ilk ulaşma süresi, kaçış kafesinin dışındaki delikleri ziyaret sayısı (hata) ve arama stratejileri değerlendirilir (52). Barnes labirentinde sıçanların kaçış kafesini bulmak için, labirent merkezinden defalarca geçerek ve herhangi bir düzen olmadan *rastgele* olarak delikleri ziyaret etme, labirent merkezini sadece bir kez geçerek saat yönünde veya saat yönünün tersinde ardışık delikleri *seri* olarak ziyaret etme ve labirent merkezini sadece bir kez geçerek üç veya daha az hatayla *doğrudan* hedef kadranda gezinme olmak üzere 3 farklı arama stratejisi kullanır (53).

SONUÇ

Bellek ile ilgili araştırmaların temel amacı, normal belleğin mekanizmalarını tanımlamak, bellek sorunlarının nasıl tedavi edileceğini belirleme, bilginin kodlanması ve depolanmasıyla ilgili belirli mekanizmaları anlamaktır. Hayvanlarda kullanılan davranış testleri, sinaptik plastisitedeki uzun süreli artışı inceleyen uzun dönemli güçlenme (LTP) ve uzun dönemli baskılanma (LTD) gibi elektrofizyolojik modeller ile ve moleküler analizler ile birlikte bellek bozukluklarının tedavisi-ne ilişkin araştırmalara önemli katkılar sağlamaktadır.

KAYNAKÇA

1. Shettleworth SJ. Cognition, evolution, and behavior: Oxford university press; 2009.
2. Anderson JR. The architecture of cognition: Psychology Press; 2013.
3. Mayes AR, Roberts N. Theories of episodic memory. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2001;356(1413):1395-1408.
4. Bailey CH, Bartsch D, Kandel ER. Toward a molecular definition of long-term memory storage. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996;93(24):13445-13452.
5. Graf P, Schacter DL. Implicit and explicit memory for new associations in normal and amnesic subjects. J Exp Psychol Learn Mem Cogn. 1985;11(3):501-518.
6. Baddeley AJS. Working memory. 1992;255(5044):556-559.
7. Markowitsch HJJPob, neurology c. Memory and amnesia. 2000;2.
8. O'keefe J, Nadel LJB, Sciences B. Précis of O'Keefe & Nadel's The hippocampus as a cognitive map. 1979;2(4):487-494.
9. Tulving EJAp. How many memory systems are there? 1985;40(4):385.
10. Curran T, Schacter DLJBn, neuropsychology. Amnesia: Cognitive neuropsychological aspects. 1997:463-471.
11. Poldrack RA, Gabrieli JD. Functional anatomy of long-term memory. J Clin Neurophysiol. 1997;14(4):294-310.
12. Skinner BF. Science and human behavior: Simon and Schuster; 1965.
13. Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, et al. Principles of neural science: McGraw-hill New York; 2000.

14. Groves PM, Thompson RF. A dual-process theory of habituation: Neural mechanisms. *Physiological substrates*: Elsevier; 1973. p. 175-205.
15. Scoville WB, Milner B. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1957;20(1):11-21.
16. Alvarez P, Zola-Morgan S, Squire LR. Damage limited to the hippocampal region produces long-lasting memory impairment in monkeys. *J Neurosci*. 1995;15(5 Pt 2):3796-3807.
17. Leonard BW, Amaral DG, Squire LR, et al. Transient memory impairment in monkeys with bilateral lesions of the entorhinal cortex. *J Neurosci*. 1995;15(8):5637-5659.
18. Suzuki WA, Zola-Morgan S, Squire LR, et al. Lesions of the perirhinal and parahippocampal cortices in the monkey produce long-lasting memory impairment in the visual and tactual modalities. *J Neurosci*. 1993;13(6):2430-2451.
19. Zola-Morgan S, Squire LR, Amaral DG. Lesions of the amygdala that spare adjacent cortical regions do not impair memory or exacerbate the impairment following lesions of the hippocampal formation. *J Neurosci*. 1989;9(6):1922-1936.
20. Kritchevsky M, Graff-Radford NR, Damasio AR. Normal memory after damage to medial thalamus. *Arch Neurol*. 1987;44(9):959-962.
21. Graff-Radford NR, Tranel D, Van Hoesen GW, et al. Diencephalic amnesia. *Brain*. 1990;113 (Pt 1):1-25.
22. Morris MK, Bowers D, Chatterjee A, et al. Amnesia following a discrete basal forebrain lesion. *Brain*. 1992;115 (Pt 6):1827-1847.
23. Gabrieli J. Contribution of the basal ganglia to skill learning and working memory in humans in *Models of Information Processing in the Basal Ganglia*, eds. Houk, JC, Davis, JL & Beiser, DG. MIT Press, Cambridge, MA; 1995.
24. Wagner A, Gabrieli J, Desmond J, et al., editors. Prefrontal mediation of episodic memory performance. *Soc Neurosci Abstr*; 1996.
25. Schacter DL, Curran T, Galluccio L, et al. False recognition and the right frontal lobe: a case study. *Neuropsychologia*. 1996;34(8):793-808.
26. Damasio H, Grabowski TJ, Tranel D, et al. A neural basis for lexical retrieval. *Nature*. 1996;380(6574):499-505.
27. Markowitsch HJ, Calabrese P, Liess J, et al. Retrograde amnesia after traumatic injury of the fronto-temporal cortex. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1993;56(9):988-992.
28. Kapur S, Rose R, Liddle PF, et al. The role of the left prefrontal cortex in verbal processing: semantic processing or willed action? *Neuroreport*. 1994;5(16):2193-2196.
29. Knowlton BJ, Mangels JA, Squire LR. A neostriatal habit learning system in humans. *Science*. 1996;273(5280):1399-1402.
30. Morris RG, Garrud P, Rawlins JN, et al. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature*. 1982;297(5868):681-683.
31. Morris RGJS. Morris water maze. 2008;3(8):6315.
32. Halis H, Bitiktas S, Baştuğ O, et al. Differential Effects of Pentoxifylline on Learning and Memory Impairment Induced by Hypoxic-ischemic Brain Injury in Rats. *Clin Psychopharmacol Neurosci*. 2019;17(3):388-399.
33. Cognato Gde P, Bortolotto JW, Blazina AR, et al. Y-Maze memory task in zebrafish (*Danio rerio*): the role of glutamatergic and cholinergic systems on the acquisition and consolidation periods. *Neurobiol Learn Mem*. 2012;98(4):321-328.
34. Ghafouri S, Fathollahi Y, Javan M, et al. Effect of low frequency stimulation on impaired spontaneous alternation behavior of kindled rats in Y-maze test. *Epilepsy Res*. 2016;126:37-44.
35. Kumar V, Bhat ZA, Kumar D. Animal models of anxiety: a comprehensive review. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2013;68(2):175-183.
36. Conrad CD, Grote KA, Hobbs RJ, et al. Sex differences in spatial and non-spatial Y-maze performance after chronic stress. *Neurobiol Learn Mem*. 2003;79(1):32-40.

