

40774.

T. C.
GENELKURMAY BAŐKANLIĐI
GÜLHANE ASKERİ TIP AKADEMİSİ
ASKERİ TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ FARMAKOLOĞİ ANABİLİM DALI
BAŐKANLIĐI

**BENZODİAZEPİN ANTAGONİSTİ FLUMAZENİLİN
SHUTTLE-BOX YÖNTEMİ İLE
SIÇANLARDA ÖĞRENME VE BELLEK ÜZERİNE ETKİLERİ**

DOKTORA TEZİ

Turgay ÇELİK
Tbp. Yzb.

DANIŞMAN
Doç. Ecz. Gönen DENİZ

T.C. YENİ YÜZYIL KÜTÜPHANESİ
DOKÜMANLARI KİTAPHAZİNİ

ANKARA – 1995

ÖNSÖZ

Bu tez konusu Gülhane Askeri Tıp Akademisi ve Askeri Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Başkanlığının 29 Kasım 1993 gün ve Tıbbi Farmakoloji:0530-29-93/92 sayılı emriyle bildirilmiş ve çalışılmaya başlanmıştır.

Bu çalışma, sıçanlarda elektrokonvülsiv-şok ve benzodiazepin tedavisi sırasında oluşan öğrenme ve bellek bozukluklarına benzer deneysel modeller oluşturularak, yeni bir benzodiazepin antagonisti olan Flumazenilin öğrenme ve bellek üzerine etkilerinin araştırılması amacıyla planlanmıştır.

Bu konuda çalışma olanağı veren ve yardımlarını esirgemiyen Anabilim dalı başkanımız Prof. Dr. M. Ali GÜNDOĞAN'a ve doktora eğitimimin her aşamasında çalışmalarına yön veren danışman hocam Doç. Dr. Gönen DENİZ'e, çalışmalarım süresince ilgi ve yardımlarını esirgemiyen hocam Prof. Dr. İ. Hakkı AYHAN'a ve ayrıca tezin istatistiksel değerlendirilmesinde katkılarından dolayı Doç. Dr. Ongun ONARAN'a teşekkür ederim.

Dr. Turgay ÇELİK

HAZİRAN 1995, ANKARA

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No.
I - GİRİŞ.....	1
II - GENEL BİLGİLER.....	4
A - Öğrenme ve Bellek.....	4
B - Öğrenmenin Nöroanatomi.....	6
C - Öğrenmenin Biyolojik Temeli.....	7
D - Öğrenme ve Bellek Modelleri.....	8
E - GABA _A Receptor-İyon Kanal Kompleksi	9
F - Benzodiazepin Reseptörleri	10
G - Benzodiazepin Reseptör Ligandları ile GABA'erjik Transmisyonun Düzenlenmesi.....	11
H - Benzodiazepinlerin Öğrenme ve Belleğe Etkileri.....	12
I - Elektrokonvülsiv Şokun Öğrenme ve Bellek Üzerine Etkileri.....	12
J - GABA, Benzodiazepinler ve Lokomasyon.....	13
K - Çalışmada Kullanılan İlaçlar Hakkında Kısa Bilgiler.....	14
III - GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	16
A - Gereçler	16
1 - Laboratuvar	16
2 - Deneysel hayvanlar	16
3 - Kullanılan Maddeler.....	16
4 - Kullanılan aletler.....	16
5 - Deneysel grupları	20
6 - Madde uygulamaları ve deneysel yöntemleri.....	20
B - Yöntemler.....	21
1 - Koşullu sakınma cevabının kazandırılması (acquisition) ve koşullu kaçma cevabı.....	21
2 - Lokomotor aktivite ölçüm işlemleri	23
3 - Elektro-konvülsif şok uygulama işlemleri.....	23
4 - İstatistiksel değerlendirme.....	23
IV - BULGULAR.....	24
A - Diazepam ve Flumazenilin Koşullu Sakınma Cevabına (acquisition) etkileri.....	24

	Sayfa No.
B - Diazepam ve Flumazenilin Koşullu Kaçma Cevabına etkileri.....	27
C - Diazepamın Horizontal, Vertikal ve Amblatuvar lokomotor aktivitelere etkisi	30
D - Diazepamın farklı dozları ile birlikte verilen flumazenilin lokomotor aktivite cevaplarına etkisi.....	33
E - Elektro-konvülsiv şok verilen sıçanlarda, Flumazenilin Koşullu Sakınma Cevabına etkileri.....	36
F - Diazepamın farklı dozları ile birlikte verilen Flumazenilin (10mg/kg) lokomotor aktivite cevaplarına etki.....	33
V- TARTIŞMA	42
A - Flumazenilin koşullu sakınma ve kaçma cevapları (acquisition) üzerine etkileri.....	42
B - Diazepam ve flumazenilin lokomotor aktivite üzerine etkileri.....	44
C - Elektro-konvülsiv şok verilen sıçanlarda flumazenilin koşullu sakınma ve kaçma cevaplarına etkileri	45
VI-ÖZET.....	47
VII-SUMMARY.....	48
VIII-KAYNAKLAR.....	49

ÖZEL TERİMLER

Acquisition (kazanma): Öğrenme ile sinonim olup öğrenme deneyimleri veya eğitim dönemi sırasında oluşan ve özel işlemler sonunda belleğe dahil edilecek bilginin beyine girmesidir.

Active Avoidance (sakınma) : Ağrı gibi ızdırap verici veya hoş olmayan bir stimulustan özel bir cevap vererek çekinme veya sakınma yapılmasının öğrenilmesidir.

Passive avoidance (pasif veya inhibitör sakınma) : Genellikle bir eğitim döneminde (trial) kazanılabilen ve daha çok bellek deneylerinde kullanılan ızdırap verici veya hoş olmayan stimulustan özel bir cevap yapmıyarak veya kendini tutarak sakınmadır.

Habituation (alışma) : En ilkel öğrenme şekli olup belirli bir zaman periyodunda fazla tekrarlanarak verilen stimulus veya stimulus gruplarına ürkme, korkma veya araştırma (exploring) gibi cevap davranışlarda azalma oluşması veya bu stimuluslara alışma olmasıdır.

Escape (kaçma) : Izdırap verici bir stimulustan kurtulmak için stimulus geldikten sonra verilen özel bir cevaptır.

Consolidation (pekiştirme) : Kazanmanın hemen sonrasında bilgilerin bazılarının depolanmasına yönelik , mekanizması bilinmeyen işlemlerdir.oluşan

Pre-training treatments (eğitim öncesi tedavi) : Eğitim döneminden önce verilen ve kazanma ile pekiştiri işlemlerini etkileyen tedavi şekli.

Post-training treatments (eğitim sonrası tedavi) : Kazanmadan hemen veya sonra verilen ve pekiştiri ve belleği etkileyen tedavi şekli

I - GİRİŞ

Benzodiazepinlerin anksiyolitik, antikonvülsan ve kas gevşetici etkileri yanında, ataksi ve amnezi oluşturuvcu yan etkileri de bilinmektedir. Amnezik etkileri diazepamın anestezi premedikasyonunda kullanımı sırasında, ilk defa anesteziistler tarafından bulunmuştur (17,23,47,98). Benzodiazepinlerin amnezik yan etkileri hem pratik yönden hem de teorik yönden birçok araştırmanın ilgi odağı olmuştur. Pratik açıdan bakıldığında ilacı kullanan insanların büyük bir kısmının bellek kaybı ile karşı karşıya kalması klinisyenleri bu yönde araştırmalara yöneltmiştir. Çünkü, Avrupa ile Amerika'da her 5 yetişkin kadından ve her 10 yetişkin erkekten birinin, benzodiazepin türevi bir anksiyolitik ilaç kullanması bu çalışmaların önemini daha da artırmıştır (26). Teorik açıdan bakıldığında ise, Öğrenme ve Bellek ile normal kognitif fonksiyonların (anlayış, idrak, kavrama, gibi) mekanizmalarının anlaşılmasına yönelik çalışmalara da katkıda bulunmuştur (8, 88)

Son on yıldır kognitif fonksiyonlarla ilgili çalışmalarda, Alzheimer gibi bir takım nöropsikiyatrik hastalıkların patofizyolojisi altında yatan nedenin beyin kolinerjik sistemindeki aktivite kaybı olması, dikkati bu alana çevirmiştir. Bu hastaların beyin biyopsi ve otopsi bulgularından elde edilen sonuçlar, kortikal kolin asetilaz aktivitesinin azaldığını; beyin sapında, septumda, serebral ve hipokampal alanlarda kolinerjik nöron kayıpları bulunduğunu göstermiştir (143). Alzheimer teşhisi konmuş hastalardaki kolinerjik bozukluğa ait bulguların, kognitif bozukluğun derecesi ile ilgili olduğu görülmüştür (103). Yine sıçanlarda kronik alkol alımına bağlı olarak oluşturulan bellek bozukluklarının, kolinerjik yönden zengin fetal beyin hücre suspansiyonu transplante edilmek suretiyle ortadan kaldırılması (4) kognitif fonksiyonlarda kolinerjik mekanizmaların önemini ortaya çıkarmıştır. Kolinerjik sistemin öğrenme ve bellek üzerindeki rolüne yönelik araştırmalar, insanlarda ve hayvanlarda geniş bir şekilde hala devam etmektedir (10,70).

Santral kolinerjik aktivitenin artırılmasıyla kognitif bozuklukların düzelebileceği fikrinden hareket ile ileri sürülen, "kolinerjik hipotez" üzerine pek çok araştırma yapılmıştır (10,137). Örneğin betanekol, arekolin gibi muskarinik reseptör agonistleri çok az düzelle yaparken, fizostigmin gibi kolinesteraz inhibitörlerinin daha belirgin düzelle yaptığı görülmüştür. Ancak bu tür kolinomimetiklere ait yan etkiler (abdominal kramp, Parkinson sendromu, tremor, depresyon gibi) bunların klinik kullanıma girmesini engellemektedir (10, 18, 120, 137).

Beyindeki asetilkolin sentezini veya kolinerjik aktiviteyi artırmak için bir diğer yaklaşım ise ilave kolin (veya kolin prekürsörü) kullanımudur (24,48). İlave kolinin (kolin, fosfatidilkolin) akut ve kronik verilmesi ile yapılan deneysel çalışmalarda normal deneklerde pozitif bulgular sınırlı olmasına rağmen, kolinerjik aktivitesi düşük hastalardaki klinik bulgular olumlu yöndedir (140).

Bugün gerek kognitif bozukluklarla seyreden hastalıkların tedavisi için, gerekse kognitif fonksiyonlara ait mekanizmaların anlaşılması için bir çok araştırma yapılmasına ve pek çok bulgu yayınlanmasına rağmen, bu konuda henüz bir referans bileşiğın bulunmaması (51), benzodiazepin gibi maddelerin ve elektrokonvülf terapinin amnezik etkisi nedeniyle kognitif olaylara farklı yaklaşımlar da getirilmiştir..

Benzodiazepinlerin öğrenme ve bellek üzerinde deprese edici etkilerini 1961 de, ilk defa Mc Connel ve Randall göstermiştir (49,111). Diazepam başta olmak üzere benzodiazepinlerin bazı tipleri, insan ve hayvanlara yönelik kognitif çalışmalarda, amnezi modeli oluşturmak amacıyla da kullanılmıştır (104,118,139). Bugün öğrenme ve bellek ile ilgili araştırmalarda kullanılmak üzere normal deneklere santral etkili farklı ilaçlar verilerek, insan öğrenme ve bellek bozukluklarına benzeyen modeller geliştirilmiştir (142). Alzheimerli hastalarda gözlenen bozukluklara benzer amnezi modeli, antikolinerjik bir ilaç olan skopolamin ile oluşturulmuştur. Benzodiazepinlerle oluşturulan amnezi modelleri genelde Korsakofflu hastaların amnezisine benzemekle birlikte (27), skopolamin ve benzodiazepinlerle yapılan karşılaştırmalı çalışmalarda aralarında bir fark bulunamamıştır (38, 61, 113). Bu iki ilaç amnezi oluşturması yanında, hem insanlarda (7, 101) hem de hayvanlarda (39) öğrenme bozukluğu yapmaktadır.

Bazı depresyon tiplerinin tedavisinde etkin rol oynadığı bilinen elektrokonvülf terapinin de insanlarda amnezi oluşturduğu uzun süredir bilinmektedir (76). Aynı prensiplerle, deney hayvanlarında da Elektrokonvülf Şok (ECS) ile amnezi modelleri oluşturulmuştur (85,128). Bu tip amnezi modellerinin de santral kolinerjik sistemle ilgili olduğu ileri sürülmüştür (69). Bunun için ECS'ye bağlı amnezi modelleri de, günümüzde Alzheimer'e yönelik çalışmalarda kullanılmaktadır (46). Ancak, ECS ile beyine ait bir çok sistem etkilendiğinden kognitif fonksiyonlara ait bilgiler çok açık değildir (26,29,67).

Otuz yıldır trankilizan ve uyku ilacı olarak kullanılan benzodiazepinlerin gelişim süreci oldukça yavaş olmuştur. Çünkü bu tür ilaçların farmakolojik etkileri,

ilk defa 1958 de klordiazepoksit ile ortaya konmasına rağmen, etki mekanizmaları uzun süre anlaşılamamıştır. Gelişmeler, benzodiazepinlerin santral etkilerinin GABA ile ilişkili olduğunun 1975 de gösterilmesi ile başlamıştır (43). Bundan iki yıl sonra, Möhler ve arkadaşları, benzodiazepinlerin, Cl⁻ kanalı ile kenetli supramoleküler bir kompleks olan GABA_A reseptörü üzerindeki, yüksek afiniteli ve stereospesifik bağlanma yerlerini göstererek benzodiazepin reseptörlerini tanımlamışlardır (91). Benzodiazepin reseptörlerinin keşfinden sonra, aynı reseptörün endojen ligandları da ortaya çıkarılmıştır (27). Son yıllarda, farklı behevoral etkiler gösteren birçok benzodiazepin türevi veya benzodiazepin olmayan endojen ve ekzojen bileşikler bulunmuştur (36,44).

Kognitif olaylarda kolinerjik yaklaşım dışında yeni bir alternatif yaklaşım getiren Flumazenil (RO 15-1788), benzodiazepin reseptörlerine daha yüksek afinite gösteren yeni bir benzodiazepinin keşfine yönelik çalışmalarda, tesadüfen bulunmuştur. İlk defa 1981 de, F.Hoffmann-La Roche laboratuvarlarında çalışan bir araştırma gurubu, imidazodiazepin yapısında (ethyl 8-fluoro-5,6-dihydro-5-methyl-6-oxo-4H-imidazo[1,5-a][1,4]-bezodiazepine-3-carboxylate), potent ve spesifik bir benzodiazepin reseptör ligandı olan flumazenili tanımladılar (45). Bileşiğin yalnız başına farmakolojik etkilerinin bulunmadığını, ancak benzodiazepinlerin elektrofizyolojik ve behevoral etkilerini antagonize ettiğini bildirdiler (53).

