

# Anksiyete ile İlişkili Belleklerin Oluşumunda Bazolateral Amigdalanın Rolü

## Role of Basolateral Amygdala in Formation of Anxiety Related Memory

Uz.Dr. Elif ÖZEN AKKURT,<sup>a</sup>  
Yrd.Doç.Dr. Sayad KOCAHAN,<sup>b</sup>  
Prof.Dr. Emine BABAR MELİK,<sup>c</sup>  
Prof.Dr. Enver MELİK<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Radyoloji AD,  
Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi,  
Mersin

<sup>b</sup>Adıyaman Üniversitesi  
Sağlık Yüksekokulu, Adıyaman

<sup>c</sup>Fizyoloji AD,  
Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi,  
Adana

Geliş Tarihi/Received: 31.03.2011  
Kabul Tarihi/Accepted: 12.09.2011

*Bu çalışma, daha önce 30. Ulusal Fizyoloji Kongresi (31 Ağustos-3 Eylül 2004, Konya)'nde sözlü bildiri olarak sunulmuştur.*

Yazışma Adresi/Correspondence:  
Yrd.Doç.Dr. Sayad KOCAHAN  
Adıyaman Üniversitesi  
Sağlık Yüksekokulu, Adıyaman,  
TÜRKİYE/TURKEY  
skocahan@posta.adiyaman.edu.tr

**ÖZET Amaç:** Amigdala kompleksi duygulanımda kritik rol oynamakta, anksiyete bozuklukları ve anksiyete ile ilişkili çevresel korku şartlanmasına katılmaktadır. Bu çalışmanın amacı kalıtsal anksiyete/korku davranışları ve öğrenilmiş bilişsel ve affektif anksiyete/korku davranışlarında bazolateral amigdala (BLA)'nın rolünün araştırılmasıdır. **Gereç ve Yöntemler:** Çalışmamızda Wistar türü erkek sıçanlar kullanılmıştır. Denekler yalancı lezyonlu (kontrol) ve BLA lezyonlu olmak üzere iki gruba ayrılmıştır. Sıçanların cerrahi uygulamaya alındıktan sonra, 2 hafta iyileşmesine izin verilmiş, testleri bunun ardından yapılmıştır. Pasif sakinme testi ve işaretsiz Pavlov tipi korku şartlanması gibi öğrenme testleri kullanılarak BLA'nın kognitif ve affektif şartlı korku davranışlarının bellekte kazanımı, saklanması ve anımsanması üzerine etkisi değerlendirilmiştir.

**Bulgular:** BLA lezyonlu sıçanlar, kontrol sıçanlarla karşılaştırıldığında pasif sakinme testinde, şoktan hemen ve 48 saat sonra, donma ve karanlıktan sakinme davranışlarında bozulma görülmüştür. Bu bulgu BLA lezyonunun bellekte kazanım ve kognitif korku şartlanma performansını bozduğunu göstermektedir. BLA lezyonu şok uygulanan çevrede (işaretsiz Pavlov tipi şartlanma düzeneği) tekrar test yapılması durumunda şartlı donmayı bozmuştur; bu bulgu, lezyonun affektif korku şartlanmasında kazanım ve saklama süreçlerini bozduğunu göstermektedir. **Sonuç:** BLA'nın şartsız donma belleğinin ifadesine ve çevresel ipuçları ve şartsız uyarının duysal bileşeni arasında ilişkisinin kurulmasına katıldığını ileri sürebiliriz.

**Anahtar Kelimeler:** Amigdala; hafıza; korku; anksiyete

**ABSTRACT Objective:** Amygdala plays a critical role in affect, is involved in anxiety disorders and anxiety related environmental fear conditioning. The aim of this study was to investigate the role of basolateral amygdala (BLA) in hereditary anxiety/fear behaviours and learned cognitive and affective anxiety/fear behaviours. **Material and Methods:** Wistar male rats were used in our study. Subjects were divided into two groups as sham (control) group and BLA lesion group. Rats were allowed to heal for two weeks after surgical procedure and were tested thereafter. Effect of BLA on acquisition, storage and recalling of cognitive and affective fear behaviours was evaluated using learning tests like passive avoidance test and unsigned Pavlov type fear conditioning. **Results:** In the passive avoidance test, immediately after and 48 hours after the shock, impairment was seen in freeze and avoidance from dark behaviors in rats with BLA lesions compared to control rats. This finding indicates that acquisition and cognitive fear conditioning performance in memory was impaired. When the test in the shock applied environment (unsigned Pavlov type conditioning mechanism) was repeated, BLA lesion impaired conditional freeze; this finding indicates that lesion impairs acquisition and storage processes in affective fear conditioning. **Conclusion:** We suggest that BLA is involved in the expression of unconditional freeze memory and in establishing a relationship between environmental clues and sensorial component of unconditional stimulus.

**Key Words:** Amygdala; memory; fear; anxiety

doi: 10.5336/medsci.2011-24088

Copyright © 2012 by Türkiye Klinikleri

Türkiye Klinikleri J Med Sci 2012;32(1):184-92

**A**mgdalanın anksiyete bozuklukları ve anksiyete ile ilişkili bellek işlevlerinde rol oynadığı bilinmektedir.<sup>1-3</sup> Duygulanım için önemli olan amigdala, sinirsel devrenin bir parçasıdır. Amigdala lezyonu olan hastalardaki ve hayvan modellerindeki çalışmalar da amigdalanın duygular için önemli olduğunu göstermektedir.<sup>4</sup> Ayrıca pozitron emisyon tomografisi (PET) ile yapılan çalışmalarda, özellikle korku ile ilişkili duygusal değişiklikler esnasında amigdalada aktivasyon artışı gösterilmiştir.<sup>5,6</sup>

Amigdalanın korku şartlanması ile en ilgili olan çekirdekleri santral ve bazolateral amigdala (BLA) çekirdekleridir. Korku şartlanmasının sinirsel döngüsünde amigdala girdileri genelde bazolateral çekirdeğe gelirken, çıktıları santral çekirdekte köken almaktadır.<sup>7,8</sup> Şartlı uyarının işlenmesini sağlayan duysal sistem ve şartlı yanıtı kontrol eden motor sistem arasında bulunan amigdala, korku şartlanmasının sinirsel döngüsünde merkezi bir rol oynamaktadır. Amigdala, korku şartlanmasının sinirsel döngüsünün duysal ve motor işlevlerden bağımsız olan parçasıdır ve bu döngüde düzenleyici işlevi vardır.<sup>9</sup>