37. Mamiya T, Ukai M. [Gly(14)]-Humanin improved the learning and memory impairment induced by scopolamine in vivo. *Br J Pharmacol.* 2001;134(8):1597-1599.
38. Olton DS, Samuelson RJJ. *JoepAbp.* Remembrance of places passed: spatial memory in rats. 1976;2(2):97.
39. Foreman N, Gillett R. *A handbook of spatial research paradigms and methodologies: Psychology Press Hove; 1997.*
40. Stolberg A. Ranking of memories and behavioral strategies in the radial maze. *Acta Neurobiol Exp (Wars).* 2005;65(1):39-49.
41. Jarrard LEJ. *Th.* Selective hippocampal lesions and behavior. 1986:93-126.
42. Walsh RN, Cummins RA. The Open-Field Test: a critical review. *Psychol Bull.* 1976;83(3):482-504.
43. Prut L, Belzung C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur J Pharmacol.* 2003;463(1-3):3-33.
44. Leger M, Quiedeville A, Bouet V, et al. Object recognition test in mice. *Nat Protoc.* 2013;8(12):2531-2537.
45. Deacon RM, Koros E, Bornemann KD, et al. Aged Tg2576 mice are impaired on social memory and open field habituation tests. *Behav Brain Res.* 2009;197(2):466-468.
46. Hampton RR, Hampstead BM, Murray EA, et al. Rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) demonstrate robust memory for what and where, but not when, in an open-field test of memory. 2005;36(2):245-259.
47. Gould TD, Dao DT, Kovacsics CE, et al. The open field test. 2009:1-20.
48. Plamondon H, Morin A, Charron C. Chronic 17 β -estradiol pretreatment and ischemia-induced hippocampal degeneration and memory impairments: a 6-month survival study. *Horm Behav.* 2006;50(3):361-369.
49. Zhu W, Gao Y, Chang CF, et al. Mouse models of intracerebral hemorrhage in ventricle, cortex, and hippocampus by injections of autologous blood or collagenase. *PLoS One.* 2014;9(5):e97423.
50. Barnes CA. Memory deficits associated with senescence: a neurophysiological and behavioral study in the rat. *J Comp Physiol Psychol.* 1979;93(1):74-104.
51. Wu C, Yang L, Li Y, et al. Effects of Exercise Training on Anxious-Depressive-like Behavior in Alzheimer Rat. *Med Sci Sports Exerc.* 2020;52(7):1456-1469.
52. Sadeghian A, Fathollahi Y, Javan M, et al. Spatial Learning and Memory in Barnes Maze Test and Synaptic Potentiation in Schaffer Collateral-CA1 Synapses of Dorsal Hippocampus in Freely Moving Rats. *Basic Clin Neurosci.* 2019;10(5):461-468.
53. Vorhees CV. Methods for detecting long-term CNS dysfunction after prenatal exposure to neurotoxins. *Drug Chem Toxicol.* 1997;20(4):387-399.