Bunun yanında son yıllarda yapılan bazı çalışmalar da ise, flumazenilin öğrenme ve bellek fonksiyonları üzerinde pozitif etkili olduğu bildirildi (64, 65). Ancak bu ilacın öğrenme ve bellek fonksiyonları üzerindeki pozitif etkileri çok açık değildir . Yapılan araştırmalar daha çok bellek ile ilgili olmasına rağmen, ilacın pozitif etkisinin öğrenmeye mi, belleğe mi yönelik olduğunu gösterir kesin bir bilgi yoktur (64,65,102,109). Bu nedenle çalışmamızda, flumazenilin özellikle öğrenme fonksiyonu üzerine olan etkilerinin araştırılmasının, bu konudaki çalışmalara önemli bir katkı sağlayacağı düşünülmüştür.

Çalışmanın ilk bölümünde, amnezik yan tesirlerine hala çözüm bulunamamış olan elektrokonvülf terapi ve benzodiazepin kullanımı gibi klinik uygulamalara benzeyen deneysel bir model oluşturulmuştur. İkinci bölümünde ise, sıçanlarda oluşturulan bu deneysel modellerde, yeni bir benzodiazepin antagonisti olan Flumazenilin öğrenme ve öğrenmeyi etkileyebilecek davranışlar üzerine etkisi araştırılmıştır .

II - GENEL BİLGİLER

A - Öğrenme ve Bellek

Öğrenme ve belleğin tam bir tanımını yapmak zor olmakla beraber, öğrenmeyi yaşama ait bilgilerin kazanılma işlemi, belleği de bu bilgilerin saklanması veya korunması olarak tarif edebiliriz. Aslında öğrenme, çevresel değişikliklerin oluşturduğu bir davranış değişikliği işlemidir. Bu davranış değişikliği belli bir davranışın yokluğunda oluşur. Oluşan bu davranış değişikliği, organizmaya ait basit bir davranış şeklinde olmayıp, öğrenmeyle beyinde oluşan tüm değişiklikleri de yansıtır. Öğrenme ve belleğin tanımındaki zorluk, bunların ölçülemiyen ve gözlenemeyen işlemler olmalarından kaynaklanır (50). Ölçülebilen unsurlar, sadece öğrenme ve bellek ile oluşturulmuş davranış değişiklikleridir. Dikkat, uyanıklık, duyuşal kapasite ve motivasyona bağılı davranış değişiklikleri öğrenme kabul edilmez, ancak bunlar öğrenme ile oluşan davranış değişikliğini etkileyebileceğinden bu konuda yapılacak araştırmalarda göz önünde bulundurulmalıdır (80).

Öğrenme ve bellek genel olarak iki şekilde sınıflandırılır (tablo-1). İlki deneysel yöntemlere dayanan sınıflandırmadır. Alternatif olan diğeri sınıflandırma ise öğrenilmiş bilginin tipine, bilginin saklanmasına veya hatırlanmasına dayanan sınıflandırmadır ki genelde belleğe yöneliktir. Deneysel yöntemlere dayalı sınıflandırmada iki öğrenme tipi mevcuttur. Bunlardan biri, Bağıntılı Olmayan Öğrenme (Non-associative learning) olup tek tip bir stimulusun tekrarlanarak veya bir defa uygulanması ile oluşur. Bunun da Alışma (Habituation) ve duyarlanma (Sensitisation) şeklinde iki temel formu vardır (50).

Diğeri ise bağıntılı öğrenme (Associative learning) olup bir stimulus ile bir başka stimulus arasındaki ilişkinin öğrenilmesine veya bir stimulus ile cevabın ilişkisinin öğrenilmesine dayanır. Koşullu öğrenme de denilen bu tür öğrenmenin ise, "Klasik Koşullandırma" ve "Enstrümental veya Operant Koşullandırma" formları vardır (124).

"Klasik koşullandırma" veya "Pavlov Koşullandırması" denilen koşullu öğrenme testlerinin bu tipi, ses ışık gibi nötral bir stimulus ile hoş olmayan (koşulsuz) bir stimulus çiftinin eşleştirilmesine veya ilişkisinin tahminine dayanır. Burada amaç koşulsuz stimulus ile koşullu bir cevap oluşturmaktır (120).

Tablo 1- Deneysel Yöntemlere Dayanan Öğrenme Tipleri

I-Bağıntılı Olmayan Öğrenme (Non associative Learning) Alışma (Habituation) Duyarlanma (sensitisation)
II-Bağıntılı Öğrenme (Associative Learning) A-Klasik Koşullandırma (Pavlov) B-Enstrümental koşullandırma (Operant) a-Aktif Sakınma (Active Avoidance) b-Pasif Sakınma (Passive or Inhibitor Avoidance) Step-down Step-Through

Operant koşullandırmada ise, yine nötral bir stimulus ile, oluşan cevap arasındaki ilişkinin tahminine dayanır. Buradaki amaç ise koşullu stimuluslar ile koşullu bir cevap oluşturmaktır.

Operant koşullandırma testlerinin en çok kullanılan iki şekli vardır. İnhibitör sakınma (pasif sakınma) tipinde deneğe, ses ve ışık gibi nötral bir stimulus ile koşulsuz stimulusa karşı sakınılma öğretilir veya kazandırılır. Pasif sakınma testlerinin en çok kullanılan tipleri Step-Down ve Step-Through adlı modelleridir. Step-Down tipinde, belli bir süre için hayvan küçük prizma şeklindeki basamaktan inmemeye koşullandırılır. Step-Through tipinde ise aydınlık bölümden karanlık bölüme geçmemeye koşullandırılır. Koşullanma oluşmazsa ayak şoku ile cezalandırılır (105).

Operant koşullandırmanın "Aktif sakınma" veya "koşullu sakınma" tipinde ise, deneğe nötral bir koşullandırıcı stimulus ile, koşulsuz stimulusdan sakınması öğretilir ya da kazandırılır. Burada koşullandırıcı stimulus ile şok gibi koşulsuz stimulusdan vereceği özel bir cevap ile kurtulabilir Bu testler mekik kutusu (shuttle-box) denilen bir cihaz ile yapılır. Literatürde, ilk defa 1931 de sıçanlar için tanımlanan bu cihazın, bugün insanlar için de kullanılabilecek bir modelinin oluşturulmasına çalışılmaktadır (63).

Farklı stimulus ve cevap ilişkisi içeren Klasik Koşullandırma ve Operant Koşullandırma arasında yüzeysel bir benzerlik olmasına rağmen, iki öğrenme şekli birbirinden farklıdır. Ancak bu iki öğrenme şeklinin de altında aynı mekanizmalar olduğu düşünülmektedir (80).

Bağıntılı öğrenme, Bağıntılı olmayan öğrenmeden daha kompleks bir öğrenme formudur. Denek tek bir stimulusun özelliklerini değil, iki stimulus arasındaki ilişkiyi ve bağıntıyı öğrenir. Başlangıçta zayıf ve etkisiz olan nötral bir stimulus, kuvvetli bir koşulsuz stimulus ile eşleştikten veya aralarında bağıntı kurulduktan sonra cevap oluşturmada oldukça etkin hale gelir. Bağıntılı olmayan öğrenmenin aksine, Bağıntılı öğrenmede zaman çok önemlidir ve koşullandırıcı stimulus, koşulsuz stimulusdan önce gelmelidir.

Şok ile önce duyuşal nöronların uyarılır. Bu uyarı duyuşal nöronların presnaptik terminalleri ile snaps yapan, bir grup kolaylaştırıcı internöronların da dolaylı olarak eksite olmasını sağlar Bu kolaylaştırıcı nöronların, duyuşal nörondaki ikincil ulak cAMP yi artırması ile, duyuşal nörondan bazılarının serotonerjik olduğu bir takım transmitterlerin salıverilmesini artırır.

B - Öğrenmenin Nöroanatomi

Hipokampus, internal ve eksternal çevreye ait fonksiyonlar kadar lokomasyon, emosyon, dikkat, öğrenme ve bellek gibi bazı davranışsal fonksiyonlarla da ilgili bir yapıdır. Bu sebeple hipokampus GABA, asetilkolin, serotonin, dopamin, norepinefrin gibi daha birçok nörotransmitterler ve nöroaktif maddeler de içerir.

İnsanlarda ve hayvanlarda yapılan araştırmalar, öğrenmenin hipokampusle ilgili olduğunu göstermektedir (75,114,133). Normal bir hipokampusun, iki uyarı arasındaki ilişkiye yönelik bilginin kullanıldığı işlevde görevli olduğu düşünülüyor (131). Hipokampus defisitli sıçan modelleri ile yapılan çalışmalarda koşullu davranışın bozulduğu gösterilmiştir (15,16,132).

Subikulumdan hipokampusun CA1 bölgesine uzanan üç tane büyük eksitator yolak vardır. Birincisi perforant yolak olup subikulumdan, dentat girusun hilusundaki granül hücrelere uzanır. Bu granüler hücrelerin aksonları demet halinde, hipokampusun CA3 bölgesindeki piramidal hücrelere uzanarak ikinci yolağı

oluşturur.. Son olarak da CA3 deki bu piramidal hücreler, Schaeffer kollateralleri adı altında CA1deki piramidal hücrelere eksitator kolateraller gönderir. Bu üç yolaktan birisi ile hipokampusu bir uyarı gelirse, postsnaptik hipokampal nöronlardaki eksitator postsnaptik potansiyellerde bir artış olur. Buna "Long-term potentiation" (LTP) denir (60,75).

Koşullandırıcı ve koşulsuz stimulus içeren iki stimulusun ayırımına dayanan öğrenme ve bellek testlerinde amigdalanın da etkin rol oynadığını gösteren çalışmalar mevcuttur (77,85,116).

C - Öğrenmenin Biyolojik Temeli

Öğrenme ve bellek bozukluğu genelde iki şekilde olur (62).

1-Sinaptik transmisyonunda hızlı ve geçici değişiklikler,

2-Protein sentezi gerektiren hücresel yapı ve fonksiyonlarda yavaş ve uzun süreli değişiklikler,

Bu olayların moleküler temeli ise, LTP üzerinde odaklanmıştır. Kısaca elektriksel stimülasyonun yüksek frekanslı boşalımı, sinaptik aktivitede, bir saatten bir haftaya kadar sürebilen değişiklikler oluşturabilir (9).

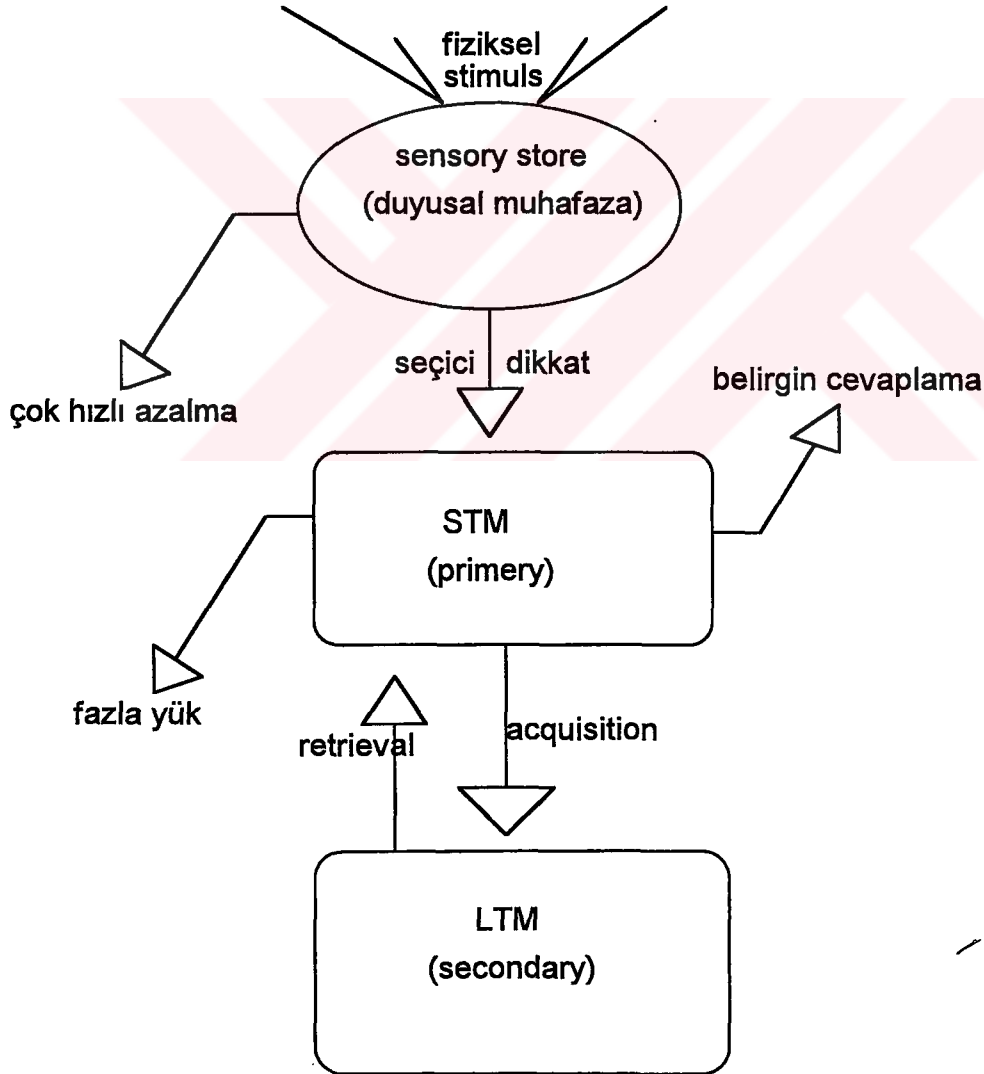
NMDA (N-metil-D-aspartat) reseptörleri glutamat reseptörlerinin bir alt gurubu olup LTP oluşumunda önemli bir rol oynama olasılığı yüksektir (95). Bu reseptörlerin aktivasyonu, iyon kanallarını açarak nöron içine doğru kalsiyum akımı oluşmasını sağlar (9). Hücre içi kalsiyum artışı, protein fosforilasyonu gibi kalsiyuma bağlı bir takım fizyolojik süreçleri aktive eder. Neticede hücresel yapı ve fonksiyonlarda değişikliklere yol açar. NMDA antagonistleri ile yapılan bazı çalışmalarda öğrenmenin bozulduğunun görülmesi NMDA reseptörlerinin öğrenmedeki rolünü pekiştirmiştir (95). Ancak bazı NMDA agonistleri ile öğrenmenin bozulduğunu gösteren çalışmalar da mevcuttur (9).