Bilinçli veya bilinçsiz düzeyde kazanılan bilginin anımsanmasına bellek denir. Kognitif psikolojik çalışmalar, iki tip bellek olduğunu göstermiştir: eksplicit ve implicit. Bu bellek sistemlerinin kısa ve uzun süreli olmak üzere farklı depolanma şekilleri vardır.<sup>10</sup> Hipokampusun önemli görevlerinden birisi, kısa süreli belleğin uzun süreli belleğe çevrilmesine neden olan yapılanmayı sağlamak ve bazı bilgileri kalıcı deponun yer aldığı uzun süreli belleğin depo alanlarına taşımaktır. Mekanizması tam olarak bilinmese de hipokampus olmadan uzun süreli belleğin pekiştirilmesi mümkün olmamaktadır.<sup>11</sup>

Klinikte kalıtsal korku (fobik yanıt), beklenen anksiyete ve yaygınlaşmış anksiyete olmak üzere farklı anksiyete bozuklukları olarak tanımlanmaktadır. Farklı beyin yapılarının anksiyete ve korkunun farklı ölçütlerini modüle ettiği ve amigdalanın bazolateral çekirdeğinin fobik yanıtlara ve beklenen anksiyete oluşumuna katıldığı ileri sürülmektedir.<sup>12,13</sup> Fakat amigdala bazolateral çekirdeğinin anlık ve uzun süreli yaygınlaşmış anksiyete/korku bozukluğundaki rolü bilinmemektedir.

Korku oluşumunda rol oynayan beyin mekanizmalarının araştırılması duygusal yanıtlara neden olan sinirsel mekanizmaların anlaşılabilmesi için önemlidir. Korkunun sinirsel mekanizmalarının öğrenilmesi, fobi, anksiyete, travma sonrası stres bozukluğu ve panik atak gibi psikolojik hastalıkların mekanizmalarının anlaşılmasına ve yeni tedavi yaklaşımlarının geliştirilebilmesine katkıda bulunabilir.

Bu çalışmada kalıtsal anksiyete/korku ve öğrenilmiş bilişsel, affektif anksiyete/korku davranışlarında bazolateral amigdalanın rolünün araştırılması amaçlanmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEMLER

### DENEKLERİN HAZIRLANMASI

Çalışmamız Çukurova Üniversitesi Tıbbi Bilimler Deneysel Araştırma ve Uygulama Merkezi (TIB-DAM) Etik Kurul'u tarafından onaylanmış ve çalışmada "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" prensipleri doğrultusunda hayvan hakları korunmuştur.

Bu çalışmada 250-300 g ağırlığında, Wistar türü, yetişkin, erkek sıçanlar kullanıldı. Denekler bir hafta elle tutulmaya, laboratuvara taşınmaya ve laboratuvar ortamına alıştırdı. Şok uygulanan davranış testlerinde denekler bir kez kullanıldı.

### CERRAHI

Denekler, BLA lezyonlu ve yalancı (sham) lezyonlu denekler olmak üzere 2 gruba ayrıldı.

### BLA ÇEKİRDEĞİNDE LEZYON OLUŞTURULMASI

Sıçanlar, ketamin (80 mg/kg vücut ağırlığı) ve ksilazin (10 mg/kg vücut ağırlığı) anestezisi altında sıçan stereotaksi aletine yerleştirildi. Başta longitudinal insizyon ile lambda ve bregma ortaya çıkarıldı. Paxinos ve Watson stereotaksi atlasına<sup>14</sup> göre bregmadan 2,8 mm posteriyor, orta hattan 5,2 mm lateral koordinatlarda 1 mm genişliğinde delik açıldı; buradan 24 gauge iğne (dış çapı 0,5 mm) 8,6 mm ventrale ilerletildi. İğne polietilen kateter ile infüzyon pompasındaki enjektöre bağlandı. 2 µl (2 µg) ibotenik asit (SİGMA I-2765, 2 µg/ µl) infüzyon pompası ile 0,4 µl/dk sabit infüzyon hızında 5 dakika süresince bilateral olarak uygulandı.

## BLA ÇEKİRDEĞİNDE YALANCI LEZYON (SHAM) OLUŞTURULMASI

Ketamin (80 mg/kg vücut ağırlığı) ve ksilazin (10 mg/kg vücut ağırlığı) anestezisi altında, sıçan stereotaksi aletine yerleştirilen sıçanlara amigdala lezyonlu sıçanlar ile aynı sterotaksik koordinatlarda 2 µl glukoz içermeyen beyin omurilik sıvısı (BOS: 1'de 125 mM NaCl, 2,5 mM KCL, 27 mM NaHCO<sub>2</sub>, 0,5 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,5 mM NaOH) bilateral olarak 0.4 µg/ µl sabit infüzyon hızında, 5 dakika süresince uygulandı.

Cerrahi uygulamadan sonra 2 hafta derleme dönemi beklendi ve ardından yalancı lezyon ve ibotenik asit ile BLA lezyonu oluşturulan sıçanlara davranış testleri uygulandı.

## KORKUYA BAĞLI BELLEK TESTLERİ

Öğrenilmiş bilişsel ve affektif anksiyete/korku davranışları pasif sakinme ve işaretsiz Pavlov tipi korku şartlanma düzeneği olmak üzere iki farklı davranış düzeneğinde değerlendirildi.

### Pasif Sakınma Düzeneği ve Testi

Bu düzenek 7 x 7 cm boyutlarında sürgülü bir kapı ile birbirine bağlanan iki bölümden oluşmaktadır. 25 x 17 x 17 cm boyutlarındaki aydınlık bölümü şeffaf pleksiglasdan yapılmıştır ve zeminden 36 cm yükseklikten 60 cm beyaz ışık ile aydınlatılmaktadır. Karanlık bölüm ise siyah pleksiglastan yapılmıştır, 27 x 27 x 27 cm boyutlarındadır. Şok uygulanan bu bölümün zemini, birbirine paralel tellerden oluşan çelik ızgaradır ve şok aletine bağlıdır.