Bu nörofizyolojik durum GABA aracılığı ile benzodiazepinlere de bağlıdır. GABA, santral sinir sisteminin en önemli inhibitör nörotransmitteri olup GABA_A receptor-iyon kanal kompleksi üzerindeki klorür kanalları aracılığı ile etki oluşturur. Benzodiazepinler ise, GABA aracılığı ile klorür kanallarını açarak membran klorür kondüktansını artırır. Bu olayda nöronal membranda hiperpolarizasyona yol açarak membranın düşük uyarılabilirliğine neden olur (145). Bir takım değerli araştırmaların, GABA_A agonistlerinin düşük dozda LTP 'yi fasilite ettiğini göstermesi, LTP 'nin devamlılığında NMDA ve GABA_A reseptörlerinin fonksiyonel olarak kenetli

olduğunu da ortaya çıkarmıştır (5,141). Bu çalışmalar aynı zamanda GABA 'nın yanında benzodiazepinlerin de öğrenme ve belleğe etki edebileceğini göstermiştir.

D - Öğrenme ve Bellek Modelleri

Normal öğrenme ve bellek işlemleri, oldukça karmaşık bir fenomen olarak değerlendirilir. Bu sebeple araştırmacılar, sonuçların daha kolay ve anlaşılır şekilde yorumlanması için birçok modeller geliştirmiştir.



Şekil 1- Bilgi işleme ve belleğin "Multimodal" modeli

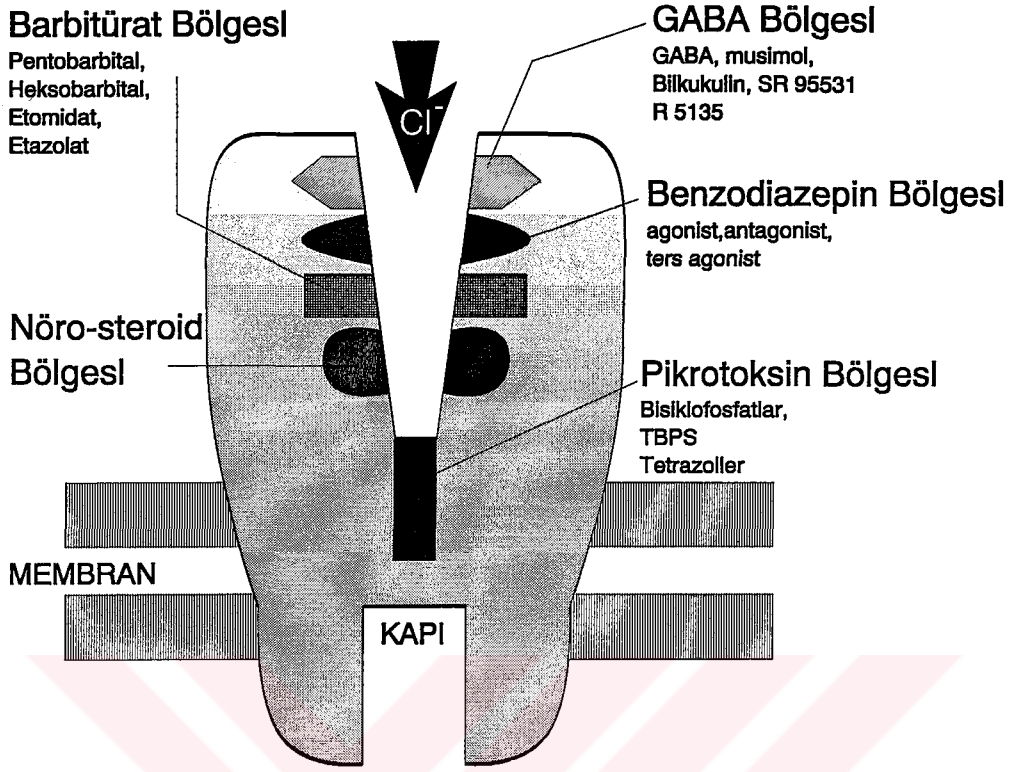
Bilgi işleme ve bellek modelleri içinde son yıllarda en çok kullanılan "Multimodal" adı verilen modeldir (Şekil 1). Daha çok insan öğrenme ve belleğini tanıtan model ise "Multistore" adı verilen modeldir (9). Bu modele göre öğrenme ve bellek olayları şu şekilde sıralanır. Duyusal olarak gelen bilgi, ilk olarak bilinçlenme öncesinde tutulur ve geçici olarak muhafaza edilir. Hiç bir bilgi kaybolmadan hızlı bir şekilde milisaniye içerisinde kısa süreli (short-term memory, primary) belleğe gönderilir. Kısa süreli bellek dönemi bilinçli olup 10-20sn sürer (9).

Bilgi hatırlanması için, kısa süreli bellekten, uzun süreli belleğe (long-term memory, secondary) belleğe gönderilir. Kazanma (Acquisition), birikim (retention) ve çağrışım (retrieval) denilen olaylar kısa süreli bellek dönemi ile uzun süreli bellek dönemi arasındadır. Öğrenme ve bellek testleri ile bu olaylar değerlendirilmektedir (19).

E - GABA_A Receptor-İyon Kanal Kompleksi

Santral sinir sisteminde inhibitör bir nörotransmitter olarak kabul edilen GABA (γ -aminobütirik asit), GABA_A, GABA_B ve GABA_C reseptörlerini aktive eder. GABA_B, G-proteine kenetli bir reseptör iken GABA_A reseptör, iyon kanalları ile kenetlidir. GABA_A receptor-kanal kompleksi, aynı moleküler kompleks üzerinde hem GABA, hem de benzodiazepin gibi diğer allosterik modülatörler için bağlanma bölgeleri bulunduran heteroligomerik yapıda, klorür kanalları ile kenetli bir yapıdır (Şekil 2). Yani bu reseptör kompleksi sadece benzodiazepin bağlanma bölgesi içermez, başka ilaçlara ait (barbitürat, nörosteroid, pikrotoksin gibi) bağlanma bölgeleri de içerir. Genelde postsnaptik membranda yerleşim gösterirler (126).

Reseptörün GABA veya GABA agonisti maddelerle aktivasyonu klorür kanallarını açar. Klorür transportundaki yada klorür kondüktansındaki bu artış nöronal membranın hiperpolarizasyonuna yol açarak postsnaptik inhibisyon yapar (81,96,99). Benzodiazepinler ise GABA_A receptor-kanal kompleks üzerinden klorür kanallarının açılma frekansını artırarak etki gösterirler (125).



Şekil 2- GABA_A receptor-kanal kompleksinin şematik yapısı.

F - Benzodiazepin Reseptörleri

Elektrofizyolojik araştırmalar, benzodiazepinlerin etkilerini GABA A reseptörü üzerinden GABA etkisini artırarak oluşturduğunu göstermiştir. Dolayısıyla etkilerini, SSS'indeki GABA sistemini modüle ederek oluşturduğuna inanılmaktadır. Beyin membranlarında benzodiazepinler için yüksek affiniteli bağlanma bölgeleri vardır. Bu yüksek affiniteli bağlanma bölgelerinin reseptör olduğu farzedilmiş "Santral Benzodiazepin Reseptörü" adı verilmiştir Benzodiazepinlerin bu bölgelere bağlanması, stereospesifik ve doyurulabilir özelliktedir (125,126). Benzodiazepinlerin klinik potensleri ile bağlanma bölgelerine yönelik radyoaktif işaretli diazepam ile yapılan çalışmalar arasında korelasyon bulunmuştur. Benzodiazepin reseptörü olarak kabul edilen bu bağlanma bölgeleri GABA_A receptor-kanal kompleksi üzerindedir (125).

Santral dokuların dışında, adrenal bez, böbrek, dalak akciğer gibi perifer dokularda da işaretli benzodiazepinler için yüksek affinite gösteren bağlanma yerleri bulunduğu gösterilmiştir. Özellikle klonazepam, işaretli diazepamın santral

benzodiazepin yerinden çıkartılmasında oldukça potent iken, periferik benzodiazepin yerinden çıkartılmasında zayıftır. Periferik benzodiazepin reseptörlerinin bir başka özelliği de, benzodiazepin derivativesi Ro 5-4864 (4-chlorodiazepam) ve izokinolin derivativesi PK 11195'in periferik benzodiazepin reseptörlerine santral benzodiazepin reseptörlerinden iki kat daha fazla affinite göstermesidir (11). Ancak GABA_A, reseptördeki gibi klorür kanalı ile bağlantılı değil mitokondrial membran dış yüzündeki voltaja bağlı anyon kanalı ile bağlantılıdır (54,126).

Ayrıca, GABA_A receptor -kanal kompleksi üzerindeki benzodiazepin bağlanma bölgesinin, diğer bir ifade ile santral tip benzodiazepin reseptörlerinin özellikle triazolopridazin türevi CL 218872'ye diazepam göre farklı affinite göstermesi bu tür reseptörlerin farklı iki alt tipinin olduğunu göstermiştir (54,78,81,129).

G - Benzodiazepin Reseptör Ligandları ile GABA'erjik Transmisyonun Düzenlenmesi

Benzodiazepin reseptörlerinin doğal ligandları belli değildir. GABA_A receptor-kanal kompleksi üzerindeki benzodiazepin reseptörlerine affinite gösteren, klasik benzodiazepinlerin dışında benzodiazepin yapısına benzeyen ve benzemeyen bir çok bileşik (nikotinamid, inosin gibi) bulunur (44,125). Bu ligandların bir grubu, pozitif intrinsik efikasite gösteren ve GABA'ya bağlı olarak klorür iyon akımını artıran benzodiazepin reseptör agonistleridir. Negatif intrinsik efikasite gösteren ikinci grup, ters benzodiazepin agonistleri olup, GABA'ya bağlı olarak klorür akımını azaltır. Benzodiazepin reseptör antagonistleri olarak bilinen üçüncü grup ise, GABA'erjik transmisyona etkisi çok az veya yoktur, ancak benzodiazepin reseptör agonistlerinin etkilerini inhibe ederler. Anksiyolitik, antikonvülsan, kas gevşemesi, sedatif hipnotik etkilerin oluşması için, benzodiazepinlerin farklı derecelerde GABA reseptör aktivasyonuna sahip olması gerekir (36).

Bu ligandların etkileri tablo 2 'de gösterilmiştir. Örneğin bu durumda tam agonistler düşük düzeyde reseptör işgali ile anksiyolitik ve antikonvülsan etki oluşturabilirken, benzer etkilerin parsiyel agonistlerle oluşturulması için, daha düşük intrinsik aktivite sebebi ile daha yüksek reseptör işgali gerekir. Yine de parsiyel agonistlerle sedatif ve kas gevşetici etki oluşturmak, GABA'erjik transmisyonun çok az artmasına bağlı olarak mümkün değildir, çünkü bu etkiyi oluşturmak için, tam agonistlerde olduğundan yüksek reseptör işgali gerekir.

Tablo-2 Benzodiazepin Reseptör Ligandları ve etkileri

Agonistler	Antagonistler	Ters Agonistler
-anksiyolitik	-reseptör üzerine	-anksiyojenik
-antikonvülsan	çok az direkt etki	-konvülsan
-kas gevşemesi	-agonistlerin ve ters	-uyanıklık
-amnezi	agonistlerin etkilerini	-spazmojenik
-GABA transmisyonun kolaylaştırılması	bloke ederler	-proamnesi -GABA transmisyonun depresyonu

H - Benzodiazepinlerin Öğrenme ve Belleğe Etkileri

GABA agonistleri genel olarak sedatif ve antikonvülsan etkilere sahiptir. Aynı etkiye benzodiazepinler de sahiptir. Bu paralellik bazen, benzodiazepinlere ait farmakolojik etkilerin (anksiyolitik etki de dahil) GABAerjik transmisyonun kolaylaştırılması şeklinde yorumlanarak kullanıldı. Fakat, zamanla yeni GABA ve benzodiazepin reseptörlerinin keşfi ve yeni endojen benzodiazepin reseptörlerinin eklenmesiyle bu durum değişti (99,122).

Araştırmalar genelde, benzodiazepinlerin yeni öğrenilmiş bilginin kazanılmasında (acquisition) doza bağımlı anterograd bozulma yaptığını göstermiştir (25,72). İlaça maruziyet sırasında veya daha önce öğrenilmiş bilginin hatırlanmasını veya çağrışımını değiştirmiyor, bilginin depolanması bozuluyor (9).

I - Elektrokonvülsiv Şokun Öğrenme ve Bellek Üzerine Etkileri

Bazı depresyon türlerinin tedavisinde, ECS etkin olarak kullanılmasına rağmen, biyolojik etki mekanizmaları belli değildir (67). ECS tedavisini takiben oluşan geçici öğrenme ve bellek bozukları, yeni öğrenilmiş bilgilerin kısa bir süre sonra unutulması veya alıkonmasında bozukluk şeklinde kendini gösterir (46). Ancak oluşan bu öğrenme ve bellek bozukluğu ECS'nin konvülsiyon basamağına ait etkiden değil, elektrik akımının etkisinden kaynaklanmaktadır (85). ECS ile oluşan

konvülsiyonlara da GABAerjik mekanizmaların aracılık ettiği ileri sürülmektedir (112).

ECS'nin beyin yapılarında oluşturabileceği olası yapısal değişiklikler, ECS uygulanan hastaların otopsilerinde, epileptik hastaların postmortem bulgularında ve hayvan çalışmalarında incelenmiş ve belirgin bir değişiklik görülmemiştir (29). Kronik ECS uygulanan sıçanların korteks ve hipokampüsünde yapılan bağlanma çalışmalarında ise, kolinerjik reseptör dansitesinin ve β -Adrenerjik reseptör dansitesinde azaldığı tespit edilmiştir (12,97). Kolinerjik reseptör dansitesindeki bu azalma, ECS ile birlikte atropin gibi bir antikolinerjik uygulanması ile önlenmiştir (68). Bir başka çalışmada sıçan hipokampüsündeki interstisyel sıvıda, asetilkolin ve 5 HT₂ yüksek bulunmuştur (144). Bu nedenle ECS ile oluşan amnezilerin, ECS'yi takiben kolinerjik nörotransmisyonunda görülen azalmalardan kaynaklanabileceği görüşü hakimdir (68,69,70).

Nörokimyasal mekanizmaları tam olarak açıklığa kavuşmamakla birlikte insanlarda uygulanan tekrarlı ECS modeli deneysel araştırmalarda da kullanılmakta ve bunun klinikte uygulanan tedavi şeklini daha iyi yansıttığına inanılmaktadır (46,68). Bu gün, öğrenme ve bellek artırıcı ilaçların tarama testlerinde bir model olarak sık kullanılmaktadır (79,89).

J - GABA, Benzodiazepinler ve Lokomasyon

Amfetamin, kokain, Opiyatlar ve etanol beyinde dopamin ve noradrenal turnoverini artırmaktadır. Bu ilaçlara bağlı olarak mezolimbik sistemde dopamin, artışı, aynı zamanda lokomotor aktivite artışına da sebep olmaktadır. Bu iki nörotransmitterin artması ile lokomasyonda artış, azalması veya blokajı ile de lokomasyonda azalma olmaktadır. Dolayısıyla, lokomotor aktivite cevaplarından bu iki nörotransmitter ile ilgili sistemlerin sorumlu olduğu düşüncesi hakimdir (127). Accumbens çekirdeğinden Ventral palliduma uzanan GABAerjik yolların lokomasyonun düzenlenmesinde rol oynadıkları ve dopamin salıverilmesini tonik olarak inhibe ettikleri düşünülmektedir (22). İntraserebroventriküler olarak palliduma verilen GABA antagonistleri motor aktiviteyi artırdığı görülmüştür (6). GABAerjik ajanlar sistemik olarak verildiği zaman, hipomotilite, sedasyon, amblatuvar aktivite azalması gibi davranışlar sergiler. Dopamin antagonistleri de motor fonksiyonlarda benzer etkiye sahiptir (77).

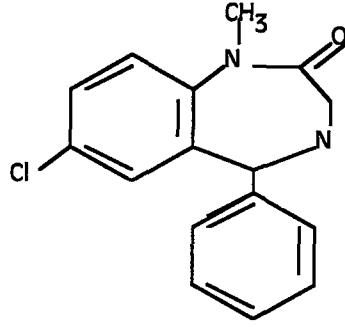
Kas gevşemesi, hipotermi, ataksi gibi birçok faktör lokomasyonu etkilemesine rağmen, ilaçların lokomotor aktivite üzerine etkisi sedasyonun bir ölçümü olarak değerlendirilir (34). Zaten yeteri kadar yüksek dozda kullanılan ilaçların bir çoğu motor fonksiyonları değiştirir. Ama GABA ilgili behevoral etkilerin incelenmesi sırasında, motor etkiler daima gözönünde bulundurulmalı ve bir kural olarak kabul edilmelidir (99).

Benzodiazepinler ise genelde lokomotor aktiviteyi azaltmakta veya deprese etmektedir (2,73). Ancak Alprazolam gibi bazı benzodiazepin türevlerinin düşük dozda lokomotor aktiviteyi artırdığı da tespit edilmiştir (74). Benzodiazepin antagonisti flumazenilin yalnız kullanıldığı zaman lokomasyonu hem artırdığı hem de değiştirmedeği şeklinde bilgiler mevcut (31,89) ancak benzodiazepin agonistlerinin lokomosauna ait etkilerini antagonize etmede farklı davranıyor. Benzodiazepin ters agonistleri için de aynı durum söz konusudur (59). Benzodiazepin agonist ve antagonistleri, çeşitli lokomasyon stimülasyon ve süpresyon testlerinde de farklı cevaplar oluşturmaktadır (30,33,119). Bu bulgulara dayanarak benzodiazepinlerin lokomasyon üzerine etkilerini bir kurala bağlamak zordur.

K - Çalışmada Kullanılan İlaçlar Hakkında Kısa Bilgiler

a- Diazepam

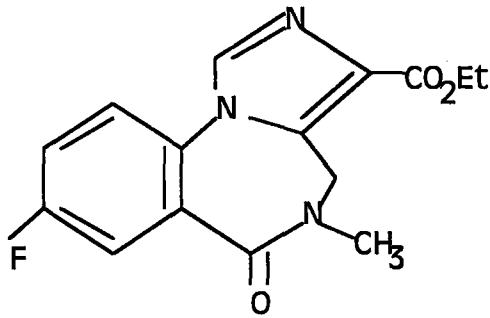
1,4 benzodiazepin türevi olan Diazepam benzodiazepin reseptör agonistidir (Şekil 3). Uzun etki sürelidir. Karaciğerde mikrozomal enzimlerle N-dealkilasyon ile aktif metaboliti Desmetildiazepam'a dönüşür. Aktif metabolitinin etkisi daha belirgindir. İnsanlarda yarılanma ömrü (33saat) uzun ve metabolik klirensi (0.35ml/dk/kg) düşük olmasına rağmen, sıçanlarda aksine yarılanma ömrü 66.6 dakika, metabolik klirensi 43.2 ml/dk/kg'dır (109). Diazepam 5mg/kg sıçanlara i.p. olarak verildiğinde 15 dakika sonra plazma düzeyi $0.20 \pm 0.01 \mu\text{g/g}$, beyin düzeyi $0.60 \pm 0.08 \mu\text{g/g}$ olarak tesbit edilmiştir. 10mg/kg dozunda verildiğinde ise plazma düzeyinin $0.60 \pm 0.02 \mu\text{g/g}$, beyin düzeyinin $1.26 \pm 0.43 \mu\text{g/g}$ çıktığı görülmüştür (21).



Şekil 3- Diazepamın kimyasal formülü

b- Flumazenil

Flumazenil imidazobenzodiazepin grubu selektif bir BZ antagonisti olup doza ve teste bağlı olarak intrinsik aktivite göstermektedir (1,82,125). Kısa etki sürelidir (3-5saat). Yarılanma ömrü sıçan beyinde 16dk olup 2.5 mg/kg İ.V. olarak verildiğinde eliminasyon yarılanma ömrü 8 dk'dır (83). Sıçanlara periton içinden 10mg/kg dozunda verildiğinde 10 dk da beyinde pik konsantrasyona ulaşıyor (58). 5-10mg/kg arasında anksiyojenik, 20mg/kg üzerindeki dozlarda diazepam benzeri anksiyolitik etki gösterir (28). Gerçekte agonist etkinliği düşük olan parsiyel agonist tipi bir antagonisttir. Gerek benzodiazepin agonistlerinin ve gerekse ters agonistlerinin etkisini antagonize eder.



Şekil 4- Flumazenilin kimyasal yapısı

III - GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışma 1994-1995 yıllarında GATA Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalına ait psikofarmakoloji laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Deney için gerekli tüm aletler ve deney hayvanları anabilim dalından temin edilmiştir.

A - GEREÇLER

1-Laboratuvar

Deneyler dış etkenlere karşı yalıtılmış, sıcaklığı ($22 \pm 3^{\circ}\text{C}$) ve bağıl nemi (% 60 \pm 5) sabit, 08.00-20.00 saatleri arasında aydınlık, 20.00 - 08.00 saatleri arasında karanlık periyodu olan ve bu sistemleri otomatik olarak çalışan laboratuvarında yapılmıştır. Öğrenme ve bellek testleri laboratuvarında ayrı bir bölüm olan psikofarmakoloji laboratuvarında özel bir bölümde, kırmızı ışıklı nötral bir ortamda çalışılmıştır.

2 - Deney hayvanları

Deneylerde kullanılan sıçanlar, yukarıda özellikleri belirtilen laboratuvarında elevaj suretiyle sağlanmıştır. Deneylerde ağırlıkları $225 \pm 11\text{gr}$ olan wistar cinsi erkek sıçanlar kullanılmıştır. Öğrenme deneyi için gerekli dönem dışında su ve yem tüketimleri sınırlandırılmamıştır. Hayvanlar özel pleksiglas sıçan kafeslerinde ve her bir kafesde beş hayvan bulunacak şekilde barındırılmıştır.

3 - Kullanılan Maddeler

- Flumazenil (Hoffman-La Roche Co.)
- Diazepam (sigma)

4 - Kullanılan aletler

a - Mekik kutusu (Shuttle - Box) cihazı (Computerized Reflex Conditioner, Columbus Instruments International Corporation, U.S.A.)

Koşullu (aktif) Sakınma Cevabının (KSC) kazandırılmasının, Koşullu Kaçma (Escape) Cevabının (KKC) ve Koşullu Kaçma Cevabı Latensisinin (KL) test edilmesi mekik kutusu cihazında yapılmıştır (Resim 1). Bu elektronik cihaz temelde birbirinin aynı iki kompartmandan oluşmaktadır. Herbir kompartman 29×29×26cm boyutlarında ve birbirinden metal bir separatörle ayrılmıştır. Separatörün zemine yakın olan bölümünde, iki kompartman arasında geçişi sağlayan 8×4.5cm ebatlarında elipsoid bir delik yer almaktadır. Sıçanların kompartman içerisinde ayak bastıkları zemin, 0.3cm çapında paslanmaz çelik telden yapılmış ve birbirine 1cm aralıkla paralel olarak yerleştirilmiş bir ızgaradır. Bu ızgara, hayvanın ayağına programlı bir şekilde elektrik akımı verebilecek şekilde tasarlanmış ve yan duvarlarda bulunan infrared fotosensörler ile sıçanın delikten geçmesi halinde akım kesilmektedir. Aynı zamanda bu geçiş, hayvanın mekik kutusu içindeki davranışlarını yansıtmakta ve bilgisayar aracılığı ile kaydedilmektedir.

Yine bilgisayar programı ile ızgara zeminine elektrik akımı verilmeden önce, üst kısımdaki kapakta bulunan sistem aracılığı ile ses ve ışıktan oluşan nötral stimulusları verilebilmekte ve verilen tüm stimulusların (ses, ışık, ayak şoku) şiddeti manuel olarak ayarlanabilmektedir.

Veriler, bilgisayar aracılığı ile yazılı çıktı veya disket aracılığı ile alınır.

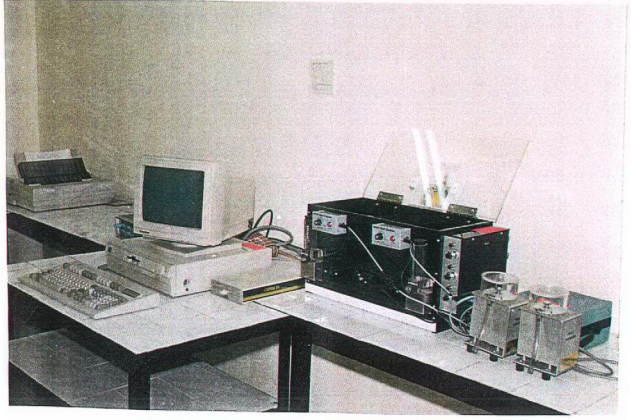
b - Lokomotor aktivite cihazı (Opto-Varimex Minör, Columbus, U.S.A.)

42.5×42.5×20cm boyutlarında pleksiglas şeffaf gözlem kafesi içinde fare ve sıçanların horizontal, vertikal ve amblatuvar lokomotor aktivitelerini ayrı ayrı ölçen bir cihazdır. Hayvanın hareket etmesi ile, yan duvarlarda bulunan infrared sensörlerde kesintiler olur. Cihaz bu kesintileri aktivite olarak algılar ve kaydeder. Ölçüm süresi manuel olarak ayarlanabilmektedir. Belirlenen zamanlarda lokomotor aktivite değerleri çıktı olarak alınabilmektedir (resim 2).

c - Elektro-konvülsiv şok (ECS) cihazı (HSE-SCHOCK-REIZGERÄT, Huco Sachs Elektronik, D 7801, March-Hugsletter)

Verilecek şokun şiddetinin manuel olarak ayarlanabildiği sadece deneysel amaçlı bir cihazdır. Fare ve sıçanlara ECS'yi, miliamper (50Hz) şiddetinde, saniyenin 1/100 frekans hassasiyetinde uygulayabilme ve kulak kısıpacı ile kulaktan yada göz maşası ile gözden doğru akım vererek ECS oluşturabilme imkanı sağlar (Resim 3).

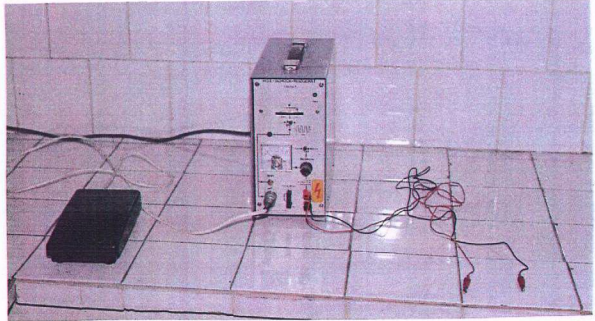




Resim 1. Shuttle-box



Resim 2. Lokomotor aktivite cihazı



Resim 3. Elektro-konvulsiv şok (ECS) cihazı

5 - Deney grupları

Deneyler hergün 10.00-15.30 arasında yapılmıştır. Her grubun deneyinin 5gün devam etmesi ve bir günde en fazla 10 sıçanın deneye alınması nedeni ile, çalışma programı her hafta iki deney grubunun yarısı olacak şekilde planlanmıştır. Çalışma süresince 159 sıçan kullanılmıştır. Bu sıçanlar deneye alınmadan önce bir kafesde 5 sıçan olacak şekilde gruplara ayırarak, bir hafta bekletilip deneye alınmıştır.

Deney grupları aşağıdaki şekilde oluşturulmuştur;

1. grup (n=10) 10ml 'sinde 2 damla Tween 80 içeren distile su (Kontrol),
2. grup (n=10) diazepam 0.5mg/kg,
3. grup (n=10) diazepam 1mg/kg ,
4. grup (n=10) diazepam 2mg/kg,
5. grup (n=10) flumazenil 5mg/kg,
6. grup (n= 9) flumazenil 10mg/kg,
7. grup (n=10) flumazenil 20mg/kg,
8. grup (n=10) 10ml'sinde 2 damla Tween 80 içeren distile su (15dk ara ile iki defa)
9. grup (n=10) diazepam 0.5mg/kg ve flumazenil 10mg/kg,
10. grup (n=10) diazepam 1mg/kg ve flumazenil 10mg/kg,
11. grup (n=10) diazepam 2mg/kg ve flumazenil 10mg/kg,
12. grup (n=10) SHAMx7 ve 10ml'sinde 2 damla Tween 80 içeren distile su
13. grup (n=10) ECSx7 ve 10ml 'sinde 2 damla Tween 80 içeren distile su
14. grup (n=10) ECSx7 ve flumazenil 1mg/kg,
15. grup (n=10) ECSx7 ve flumazenil 5mg/kg,
16. grup (n=10) ECSx7 ve flumazenil 10mg/kg,
17. grup (n=10)SHAMx7 ve flumazenil 10mg/kg.