Denekler, 3 dakika laboratuara alıştırdıktan sonra düzeneğin iki bölümü arasındaki kapı açık durumdayken aydınlık bölüme yerleştirildi. Sıçanın içgüdüleri doğrultusunda, karanlık bölüme geçiş süresi (aydınlıktan kaçma latensi) kaydedildi. Karanlık bölüme geçtikten sonra sürgülü kapı kapatıldı, 30 sn beklendi ve ardından 1mA elektrik şoku 2 sn süresince uygulandı ve 3 sn sonra sıçan karanlık bölümden çıkarıldı. Bir grup kontrol (yalancı lezyon) ve BLA lezyonlu sıçan şok aldıktan sonra 1 dakika kafesinde bekledi ve tekrar düzeneğin aydınlık bölümüne yerleştirildi ve test edildi. İki bölüm arasındaki kapı açık durumdayken 300 sn süresince anlık korku belleğinde kazanım ve anımsama değerlendirildi.<sup>15</sup>

Başka bir kontrol ve BLA lezyonlu sıçan ise şok aldıktan 48 saat sonra düzeneğin aydınlık bölümüne yerleştirildi ve 600 sn süresince uzun süreli korku belleğinde saklama ve anımsama değerlendirildi. Sıçanın aydınlık bölümden karanlık bölüme ilk kez geçmesine kadar geçen süre, aydınlıkta geçirdiği toplam süre ve aydınlıkta sergilediği davranışları (donma, temizlenme, ayağa kalkma, koklama, yer değiştirme, karanlığa baş uzatma ve karanlığa giriş-çıkış) kaydedildi. Her denekten sonra düzenek %10'luk alkol ve ardından çeşme suyu ile silinerek kurulandı.

Pasif sakinme düzeneğinde zaman değerleri:

Sakinme latensi: Şok uygulandıktan sonra, sıçanın ilk kez dört ekstremitesi ile düzeneğin aydınlık bölümünden karanlık bölümüne geçmesine kadar geçen süre kaydedildi.

Saklama latensi: Test süresince sıçanın aydınlık bölümünde geçirdiği toplam süre kaydedildi.

### İşaretsiz Pavlov Tipi Korku Şartlanma Düzeneği ve Testi

Üç duvarı siyah, dördüncü duvarı şeffaf pleksiglastan yapılmış olan bu düzenek 27 x 27 x 27 cm boyutlarındadır. Düzeneğin zeminindeki birbirine paralel tellerden oluşan çelik ızgara şok aletine bağlıdır.

Deney sırasında oda 60 W kırmızı ışık ile aydınlatılarak sıçan için karanlık bir ortam yaratıldı ve sıçanın davranışları şeffaf ön duvardan izlendi. Denekler 3 dakika laboratuara alıştırdıktan sonra düzeneğe yerleştirildi, 30 sn beklendi ve ardından 1 mA elektrik şoku 2sn süresince uygulandı. Üç saniye sonra sıçan düzenekten çıkarıldı. Bir grup kontrol ve BLA lezyonlu sıçan 1 dakika kafesinde bekletildi ve tekrar düzeneğine yerleştirilerek 300 sn süresince test edildi. Çevresel ipuçlarının tamamına karşı oluşan donma ile ilişkili anlık korku belleğinde kazanma ve saklama değerlendirildi.<sup>16</sup>

Diğer bir grup kontrol ve BLA lezyonlu sıçanda ise şoktan 48 saat sonra, 600 sn süresince çevresel ipuçlarının tamamına karşı oluşan donma ile ilişkili uzun süreli korku belleğinde kazanma ve saklama değerlendirildi.

İşaretsiz Pavlov tipi korku şartlanması testinde denegin donma, temizlenme, ayağa kalkma ve kok-

lama davranışları kaydedildi. Her denekten sonra düzenek önce %10'luk alkol ve ardından çeşme suyu ile silinerek kurulandı.

### HİSTOLOJİK DEĞERLENDİRME

Davranış çalışmaları tamamlanan sıçanlara derin pentobarbital anestezisi altında (50 mg/kg vücut ağırlığı) beyin dokusunun perfüzyonu yapıldı. Perfüzyon tamamlandıktan sonra beyinler çıkarılarak %10'luk nötral formalin içinde saklandı. Beyinler en az 72 saat saklandıktan sonra koronal kesitler alındı. BLA lezyonunun belirlenmesi amacı ile beyin kesitleri Hematoksilen Eozin ile boyandı ve ışık mikroskopunda değerlendirildi.

### İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

BLA lezyonu yerleşimi doğru olan sıçanların verileri istatistiksel değerlendirmeye alındı. Veriler ortalama  $\pm$  SOH olarak ifade edildi. Verilerin dağılımını belirlemek için "One Sample Kolmogrov-Smirnov Z" testi kullanıldı. Grupların davranış testlerindeki zaman değerleri tek yönlü ANOVA, davranış sıklıkları ise  $\chi^2$  testi ile değerlendirildi,  $p < 0,05$  istatistiksel anlamlılık olarak kabul edildi.

## BULGULAR

### HİSTOLOJİK DEĞERLENDİRME

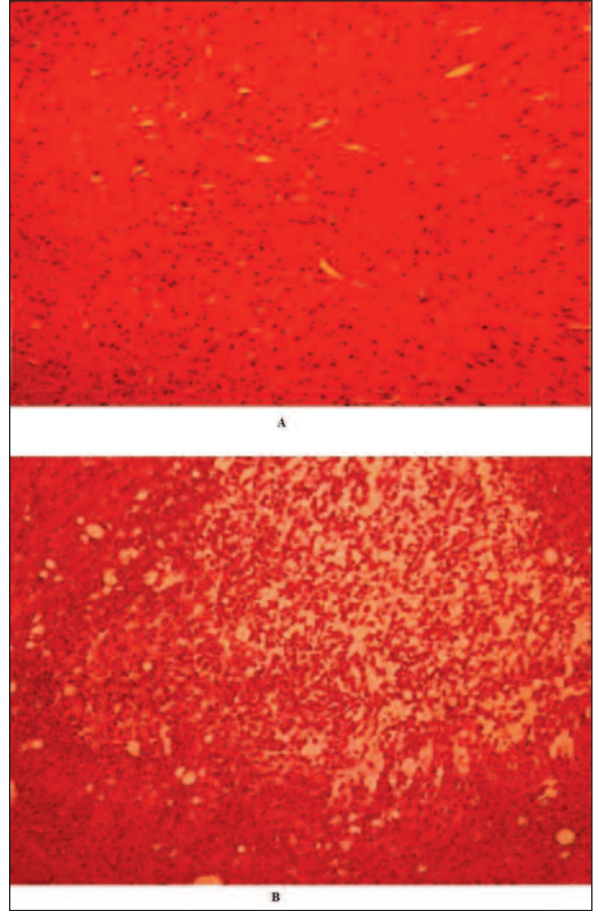
Nörotoksin ibotenik asit infüzyonu, alınan koronal kesitlerde, Paxinos ve Watson stereotaksi atlasına göre, bregmadan 1,8 mm ve 3,3 mm posteriyor koordinatları aralığında BLA'da nöron gövdelerinde zararlanmaya neden olmuştur (Resim 1).