6- Madde uygulamaları ve deney yöntemleri

Deneyde kullanılan maddelerden flumazenil günlük olarak hazırlanırken, diazepam 5 günlük kullanım miktarı kadar hazırlanmış ve buzdolabında muhafaza edilmiştir. Flumazenil 10ml 'sinde 2 damla Tween 80 bulunan distile suda süspanse edilerek, injeksiyonluk solusyonu hazırlanmıştır. Diazepamın injeksiyonluk

solusyonunun hazırlanmasında farklı yöntem kullanılmıştır. Kullanılacak diazepam miktarı tartılıp hazırlandıktan sonra, diazepam eriyene kadar damla damla 0.1N HCl ilave edildi. Maddenin tamamı eridikten sonra, distile su ile istenilen volüme tamamlanarak, damla damla 0.1 N NaOH ilave edilip, pH metre ile pH ayarı yapılmıştır. pH ayarını takiben, Tween 80 ilave edilerek injeksiyonluk diazepam süspansiyonu hazırlanmıştır. Tüm injeksiyonlar intraperitoneal olarak ve 1ml/200g hacimde uygulanmıştır.

Diazepam ve diazepamı ait vehikül injeksiyonları deneye girmeden 30 dakika önce, flumazenil ve flumazenil vehikülü ise deneye girmeden 15 dakika önce yapılmıştır. Diazepam injeksiyonlarından 15 dk sonra flumazenil injeksiyonları, 30 dakika sonra mekik kutusu deneyleri ve bunu takiben de ara vermeden lokomotor aktivite testleri yapılmıştır. Her grup 5 gün süre ile bu şekilde günlük olarak testlere girmiştir.

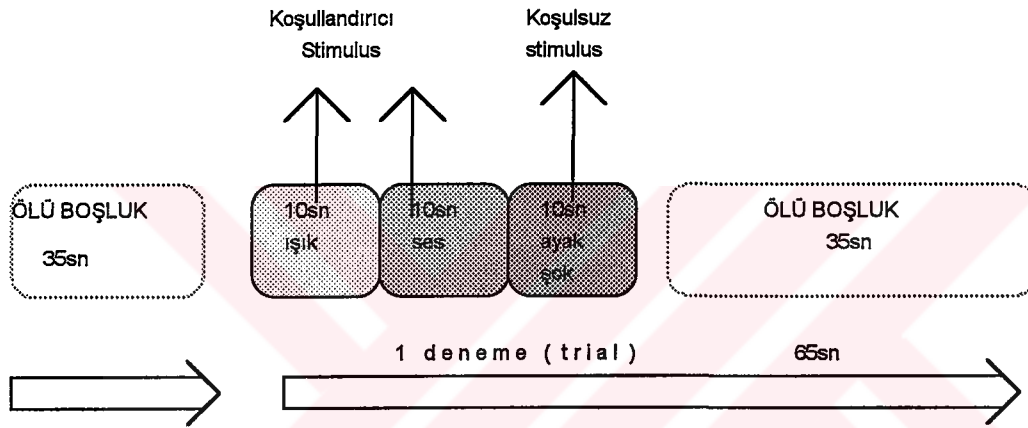
B - YÖNTEMLER

1- Koşullu sakınma cevabının kazandırılması (acquisition) ve koşullu kaçma cevabı :

Yukarıda anlatıldığı şekilde ilaç uygulanan sıçanlara, uygulamadan 30dk sonra 20 denemelik (trial) bir seans (season) tatbik edilmiş ve bu seanslar hergün aynı saatte olacak şekilde toplam 5 gün süreyle tekrarlanmıştır. Deneye girecek hayvanlar, deneye başlamadan önce 5 dakika süre ile alışmaları için cihaz içinde bekletilmişlerdir.

Trial veya denemelerin her biri 10 sn. süren ışık ve ses stimulusu ile başlamakta ve bunu takiben 10 sn süren ızgara vasıtası ile elektrik (ayak) şoku uygulanmaktadır. Sesin şiddeti 60 dB, ışık için kullanılan ampül 12 watt ve ayak şoku 0.8 mA'dir. Toplam 20sn süren ses ve ışık stimulusu koşullandırıcı stimulus olarak, 10sn. süren ayak şoku ise koşulsuz stimulus olarak kullanılmıştır. Hayvanlar bu şekilde koşullandırıcı bir stimulusun ardından koşulsuz bir stimulusun (ayak şoku) geleceğini öğrenmeye başlamaktadır. Işık ve ses stimulusunu algılamaları ile birlikte, ayak şokundan kurtulmak için bulunduğu kompartmandan süratle diğer kompartmana geçmektedir. Geçmedikleri taktirde ayak şokuna maruz kalacaklarından, koşullandırıcı stimulus ile karşı kompartmana geçme şeklinde bir davranış sergileyerek ayak şokundan kurtulmaktalar. Uygulanan programın akış şeması şekil 5 de gösterilmiştir.

Öğrenme oluşmadığı zaman, ayak şokundan kurtulmak amacıyla karşı kompartmana geçerse, koşullu kaçma (escape) şeklinde bir cevap oluşturmakta ve koşullu sakinme cevabından ayrı olarak değerlendirilmektedir. Eğer 10 sn'lik ayak şokuna rağmen kaçma olmamışsa, değerlendirme dışı bırakılan (non-transfer) bir davranış cevabı oluşturuyor. Böyle bir cevap oluştuğunda, hayvan aynı zamanda ayak şoku ile cezalandırılmış oluyor.



Şekil 4- Koşullu (aktif) sakinme cevabının kazandırılması için kullanılan programın akış şeması

Triallerin (deneme) her birinde 35 sn'lik ölü boşluk bulunmaktadır. Bu dönemde karşı kompartmana geçiş olursa değerlendirilmemektedir ve cezalandırılmamaktadır. Karşı kompartmana öğrenerek yada öğrenmeden geçen hayvan, aynı işlemlere bu defa geçtiği kompartmanda maruz kalıyor. Böylece iki tarafta da koşullu stimulus ve ardından koşullu stimulus uygulanabilmektedir. Bu şekilde trialler her seansta (yada günde) 20 defa olacak biçimde tekrarlanıyor. İki tarafta da sakinme cevabı kazandırılması uygulanabildiği için, koşullu sakinme cevapları "İki Yönlü Sakınma Cevabı kazandırılması" olarak da isimlendirilmektedir.

2 - Lokomotor aktivite ölçüm işlemleri

Mekik kutusunda koşullu sakinme ve kaçma cevapları alınan hayvanlar, hiç bekletilmeden doğrudan lokomotor aktivite cihazına alınmıştır. Başka bir ifade ile ilaç uygulama başlangıcından 50 dakika sonra cihaza alınmıştır. Hayvanların horizontal, vertikal ve amblatuvar aktiviteler ayrı ayrı 15 dakika ölçülmüştür. İlk 5 dakikalık bölüm değerlendirme dışı bırakılıp, kalan 10 dakikalık bölüm değerlendirilmiştir. İlk 5 dakikalık bölüm, hayvanlar deneyden yeni çıkması nedeni ile çıkarılmıştır.

3 - Elektro-konvülfif şok uygulama işlemleri

Yukarda özellikleri anlatılan ECS cihazı ile hayvanlara, hergün aynı saatte belirlenen bir şiddette 7 gün şok verilmiştir. Şok kulağa, cihazın kulak kısıpacı ile verilmiştir. Elektrik iletimini bozulmaması ve sabit olması için, kısıpacı şok verilmeden önce tuzlu suda ıslatılmıştır. Şok, 30mA şiddetinde, 50Hz frekansa ve 0.75 sn süre ile verilmiştir. Kontrol grubu olarak kullanılan hayvanlar ise, yalancı ECS oluşturmak (sham) amacıyla sadece kulaklarına kısıpacı takılmıştır, şok verilmemiştir. Hayvanlar, 7nci ECS verildikten 24 saat sonra sakinme deneylerine alınmıştır.

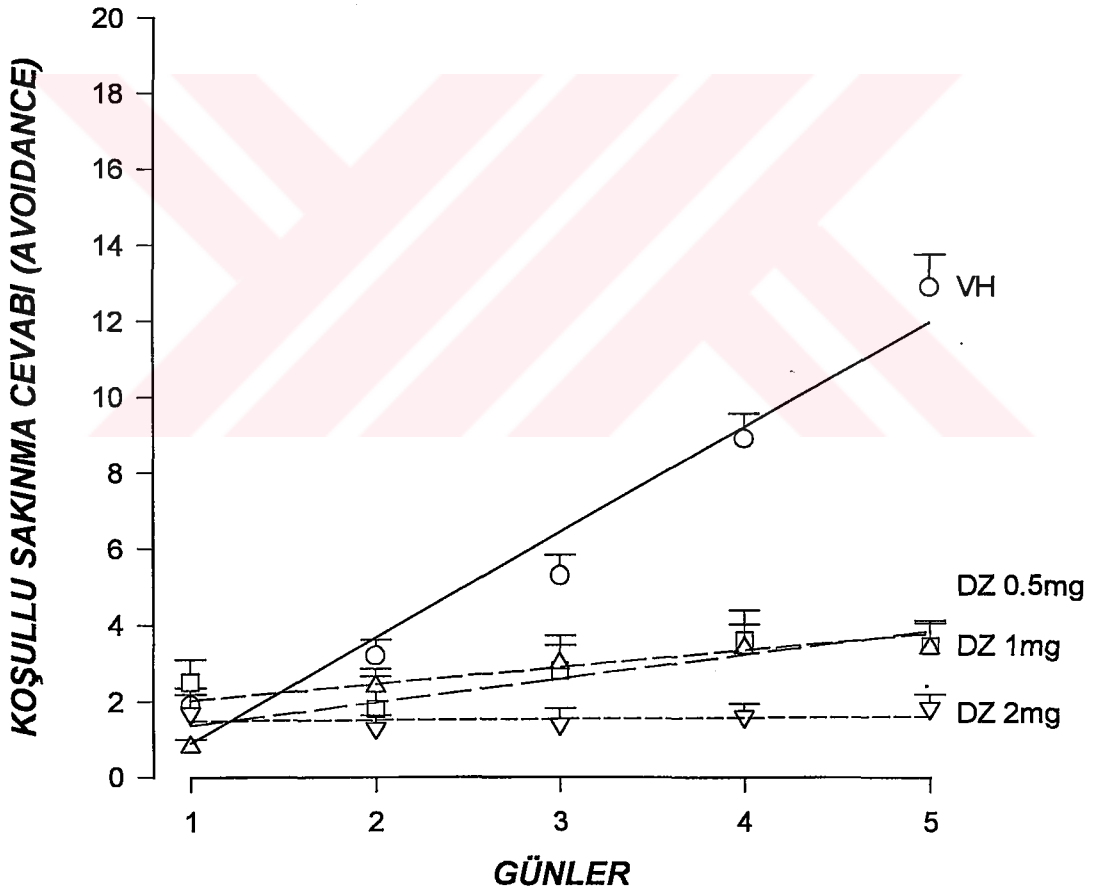
4 - İstatistiksel değerlendirme

Koşullu sakinme ve kaçma cevaplarının artış veya azalışlarının değerlendirilmesinde, önce grupların regresyon analizleri yapılarak gruplara ait regresyon doğruları bulundu. Koşullu sakinme ve kaçma cevabı kazanabilme veya kazanama (öğrenmenin bozulması) hızını da yansıtan bu doğrular arasında istatistiksel değerlendirme yapıldı ve student-t testi ile kullanıldı. Lokomotor aktivite sonuçları, tek yönlü varyans analizi ile değerlendirilmiştir ve grupların teker teker birbirleri ile karşılaştırmasında ise student newman-Keuls testi kullanılmıştır (120).

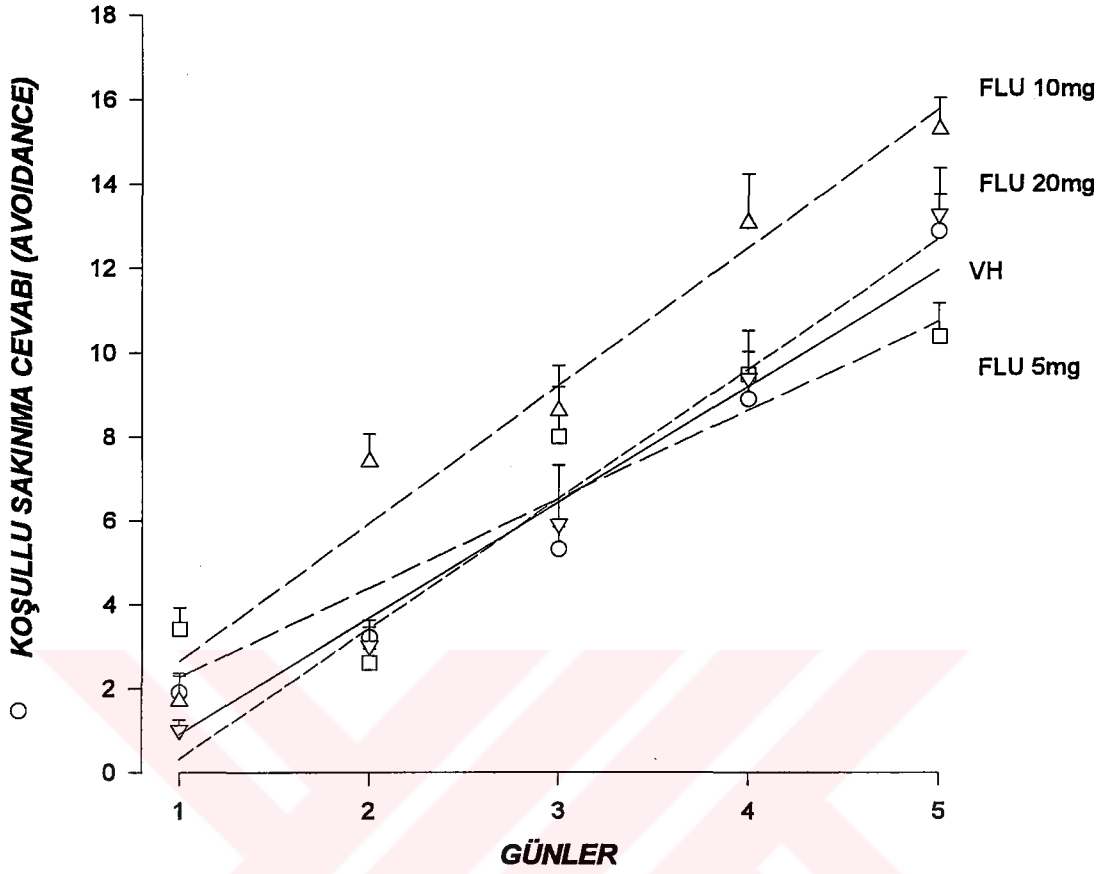
IV - BULGULAR

a- Diazepam ve Flumazenilin Koşullu Sakınma Cevabına (acquisition) etkileri:

Diazepam, koşullu sakınma cevabını 0.5mg/kg, 1mg/kg ve 2mg/kg dozlarında kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaltmıştır (sıra ile $t=7.93$, $p<0.01$, $t=7.65$, $p<0.01$ ve $t=11.48$, <0.01). Azalma oluşturan dozlar arasında anlamlı bir fark yoktur (Şekil 6).

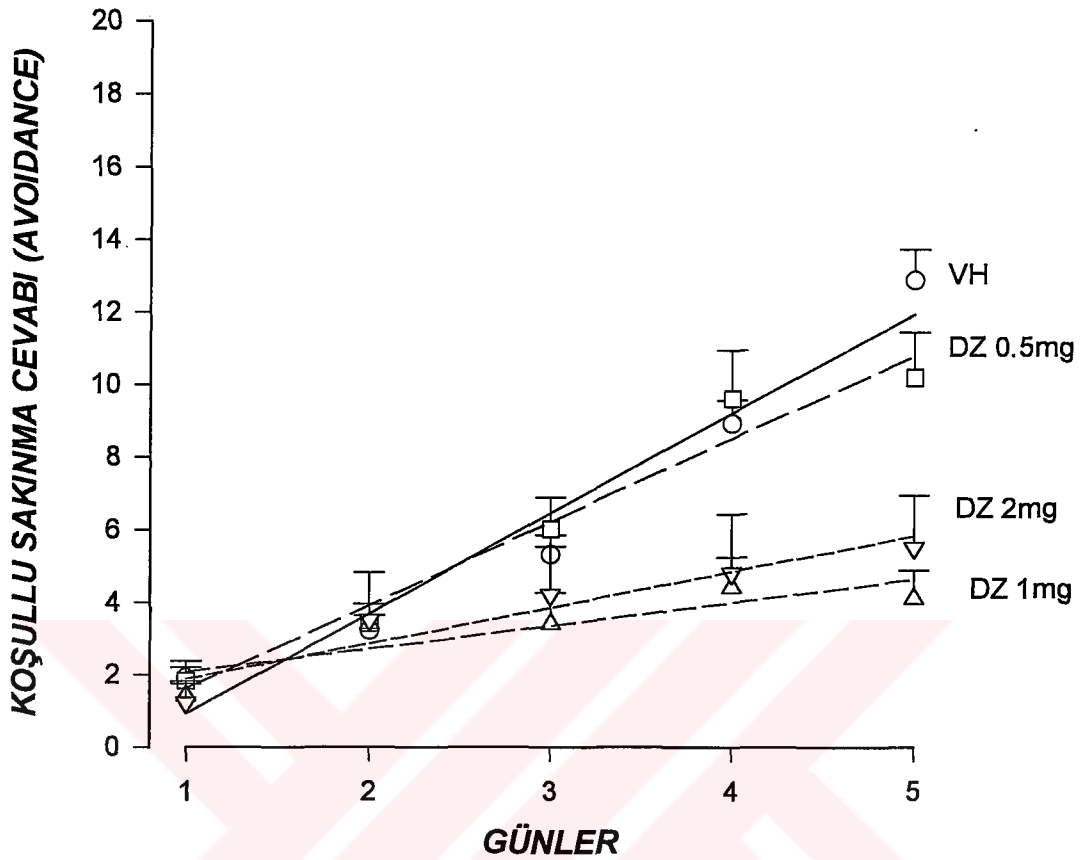


Şekil 6- Diazepamın artan dozlarının koşullu sakınma cevabı (acquisition) üzerine etkileri. Diazepam 0.5mg/kg, 1mg/kg ve 2mg/kg kontrol grubundan farklı, (DZ 0.5mg $t=7.93$, $p<0.01$, DZ 1mg $t=7.65$, $p<0.01$ ve DZ 2mg $t=11.48$, <0.01).



Şekil 7- Flumazenilin artan dozlarının koşullu sakınma cevabı (acquisition) üzerine etkileri. (Gruplar arasında anlamlı fark yok)

Diazepamın tersine, flumazenilin 5mg/kg, 10mg/kg ve 20mg/kg dozları, koşullu sakınma cevabında azalma veya yükselme yapmamıştır. Ancak flumazenilin 10mg/kg dozu koşullu sakınma cevabında bir yükselme yapmış gibi gözükmesine rağmen anlamlı bir yükselme değildir (Şekil 7).

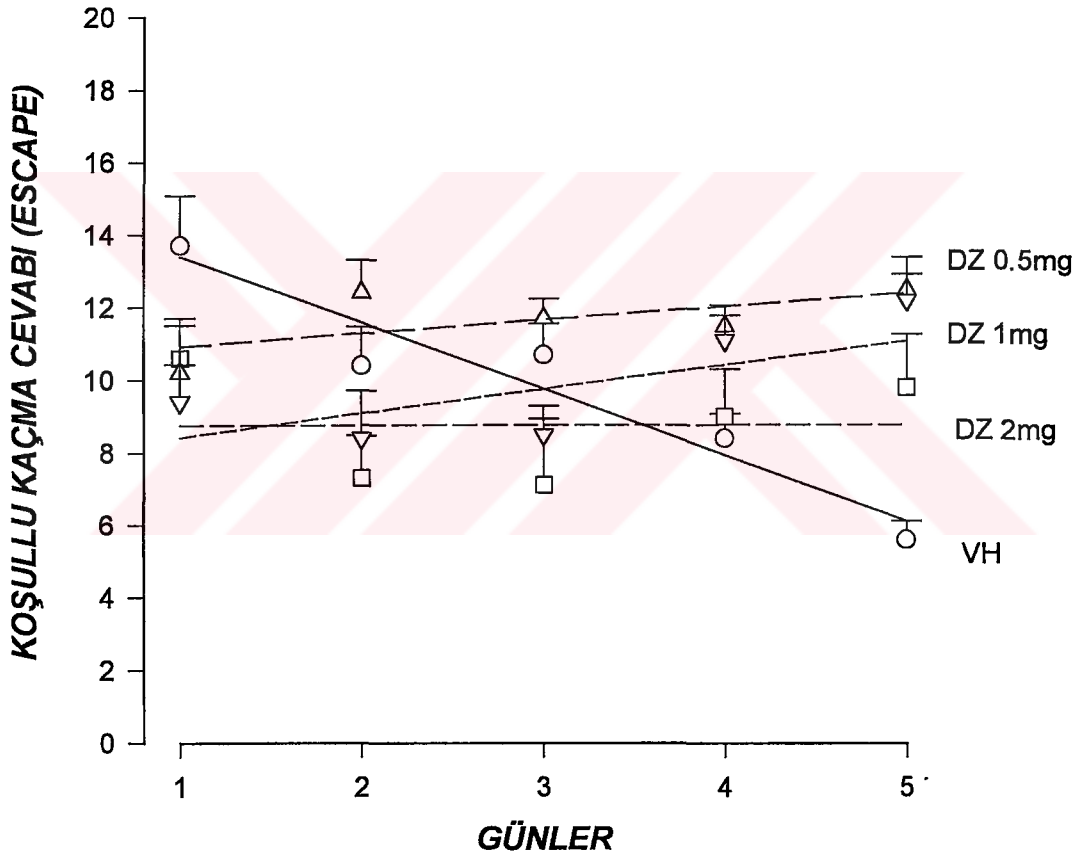


Şekil 8- Diazepamın farklı dozları ile 15 dakika sonra verilen flumazenilin (10mg/kg) koşullu sakınma cevabı (acquisition) üzerine etkisi. DZ 1mg ve DZ 2mg VH'den farklı ($t=7.073$, $p<0.01$ ve $t=3.964$, $p<0.01$)

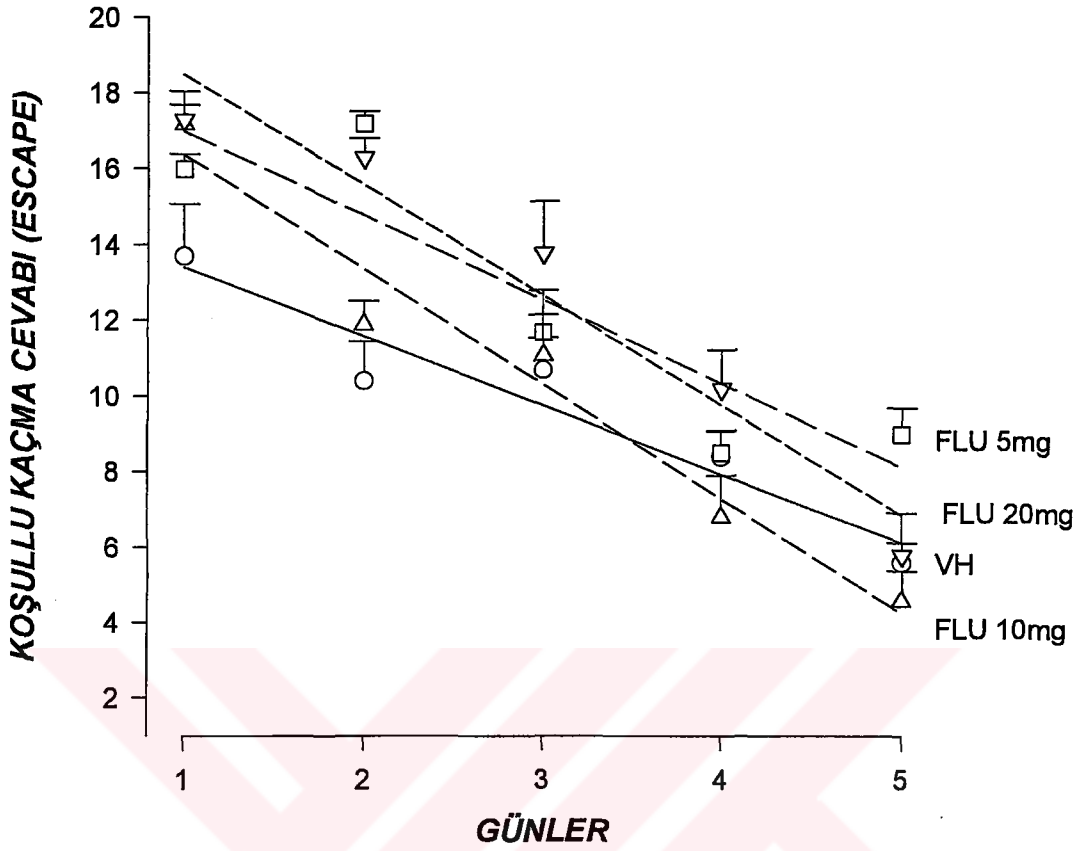
Flumazenilin 10mg/kg dozu, diazepamın 1mg/kg ve 2mg/kg dozlarında oluşan koşullu sakınma cevabındaki azalmayı değiştirmemiştir (Şekil 8). Başka bir ifade ile, bu dozlarda kontrol grubuna göre koşullu sakınma cevabındaki azalma, 10mg/kg Flumazenil verilmesine rağmen devam etmiştir ($t=7.073$, $p<0.01$ ve $t=3.964$, $p<0.01$). Diazepamın 0.5mg/kg dozu ile koşullu sakınma cevabında kontrol grubuna göre oluşan azalma, 10mg/kg flumazenil ile ortadan kaldırılmıştır. Diazepamın (0.5mg/kg) bu dozuna ait sakınma cevabı flumazenil (10mg/kg) kontrol grubu ile aynı düzeylere çıkmıştır.

b- Diazepam ve Flumazenilin Koşullu Kaçma Cevabına etkileri :

Diazepamın 0.5mg/kg, 1mg/kg ve 2mg/kg dozları koşullu kaçma cevabını, kontrol grubuna (VH alan grup) göre anlamlı olarak artırmıştır ($t=5.19$, $p< 0.01$, $t=3.40$, $p< 0.01$ ve $t=5.88$, $p< 0.01$). Dozlar arasında ise anlamlı bir fark yoktur (Şekil 9).

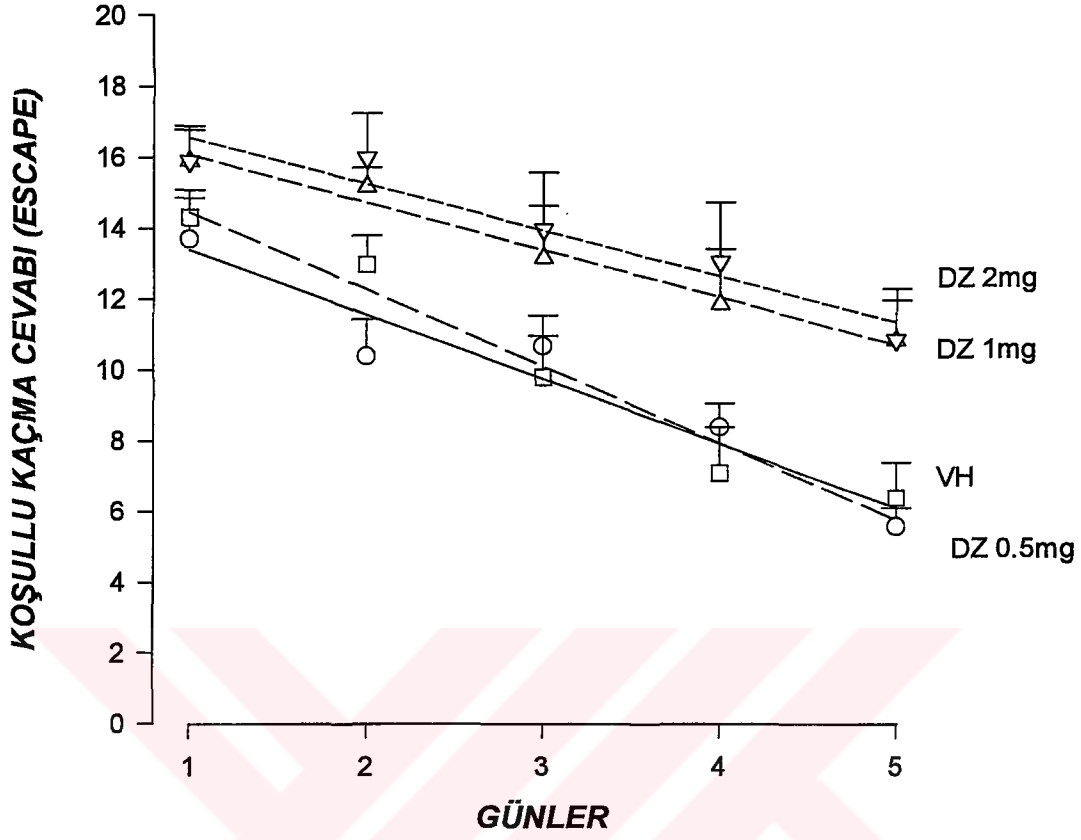


Şekil 9- Diazepamın farklı dozlarının koşullu kaçma cevabı üzerine etkileri. DZ 0.5mg, DZ 1mg ve DZ 2mg VH (kontrol) grubundan farklı (sıra ile $t=5.19$, $p< 0.01$, $t=3.40$, $p< 0.01$ ve $t=5.88$, $p< 0.01$).