### BLA LEZYONUNUN PASİF SAKINMA TESTİNDE ANLIK ŞARTLI KORKU ÜZERİNE ETKİSİ

Pasif sakinme düzeneğinde BLA lezyonunun anlık (çalışan bellek, kısa süreli bellek) korku üzerine etkisi, sıçanın ayağına elektrik şoku uygulanmasından hemen sonra 300 sn süre ile değerlendirilmiştir.

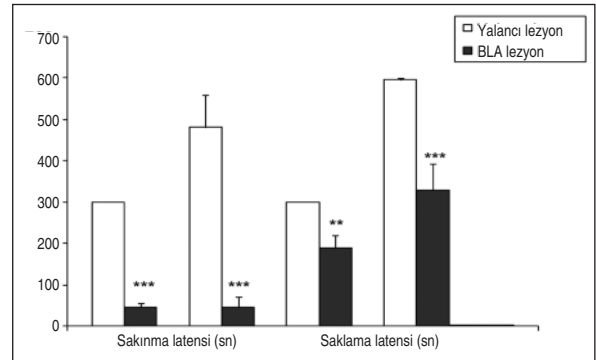
BLA lezyonu, kontrol grubuna göre sakinme latensini ve düzeneğin aydınlık bölümünde geçirilen toplam süreyi anlamlı olarak azaltmıştır [Sakinme latensi,  $F(1,18)= 617,3$ ,  $p < 0,001$ ; Saklama latensi  $F(1,18)=13,7$ ,  $p < 0,01$ ] (Şekil 1).

Düzeneğin aydınlık bölümünde sergilenen donma davranışında, BLA lezyonlu sıçanlarda



**RESİM 1:** Koronal beyin kesitinde sağ amigdala. **A)** Bazolateral amigdala oluşturulan yalancı lezyon **B)** Bazolateral amigdala oluşturulan nörotoksik lezyonun ışık mikroskopundaki görünümü. x400.

Renkli hali için Bkz. <http://tipbilimleri.turkiyeklinikleri.com/>



**ŞEKİL 1:** 300 ve 600 sn süreli pasif sakinme testinde sakinme ve saklama latensi.

Veriler ortalama  $\pm$  SH olarak ifade edilmiştir. \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ -yalancı lezyon grubuna göre. Davranış süreleri tek yönlü ANOVA, Gruplarda  $N= 10$ .

kontrole göre anlamlı azalma saptanmıştır,  $F(1,18)= 77,5$ ,  $p < 0,0001$  (Tablo 1).



**TABLO 1:** Pasif sakinme düzeneğinde 300 saniye anlık korku belleği testinde yalancı ve BLA lezyonu gruplarının davranış değerleri.

	Yalancı lezyon	BLA
Donma davranışı (sn)	187 ± 19,2	9,6 ± 3,9***
Temizlenme davranışı (sn)	15 ± 10,1	28,1 ± 8,9
Ayağa kalkma davranışı sıklığı	7 ± 1	9 ± 2*
Koklama davranışı sıklığı	10 ± 3	6 ± 1***
Yer değiştirme davranışı sıklığı	4 ± 1	3 ± 1
Baş uzatma davranışı sıklığı	2 ± 1	3 ± 1**
Giriş-çıkış davranışı sıklığı	0 ± 0	4 ± 1***

Veriler ortalama ± SH olarak ifade edilmiştir. \*p< 0,05, \*\*p< 0,01, \*\*\*p< 0,001-yalancı lezyon grubuna göre. Davranış süreleri tek yönlü ANOVA, davranış sıklıkları ise  $\chi^2$  testi. Gruplarda N= 10.

BLA: bazolateral amigdala; sn: saniye.

Ayağa kalkma davranışı sıklığı BLA lezyonlu sıçanlarda kontrol grubuna göre artmıştır ( $\chi^2= 4,13$ , ss= 1, p< 0,05) (Tablo 1).

Koklama davranış sıklığında BLA lezyonlu sıçanlarda kontrol grubuna göre anlamlı azalma görülmüştür ( $\chi^2= 24,98$ , ss= 1, p< 0,001) (Tablo 1).

Karanlığa baş uzatma ( $\chi^2= 78,05$ , ss= 1, p< 0,001) ve giriş-çıkış sıklığı ( $\chi^2= 11$ , ss= 1, p< 0,001) kontrol grubuna göre BLA lezyonlu sıçanlarda anlamlı artma göstermiştir (Tablo 1).

### BLA LEZYONUNUN PASİF SAKINMA TESTİNDE UZUN SÜRELİ KORKU ŞARTLANMASI ÜZERİNDE ETKİSİ

Pasif sakinme düzeneğinin karanlık bölümünde şok uygulanmasından 48 saat sonra, deneklerin aydınlık bölümünde 600 saniye süre ile sergiledikleri davranışlar test edilmiştir.

BLA lezyonu grubunda, kontrol deneklerine göre sakinme ve saklama latensinde anlamlı azalma saptanmıştır [Sakinme latensi  $F(1,18)= 27,6$  p< 0,0001, Saklama latensi  $F(1,18)= 17,6$  p< 0,001] (Şekil 2).

Şoktan 48 saat sonra uygulanan pasif sakinme testinde düzeneğin aydınlık bölümünde sergilenen donma davranışı süresi BLA lezyonlu grupta, kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde azalmıştır  $F(1,18)= 62,9$ , p< 0,001 (Tablo 2).

BLA lezyonlu sıçanlarda koklama ( $\chi^2= 89,3$ , ss= 1, p< 0,001) ve yer değiştirme ( $\chi^2= 17,4$ , ss= 1, p< 0,001) davranış sıklıkları kontrol grubuna göre azalmıştır (Tablo 2).

Karanlığa baş uzatma ( $\chi^2= 13,3$ , ss= 1, p< 0,001) ve giriş-çıkış sıklığı ( $\chi^2= 57,04$ , ss= 1, p< 0,001) kontrol grubuna göre BLA lezyonu grubunda artmıştır (Tablo 2).

### BLA LEZYONUNUN İŞARETSİZ PAVLOV TİPİ KORKU ŞARTLANMA DÜZENİNDE ANLIK KORKU ŞARTLANMASI ÜZERİNDE ETKİSİ

Bu test ile öğrenmeden önce oluşturulan BLA lezyonunun donma tipi korku ve şartsız korkunun bellekte temsili ve çevre arasındaki ilişki üzerine etkisinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Anlık korku şartlanması deneyinde, elektrik şokundan hemen sonra denekler şok uygulanan ortamda test edilmiştir. BLA lezyonlu grupta kontrol gruba göre donma davranışının azaldığı görülmüştür  $F(1,18)= 58,4$ , p< 0,0001 (Tablo 3).

**TABLO 2:** Pasif sakinme düzeneğinde 600 saniye uzun süreli korku belleği testinde yalancı ve BLA lezyonu gruplarının davranış değerleri.

	Yalancı lezyon	BLA
Donma davranışı (sn)	261 ± 27,1	32,8 ± 10,1**
Temizlenme davranışı (sn)	56 ± 16,3	59,0 ± 19,8
Ayağa kalkma davranışı sıklığı	11 ± 1,5	11 ± 2
Koklama davranışı sıklığı	19 ± 2	8 ± 2*
Yer değiştirme davranışı sıklığı	7 ± 1	4 ± 1**
Baş uzatma davranışı sıklığı	6 ± 2	3 ± 1**
Giriş-çıkış davranışı sıklığı	0,5 ± 0,4	4 ± 1**

Veriler ortalama ±SH olarak ifade edilmiştir. \*p< 0,05, \*\*p< 0,01-yalancı lezyon grubuna göre. Davranış süreleri tek yönlü ANOVA, davranış sıklıkları ise  $\chi^2$  testi. Gruplarda N= 10. BLA: bazolateral amigdala; sn: saniye.

**TABLO 3:** İşaretsiz Pavlov tipi korku şartlanma düzeneğinde 300 saniye süreli anlık korku belleği testinde yalancı lezyon ve BLA lezyonu gruplarının davranış ölçütleri.

	Yalancı lezyon	BLA
Donma davranışı (sn)	219,6 ± 14,2	67,2 ± 12,5**
Temizlenme davranışı (sn)	3 ± 2,8	31 ± 11,1*
Ayağa kalkma davranışı sıklığı	6 ± 2	10 ± 1**
Koklama davranışı sıklığı	2 ± 1	6 ± 1**

Veriler ortalama ±SH olarak ifade edilmiştir. \*p< 0,05, \*\*p< 0,01-yalancı lezyon grubuna göre. Davranış süreleri tek yönlü ANOVA, davranış sıklıkları ise  $\chi^2$  testi. Gruplarda N= 10. BLA: bazolateral amigdala; sn: saniye.

BLA lezyonlu sıçanlarda temizlenme,  $F(1,18)=5,9$   $p < 0,05$ , ayağa kalkma ( $\chi^2=24,6$ ,  $ss=1$ ,  $p < 0,0001$ ) ve koklama davranışı ( $\chi^2=41$ ,  $ss=1$ ,  $p < 0,001$ ) kontrol grubuna göre daha fazla olmuştur (Tablo 3).

### BLA LEZYONUNUN İŞARETSİZ PAVLOV TİPİ KORKU ŞARTLANMA DÜZENİNDE UZUN SÜRELİ KORKU ŞARTLANMASI ÜZERİNE ETKİSİ

Bu test ile BLA lezyonunun şok uygulanan çevrede, şoktan 48 saat sonra uzun süreli korku şartlanması üzerine etkisi değerlendirilmiştir.

Şok uygulanan çevrede şoktan 48 saat sonra BLA lezyonlu sıçanlarda donma davranışının kontrol grubuna göre azaldığı görülmüştür  $F(1,18)=38,3$   $p < 0,0001$  (Tablo 4).

BLA lezyonlu sıçanlarda temizlenme,  $F(1,18)=8,4$   $p < 0,01$ , ayağa kalkma ( $\chi^2=62,5$ ,  $ss=1$ ,  $p < 0,0001$ ) ve koklama ( $\chi^2=503$ ,  $ss=1$ ,  $p < 0,0001$ ) davranışının kontrol grubuna göre artmış olduğu saptanmıştır (Tablo 4).

## TARTIŞMA

Korku oluşumunda rol oynayan beyin mekanizmalarının araştırılması, duygusal yanıtlara neden olan sinirsel mekanizmaların anlaşılabilmesi için önemlidir.<sup>1,2</sup> Amigdala duygulanım için önemli olan sinirsel devrenin bir parçasıdır. Bu çalışmada BLA'nın kalıtsal ve öğrenilmiş anksiyete/korku davranışlarındaki rolü araştırılmıştır.