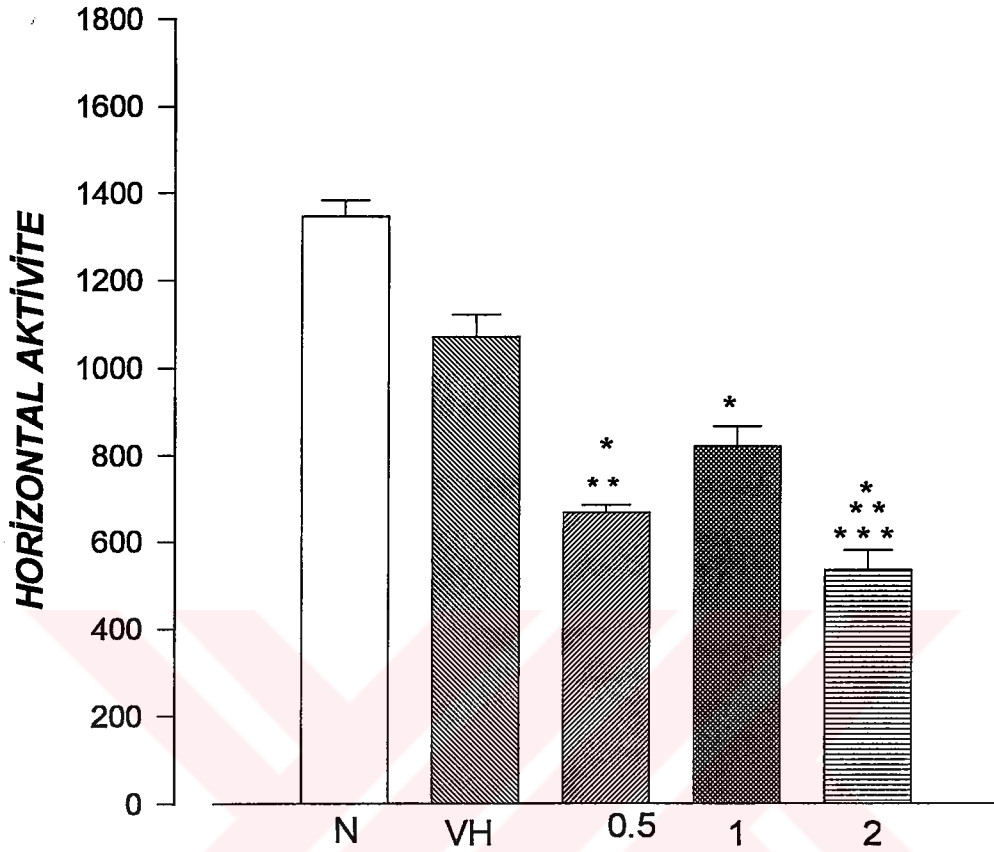
Şekil 10- Flumazenilin farklı dozlarının koşullu kaçma cevabı üzerine etkisi. FLU 10mg ve FLU 20mg kontrol (VH) grubundan farklı (sıra ile $t=2.95$, $p< 0.01$ ve $t=2.47$, $p< 0.01$).

Flumazenilin 10mg/kg ve 20mg/kg dozları koşullu kaçma cevabını, kontrol (VH) grubuna göre, anlamlı bir şekilde azaltmıştır (sıra ile $t=2.95$, $p< 0.01$ ve $t=2.47$, $p< 0.01$). 5mg/kg flumazenil dozu ile koşullu kaçma cevabında görülen yükselme ise anlamlı değildir (şekil 10).



Şekil 11-Diazepamın farklı dozları ile 15 dakika sonra verilen flumazenilin (10mg/kg) koşullu kaçma cevabı üzerine etkisi. Kontrol grubundan farklı değildir.

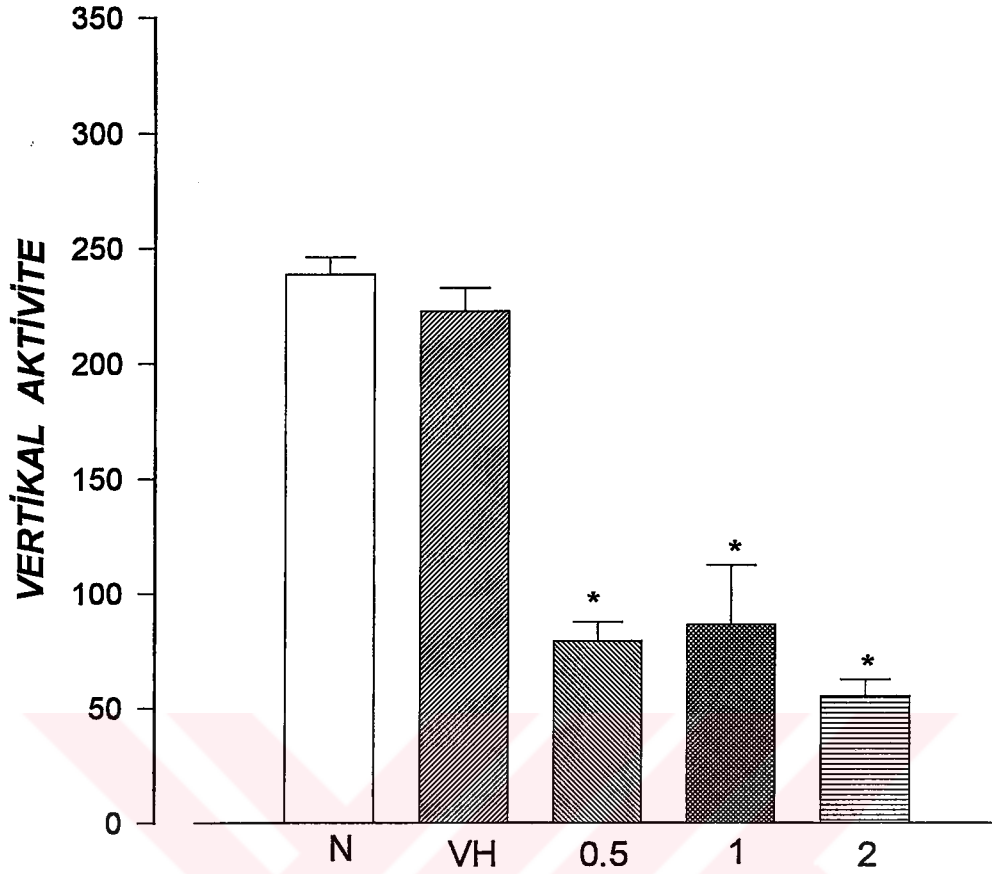
Flumazenil (10mg/kg), diazepamın farklı dozlarında oluşan koşullu kaçma cevabındaki yükselmeyi değiştirmemiştir (Şekil 11). Diazepamın 1mg/kg ve 2mg/kg dozlarında görülen yükselme anlamlı değildir.



Şekil 12- Diazepamın artan dozlarının horizontal aktiviteye etkisi (N→ injeksiyon yapılmamış grup, VH→ vehikül alan grup, 0.5→ 0.5mg/kg diazepam i.p., 1→ 1mg/kg diazepam i.p., 2→ 2mg/kg diazepam i.p.). * $p < 0.01$ (konrolden farklı), ** $p < 0.01$ (1mg/kg 'dan farklı) ve *** $p < 0.01$ (0.5mg/kg 'dan farklı)

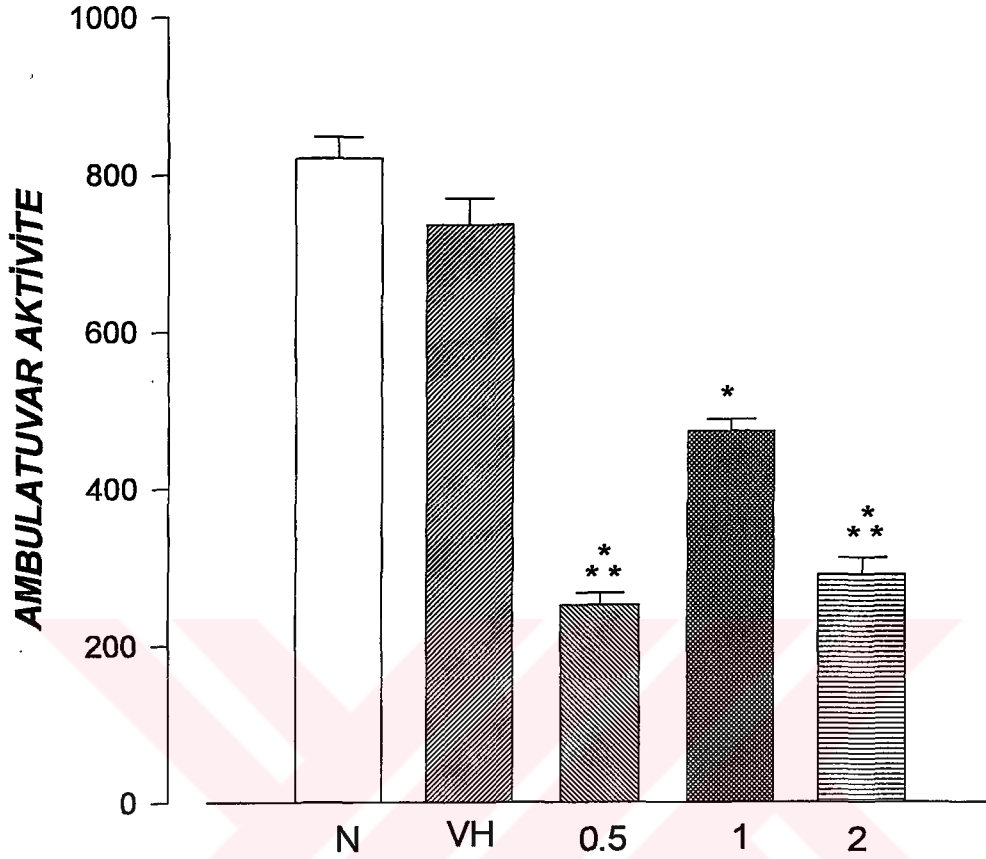
c-Diazepamın Horizontal, Vertikal ve Amblatuvar lokomotor aktivitelere etkisi:

N ile gösterilen ve ilaç uygulaması yapılmayan grup, tüm gruplardan farklıdır. İnjesiyon uygulamasının (i.p.) etkisini görmek için çalışılmıştır. Diazepamın tüm dozları kontrol (Vehikül) grubuna göre horizontal aktiviteyi anlamlı olarak azaltmıştır (Şekil 12). Ancak 1mg/kg ve 2mg/kg doza bağımlı şekilde azaltırken, 0.5mg/kg dozu amblatuvar aktiviteyi, 1mg/kg dozundan daha fazla anlamlı olarak azaltmıştır ($F=66.25$, $p < 0.01$).



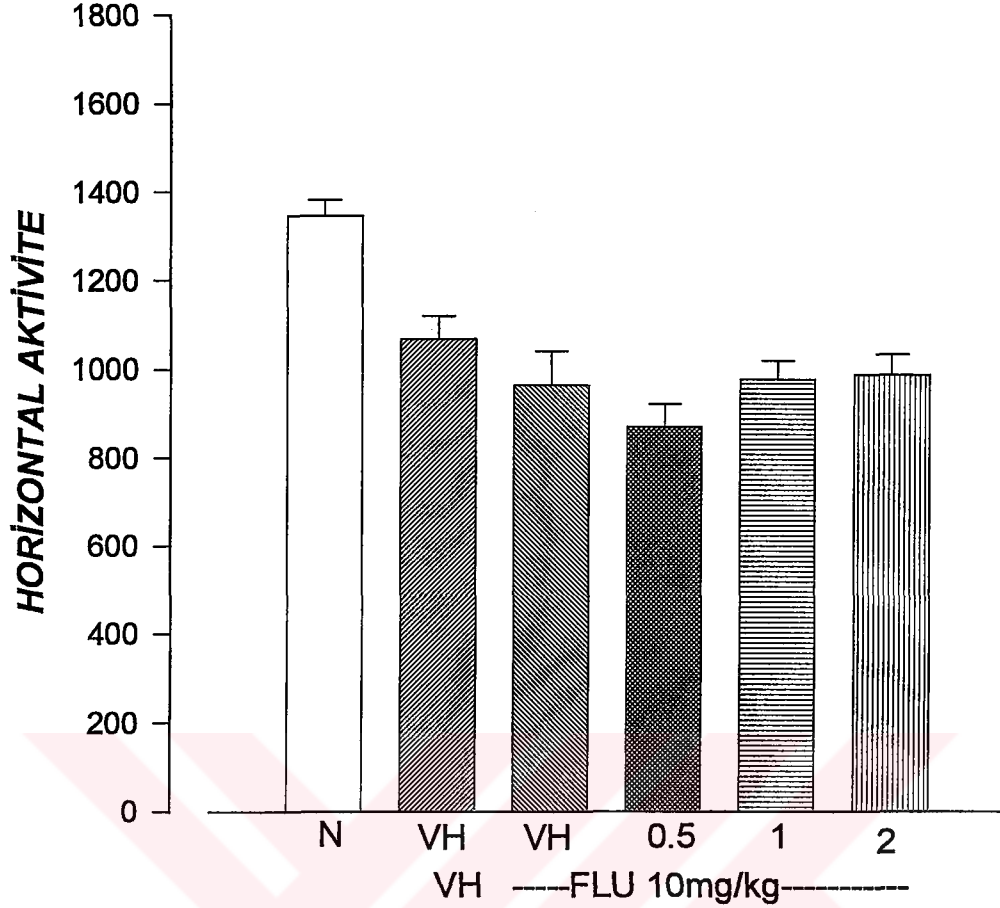
Şekil 13- Diazepamın artan dozlarının vertikal aktivite üzerine etkisi (N→ injeksiyon yapılmamış grup, VH→ vehikül alan grup, 0.5→ 0.5mg/kg diazepam i.p., 1→ 1mg/kg diazepam i.p., 2→ 2mg/kg diazepam i.p.). * p<0.01 (kontrolde farklı)

Diazepamın artan dozlarının vertikal aktivite üzerine etkisi Şekil 13 'de görülmektedir. Diazepamın tüm dozlarının kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde azalma oluşturmasına ($F=37.35$, $p<0.01$) rağmen, dozlar arasında bir ilişki yoktur. Tüm dozlarda vertikal aktivitede benzer azalmalar olmuştur. İ.p. uygulama yapılmayan grup ile kontrol grubu arasında da anlamlı bir fark yoktur. Vertikal aktivite değerleri diazepamın artan dozlarını belirgin olarak yansıtmamaktadır.