### HİSTOLOJİK VERİLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Amigdala hasarına bağlanan etkilerin bazıları komşu yapıların veya bölgeden geçen aksonal yol-

ların hasarına bağlı oluşabilmektedir. Aspirasyon ile amigdala uzaklaştırma sıpriform korteks, entorinal korteks ve peririnal kortekste de harabiyete sebep olabilmektedir. Amigdalanın cerrahi olarak çıkartılması ve elektrolitik lezyonlarda beyaz cevherin de beraber uzaklaştırılması veya hasar görmesi söz konusudur. Nörotoksin kullanılarak yapılan lezyon çalışmalarında aksonal liflerdeki hasara bağlı gelişen etkilerin en aza indirildiği gözlenmiştir.<sup>17</sup>

Çalışmamızda kullandığımız nörotoksin olan ibotenik asit, merkezi sinir sisteminde uyarıcı bir nörotransmitter olan glutamatin yapay bir türevidir. Glutamat ve yapay türevleri yüksek oranda, sinir hücrelerinin gövdeleri üzerine etki ettiğinde, sinir hücrelerini öldürecek kadar büyük bir  $Ca^{2+}$  iç akışı oluşturabilirler.<sup>18</sup> Araştırmalarda kullanılan glutamata benzer toksinlerin amacı, komşu aksona zarar vermeden sinir hücrelerinin gövdelerini yok eden kesin sınırlı lezyonlar oluşturmaktır. Sıçanda amigdalaya ibotenik asit ve kuinolik asit infüzyonunun, nöronlarda sayıca azalmaya ve gliozise sebep olduğu gösterilmiştir.<sup>19,20</sup>

Çalışmamızda ibotenik asit infüzyonunun BLA'da yarattığı örselenme histolojik olarak gösterilmiştir.

### PASİF SAKINMA DÜZENİNDE ANLIK VE UZUN SÜRELİ ŞARTLI KORKU BELLEĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Bazı çalışmalarda, amigdalanın örselenmesinin, sakinme şartlanmasını bozduğu gösterilirken, bazı çalışmalarda bu etki gözlenmemiştir.<sup>16,21</sup> Bu farklılığa birkaç faktör sebep olabilmektedir. Etkileyen faktörlerden biri, lezyonun, öğrenmenin öncesinde ve sonrasında yapılmasıdır.<sup>17</sup> Ayrıca lezyon büyüklüğü ve lezyonun çeşidi de (nörotoksik, elektrolit v.b) önemlidir.<sup>17</sup> Sakınma şartlanması çalışmalarında ölçülen yanıtın çeşitliliği de bu farkın saptanmasında etkili olmuştur. Bazı çalışmalarda şoktan sakınmak için aktif bir davranış (platforma çıkma) gerekirken, bazı çalışmalarda pasif yanıtlar (şok uygulanan bölüme girmeme) ölçülmüştür.<sup>20,22</sup> Pasif sakınma şartlı korku (şok verilen ortamın korkusu) ve operant davranışı (aydınlıktan karanlığa geçişe sebep olan doğal eğilimin değiştirilmesi) ge-

**TABLO 4:** İşaretsiz Pavlov tipi korku şartlanma düzeneğinde 600 saniye süreli anlık korku belleği testinde yalancı lezyon ve BLA lezyon gruplarının davranış ölçütleri.

	Yalancı lezyon	BLA
Donma davranışı (sn)	337,6 ± 25,6	111 ± 26,2**
Temizlenme davranışı (sn)	41 ± 7,4	136 ± 31,8*
Ayağa kalkma davranış sıklığı	10 ± 1	20 ± 3**
Koklama davranış sıklığı	12 ± 2	53 ± 7**

Veriler ortalama ± SH olarak ifade edilmiştir. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ -yalancı lezyon grubuna göre. Davranış süreleri tek yönlü ANOVA, davranış sıklıkları ise  $\chi^2$  testi. Gruplarda N= 10.

BLA: bazolateral amigdala; sn: saniye.

rektirmektedir.<sup>17</sup> Amigdaladaki bütün çekirdekleri kapsayan geniş lezyonların pasif ve aktif sakinme cevabını bozduğu daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir.<sup>23,24</sup>

Pasif sakinme düzeneğinde karanlık bölümde şok uygulanması, aydınlıktan karanlığa geçişe sebep olan doğal eğilimi ve karanlığın daha güvenli algılanmasına neden olan içgüdüsel bilgiyi bozarak sıçanların karanlık bölüme geçişine engel olmaktadır. Sakinme latensi anlık ve uzun süreli korku belleğinin kazanım ve saklama ölçütü olarak kabul edilirken, saklama latensi anımsama ölçütü olarak kabul edilmektedir.<sup>25</sup> Çalışmamızda kontrol grubuna göre BLA lezyonlu sıçanların pasif sakinme düzeneğinde şoktan hemen ve 48 saat sonra şartlı sakinme ve güvenli bölümde daha uzun süre geçirme yanıtları bozulmuştur. Daha önceki çalışmalarda amigdalanın geniş elektrolitik lezyonunun ve amigdalanın çıkartılmasının pasif sakinme testinde sakinme latensini azalttığı gösterilmiştir.<sup>21,26-28</sup> BLA'nın seçici nörotoksik lezyonun da kontrol gruplarına göre sakinme latensini azalttığı Vazdarjanova ve ark.nın<sup>12</sup> çalışmalarında da gösterilmiştir. Ayrıca BLA içerisinde öğrenme öncesi N-Metil D-Aspartik Asit (NMDA) almaç antagonistlerinin uygulanması, platforma çıkma latensi ile ölçülen sakinme anımsamasını bozmuştur.<sup>28,29</sup> Hollahan ve White'in çalışmaları da şartlı sakinme cevabının BLA lezyonlu sıçanlarda korunduğunu göstermektedir.<sup>16</sup>

Pasif sakinme düzeneğinde, düzeneğin aydınlık bölümünde sergilenen donma davranışı ise, çevresel işaretlerin bir bölümüne karşı tetiklenen bilişsel tip korku şartlanmasının ölçütü olarak kabul edilmektedir.<sup>30</sup> Çalışmamızda BLA lezyonlu sıçanların anlık ve uzun süreli bellek testlerinde, düzeneğin aydınlık bölümünde sergiledikleri şartlı donma davranışı azalmıştır. Vazdarjanova ve ark., Y-kollu düzenekte tek bir kolda şok uyguladıktan sonra tüm düzenekte sergilenen donma davranışının BLA lezyonunda bozulduğunu göstermişleridir.<sup>12</sup>

BLA'da NMDA almaçlarının bloke edilmesi, şartlı uyarana<sup>28</sup> ve çevresel uyarılara<sup>31</sup> karşı oluşan korku şartlanmasının kazanımını engellemekte, ancak kazanılmış şartlanmanın ifadesini engelle-

memektedir; bu sonuç, BLA'yı gerektiren korku şartlanmasının kazanımından sonra savunma davranışının ifade edilmesi için BLA'nın şart olmadığını düşündürmektedir. Ancak, bununla ilgili olarak, amigdala giren ve çıkan yollar ve amigdala içerisindeki bağlantılar halen açıklık kazanmamıştır.

Bazı çalışmalar amigdalanın şartlı aversif yanıtların kazanımı ve ifade edilmesinde önemli rol oynadığını ileri sürerken,<sup>32</sup> diğer bir grup çalışma, amigdalanın korku belleğinin depolanması ve güçlendirilmesinde modülatör bir alan olduğunu ileri sürmektedir.<sup>16</sup>

Hollahan ve White, çalışmalarında BLA lezyonunun şartlı sakinme yanıtını etkilemediğini, sadece şartlı donma yanıtını bozduğunu göstermişlerdir ve bulgularını, BLA'nın şartsız uyarın ve şartlı çevrenin ilişkilendirilmesinin kazanımından ve anımsanmasından daha çok, donma cevabının ifadesi ve diğer beyin alanlarının modülasyonu ile ilgili olduğu şeklinde yorumlanmıştır.<sup>16</sup> Ancak bizim çalışmamızda, BLA lezyonlu sıçanlarda sakinme latensi, aydınlıkta geçirilen süre ve donma davranışının azalmış bulunması, BLA lezyonunun pasif sakinme düzeneğinde bilişsel şartlı korku davranışlarının bellekte kazanımını ve saklanmasını bozduğunu göstermektedir. Bulgularımız, Fanselow'un BLA'da korku şartlanmasının duygusal bileşenleri kodladığı ve ilgili sinirsel plastisitenin meydana geldiği ve aynı zamanda bellek ile ilgili diğer beyin alanlarının modülasyonunda amigdalanın işlev gördüğü görüşünü desteklemektedir.<sup>33</sup>

#### İŞARETSİZ PAVLOV TİPİ KORKU ŞARTLANMA DÜZENEGİNDE ANLIK VE UZUN SÜRELİ ŞARTLI KORKU BELLEĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

İşaretsiz Pavlov tipi korku şartlanma düzeneğinde, BLA lezyonunun donma tipi korku, şartsız korkunun bellekte temsili ve çevre arasındaki ilişki üzerine etkisi değerlendirilmiştir.

BLA lezyonu, işaretsiz Pavlov tipi korku şartlanma düzeneğinde şok uygulanan ortamda anlık ve uzun süreli test uygulandığında, şartlı çevresel uyarınların tümüne karşı tetiklenen şartlı donma yanıtını bozmuştur. Bu sonuçlar, BLA lezyonunun affektif tip korku şartlanmasında kazanım ve sak-

lama süreçlerini bozduğunu göstermektedir. Bulgularımız, BLA'nın elektrolitik lezyonunun şok uygulanan ortamda donma davranışını bozduğunu gösteren Hollahan ve White'in çalışması ile uyumludur.<sup>16</sup> Daha önceki çalışmalarda da BLA lezyonunun şartlı çevreye karşı oluşturulan donma davranışını bozduğunu gösterilmiştir.<sup>9,32,34-37</sup>

Yalancı lezyon grubundaki sıçanlar, şok aldıkları ortama tekrar maruz kaldıkları zaman, temizlenme, ayağa kalkma, koklama ve yer değiştirme gibi araştırmacı davranışlar baskılanırken, BLA lezyonlu sıçanların bu davranışları kontrol grubuna göre artmıştır ve bu sıçanlar daha çok araştırmacı davranış içinde bulunmuşlardır.

## SONUÇ

Bu çalışmanın sonuçları, BLA'nın anksiyete/korku davranışları ile ilişkili öğrenme ve bellek işlevlerine katıldığını göstermektedir. Genel olarak BLA'nın şartsız uyaran ve şartlı çevresel uyaran

arasındaki ilişkilendirmenin kazanılması ve anımsanmasına katıldığını, ancak şartsız uyarının dürtüsel yönünü ve kalıtsal anksiyete/korku davranışlarını etkilemediğini ileri sürebiliriz.

Çalışmanın sonuçları, korkunun sinirsel mekanizmalarının aydınlatılmasına yardımcı olarak, fobi, kaygı, travma sonrası stres bozukluğu ve panik atak gibi hastalıkların mekanizmalarının öğrenilebilmesine ve yeni tedavi yaklaşımlarının geliştirilebilmesine katkıda bulunabilir.

## Teşekkür

Çukurova Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Nörofizyoloji Bilim Dalında gerçekleştirilen bu çalışma TÜBİTAK [SBAG-AYD-379 (101S255)], Çukurova Üniversitesi Araştırma Fonu (TF2002 LTP63) ve Beyin Araştırmaları Derneğinin AVENTİS proje destek ödülü ile desteklenmiştir.

Histolojik bulguların değerlendirilmesinde gösterdikleri katkılarından dolayı Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji bölümüne teşekkürlerimizi sunarız.

## KAYNAKLAR

- Davis M. The role of the amygdala in fear and anxiety. *Annu Rev Neurosci* 1992;15:353-75.
- LeDoux JE. Emotional memory sistem in the brain. *Behav Brain Res* 1993;58(1-2):69-79.
- Melikov EM, Baïramova EO. [The monoaminergic control of amygdaloid nuclei of the reinforcing action of conditioned stimuli]. *Zh Vyssh Nerv Deiat Im I P Pavlova* 1994;44(2):254-60.
- Adolphs R, Tranel D, Damasio H, Damasio AR. Fear and the human amygdala. *J Neurosci* 1995;15(9):5879-91.
- Zald DH. The human amygdala and the emotional evaluation of sensory stimuli. *Brain Res Brain Res Rev* 2003;41(1):88-123.
- Zald DH, Lee JT, Fluegel KW, Pardo JV. Aversive gustatory stimulation activates limbic circuits in humans. *Brain* 1998;121(Pt 6):1143-54.
- LeDoux JE. Emotion: clues from the brain. *Annu Rev Psychol* 1995;46:209-35.
- Pessoa L. Emotion and cognition and the amygdala: from "what is it?" to "what's to be done?". *Neuropsychologia* 2010;48(12):3416-29.
- LeDoux JE. Emotion circuitis in the brain. *Ann Rev Neurosci* 2000;23(3):155-84.
- Bear MF, Connors BW, Paradiso MA. Neuroscience: past, present and future. In: Williams PC, ed. *Neuroscience Exploring in the Brain*. 3<sup>rd</sup> ed. Philadelphia: Williams & Wilkins A Waverly Company; 2007. p 100-5.
- Dönder E, Özkan Y, Dağ S, Baydaş G. [The effect of experimentally induced hypothyroidism on neural plasticity and memory at first, second and third trimester of pregnancy]. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 2010;30(5):1524-32.
- Vazdarjanova A, McGaugh JL. Basolateral amygdala is not critical for cognitive memory of contextual fear conditioning. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95(25):15003-7.
- File SE, Gonzalez LE. Anxiolytic effects in the plus-maze of 5-HT<sub>1A</sub>-receptor ligands in dorsal raphe and ventral hippocampus. *Pharmacol Biochem Behav* 1996;54(1):123-8.
- Paxinos G, Watson C. *Amygdala. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 2nd ed. San Diego: Academic Press Inc; 1986. p.110.
- Fanselow MS. Conditional and unconditional components of post-shock freezing. *Pavlov J Biol Sci* 1980;15(4):177-82.
- Hollahan MR, White NM. Conditioned memory modulation, freezing, and avoidance as measures of amygdala-mediated conditioned fear. *Neurobiol Learn Mem* 2002;77(2):250-75.
- Morris JS, Friston KJ, Büchel C, Frith CD, Young AW, Calder AJ, et al. A neuromodulatory role for the human amygdala in processing emotional facial expressions. *Brain* 1998;121(Pt 1):47-57.
- Ganong WF. [Neural basis of instinctual behavior and emotions]. *Translator ed: Özgünen T. Tıbbi Fizyoloji*. 20<sup>th</sup> ed. Adana: Nobel Publisher; 2002. p.249.
- Daenen EW, Wolterink G, Gerrits MA, Van Ree JM. Amygdala or ventral hippocampal lesions at two early stages of life differentially affect open field behaviour later in life; an animal model of neurodevelopmental psychopathological disorders. *Behav Brain Res* 2002;131(1-2):67-78.
- Selden NR, Everitt BJ, Jarrard LE, Robbins TW. Complementary roles for the amygdala and hippocampus in aversive conditioning to explicit and contextual cues. *Neuroscience* 1991;42(2):335-50.
- Decker MW, Curzon P, Brioni JD. Influence of separate and combined septal and amygdala lesions on memory, acoustic startle, anxiety, and locomotor activity in rats. *Neurobiol Learn Mem* 1995;64(2):156-68.



22. Roesler R, Vianna MR, de-Paris F, Rodrigues C, Sant'Anna MK, Quevedo J, et al. NMDA receptor antagonism in the basolateral amygdala blocks enhancement of inhibitory avoidance learning in previously trained rats. *Behav Brain Res* 2000;112(1-2):99-105.
23. Sarter M, Markowitsch HJ. Involvement of the amygdala in learning and memory: a critical review, with emphasis on anatomical relations. *Behav Neurosci* 1985;99(2):342-80.
24. Kim M, Davis M. Lack of a temporal gradient of retrograde amnesia in rats with amygdala lesions assessed with the fear-potentiated startle paradigm. *Behav Neurosci* 1993; 107(6):1088-92.
25. Babar E, Melik E, Ozgüven T, Polat S. Effects of excitotoxic median raphe lesion on working memory deficits produced by the dorsal hippocampal muscarinic receptor blockade in the inhibitory avoidance in rats. *Brain Res Bull* 2002;57(5):683-8.
26. Grossman SP, Grossman L, Walsh L. Functional organization of the rat amygdala with respect to avoidance behavior. *J Comp Physiol Psychol* 1975;88(2):829-50.
27. Liang KC, McGaugh JL, Martinez JL Jr, Jensen RA, Vasquez BJ, Messing RB. Post-training amygdaloid lesions impair retention of an inhibitory avoidance response. *Behav Brain Res* 1982;4(3):237-49.
28. Miserendino MJ, Sananes CB, Melia KR, Davis M. Blocking of acquisition but not expression of conditioned fear-potentiated startle by NMDA antagonists in the amygdala. *Nature* 1990;345(6277):716-8.
29. Roesler R, Vianna MR, de-Paris F, Rodrigues C, Sant'Anna MK, Quevedo J, et al. NMDA receptor antagonism in the basolateral amygdala blocks enhancement of inhibitory avoidance learning in previously trained rats. *Behav Brain Res* 2000;112(1-2): 99-105.
30. Melik E, Babar-Melik E, Ozgüven T, Binokay S. Median raphe nucleus mediates forming long-term but not short-term contextual fear conditioning in rats. *Behav Brain Res* 2000;112(1-2):145-50.
31. Kim JJ, Rison RA, Fanselow MS. Effects of amygdala, hippocampus, and periaqueductal gray lesions on short- and long-term contextual fear. *Behav Neurosci* 1993;107(6): 1093-8.
32. Fendt M, Fanselow MS. The neuroanatomical and neurochemical basis of conditioned fear. *Neurosci Biobehav Rev* 1999;23(5):743-60.
33. Fanselow MS, LeDoux JE. Why we think plasticity underlying Pavlovian fear conditioning occurs in the basolateral amygdala. *Neuron* 1999;23(2):229-32.
34. Cahill L, Weinberger NM, Roozendaal B, McGaugh JL. Is the amygdala a locus of "conditioned fear"? Some questions and caveats. *Neuron* 1999;23(2):227-8.
35. Maren S. Long-term potentiation in the amygdala: a mechanism for emotional learning and memory. *Trends Neurosci* 1999;22(12):561-7.
36. Amoranpanth P, LeDoux JE, Nader K. Different lateral amygdala outputs mediate reactions and actions elicited by a fear-arousing stimulus. *Nat Neurosci* 2000;3(1):74-9.
37. Lee H, Kim JJ. Amygdalar NMDA receptors are critical for new fear learning in previously fear-conditioned rats. *J Neurosci* 1998;18(20): 8444-54.