Şekil 14-Diazepamın artan dozlarının amblatuvar aktivite üzerine etkileri (N→ injeksiyon yapılmamış grup, VH→ vehikül alan grup, 0.5→ 0.5mg/kg diazepam i.p., 1→ 1mg/kg diazepam i.p., 2→ 2mg/kg diazepam i.p.). * $p<0.01$ (kontrolden farklı) ve ** $p<0.01$ (1mg/kg 'dan farklı)

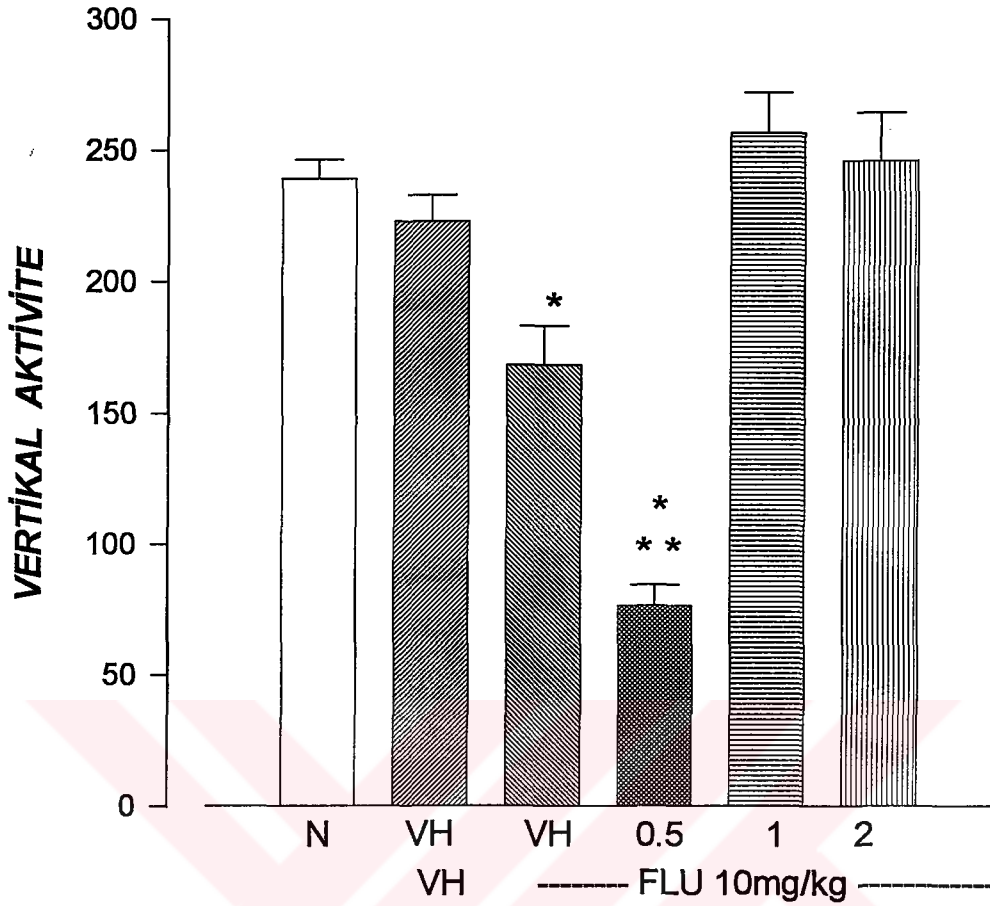
N ile gösterilen ve i.p. uygulama yapılmayan grubun amblatuvar aktivitesi kontrolden farklı değil. Diazepam üç doz ile de amblatuvar aktiviteyi kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaltıyor (şekil 14). Fakat 0.5mg/kg ve 2mg/kg dozları hem kontrol grubundan, hem de 1mg/kg dozundan daha fazla anlamlı düşme göstermektedir ($F=129.61$, $p<0.01$). 0.5mg/kg diazepam amblatuvar aktivitedeki doza bağımlı azalmayı bozmaktadır.



Şekil 15- Diazepam verildikten 15 dakika sonra verilen 10mg/kg flumazenilin horizontal aktivite üzerine etkisi (N→ i.p. uygulama yok, VH→ vehikül + vehikül i.p., VH→ vehikül + 10mg/kg Flu., 0.5→ 0.5mg/kg diazepam + 10mg/kg Flu. i.p., 1→ 1mg/kg diazepam + 10mg/kg Flu. i.p., 2→ 2mg/kg diazepam + 10mg/kg Flu. i.p.).

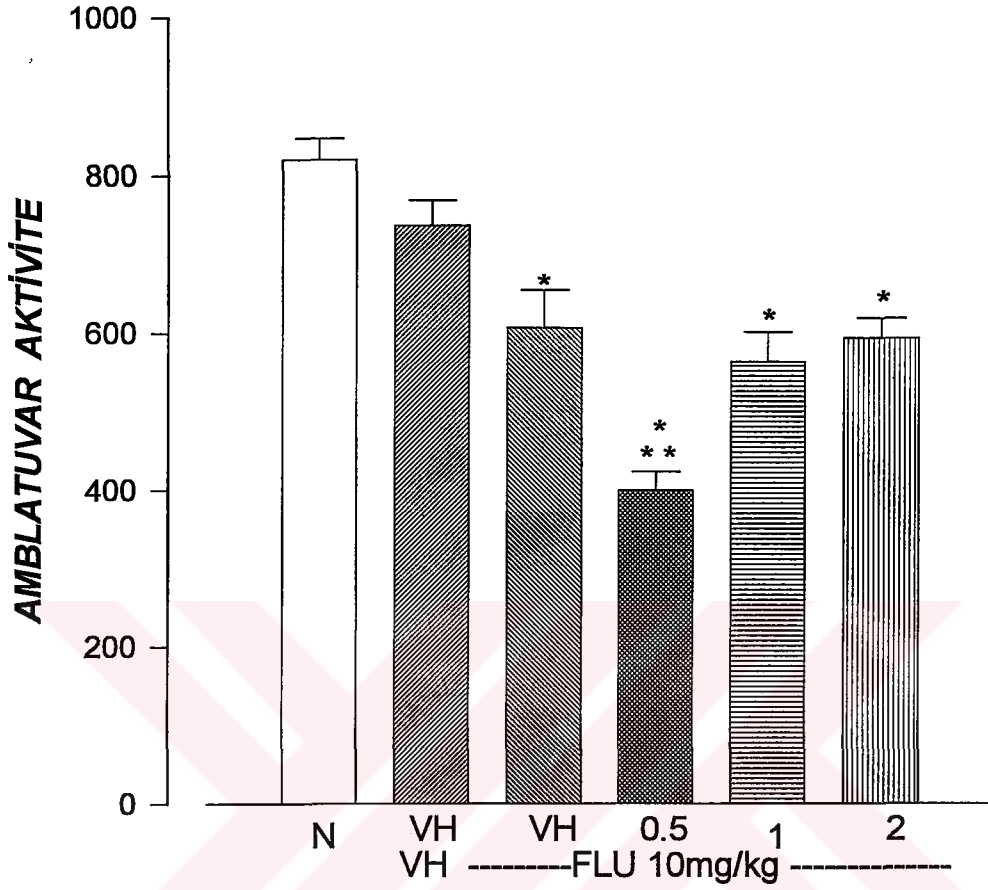
d-Diazepamın farklı dozları ile birlikte verilen Flumazenilin (10mg/kg) lokomotor aktivite cevaplarına etkisi :

Horizontal aktivitede diazepam ile oluşan anlamlı azalmalar, diazepamdan 15 dakika sonra verilen flumazenil tarafından ortadan kaldırılmıştır (Şekil 15). Kontrole göre hiçbir grup anlamlı değildir. Sadece, i.p. uygulama yapılmayan (N) grup ile diğer gruplar arasında fark vardır.



Şekil 16- Diazepam verildikten 15 dakika sonra 10mg/kg Flumazenil verilen sıçanların vertikal aktivitesi (N→ i.p. uygulama yok, VH→ vehikül + vehikül i.p., VH→ vehikül + 10mg/kg Flu., 0.5→ 0.5mg/kg diazepam + 10mg/kg Flu. i.p., 1→ 1mg/kg diazepam + 10mg/kg Flu. i.p., 2→ 2mg/kg diazepam + 10mg/kg Flu. i.p.). * $p < 0.01$ (kontrol grubundan farklı), ** $p < 0.01$ (10mg/kg flumazenil uygulanan gruplarından farklı)

Flumazenilin 10mg/kg dozu, kontrol grubuna göre vertikal aktivitede anlamlı bir azalma oluşturmuştur (Şekil 16). Aynı doz flumazenil, diazepamın 1mg/kg ve 2mg/kg dozlarında vertikal aktivitede yaptığı düşmeyi ortadan kaldırırken, 0.5mg/kg dozundaki düşmeyi ortadan kaldırmamıştır. Diazepamın 0.5mg/kg dozu 10mg/kg flumazenil ile birlikte verildiğinde vertikal aktiviteyi, hem kontrol grubundan hem de 10mg/kg flumazenil almış tüm gruplardan farklı olarak



Şekil 17- Diazepamın artan dozlarını takiben, 15dakika sonra verilen 10mg/flumazenilin amblatuvar aktivite üzerine etkileri (N→ i.p. uygulama yok, VH→ vehikül + vehikül i.p., VH→ vehikül + 10mg/kg Flu., 0.5→ 0.5mg/kg diazepam + 10mg/kg Flu. i.p., 1→ 1mg/kg diazepam + 10mg/kg Flu. i.p., 2→ 2mg/kg diazepam + 10mg/kg Flu. i.p.). * $p < 0.01$ (kontrol grubundan farklı), ** $p < 0.01$ (tüm gruplardan farklı).

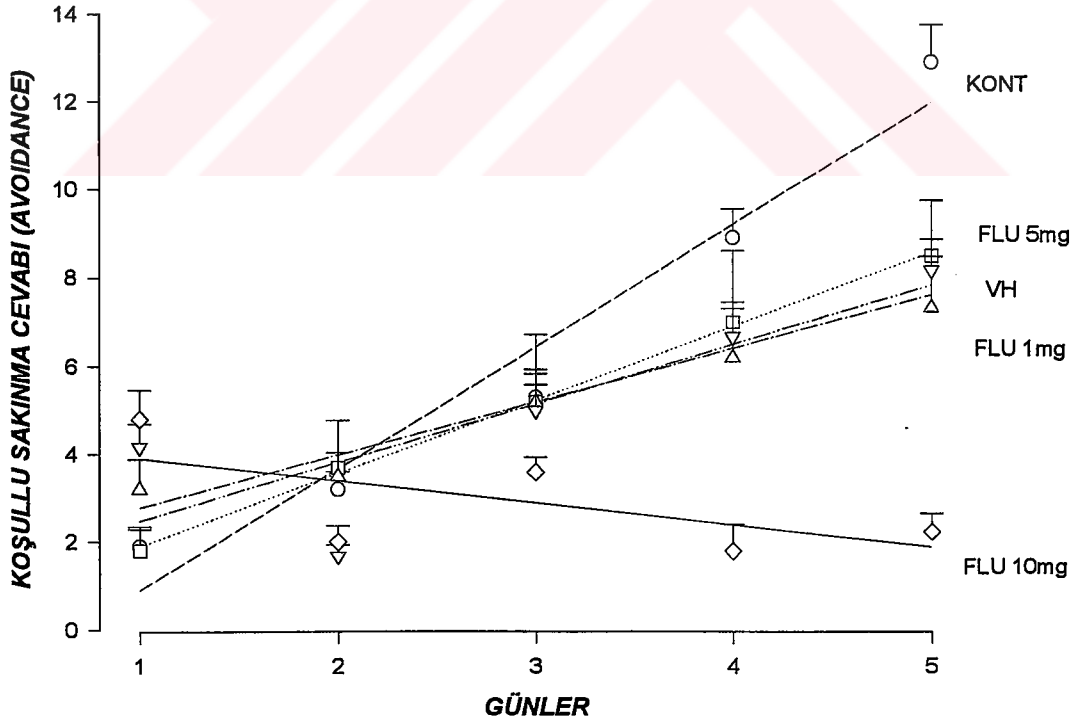
azaltmıştır ($F=32.30$, $p < 0.01$). VH ve 0.5mg/kg diazepam alan gruplar dışında, diğer gruplar birbirinden farklı değildir.

10mg/kg flumazenil dozu amblatuvar aktivitede, kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma yapmıştır. (Şekil 17). Ancak bu azalma tüm gruplarda (yalnız 10mg/kg flumazenil alan grup ile 0.5mg/kg diazepam, 1mg/kg diazepam ve 2mg/kg diazepam ile 10mg/kg flumazenil alan gruplar) anlamlı olarak

gözlenmiştir. 0.5mg/kg diazepam alan grup yine, flumazenil alan diğer tüm gruplardan daha fazla anlamlı bir azalma yapmıştır (F=20.42, p< 0.01). Amblatuvar aktivite, i.p. uygulama yapılmayan grupta, kontrol grubundan anlamlı olarak daha yüksektir.

e-Elektro-konvülsiv şok verilen sıçanlarda flumazenilin koşullu sakınma cevabına (acquisition) etkisi :

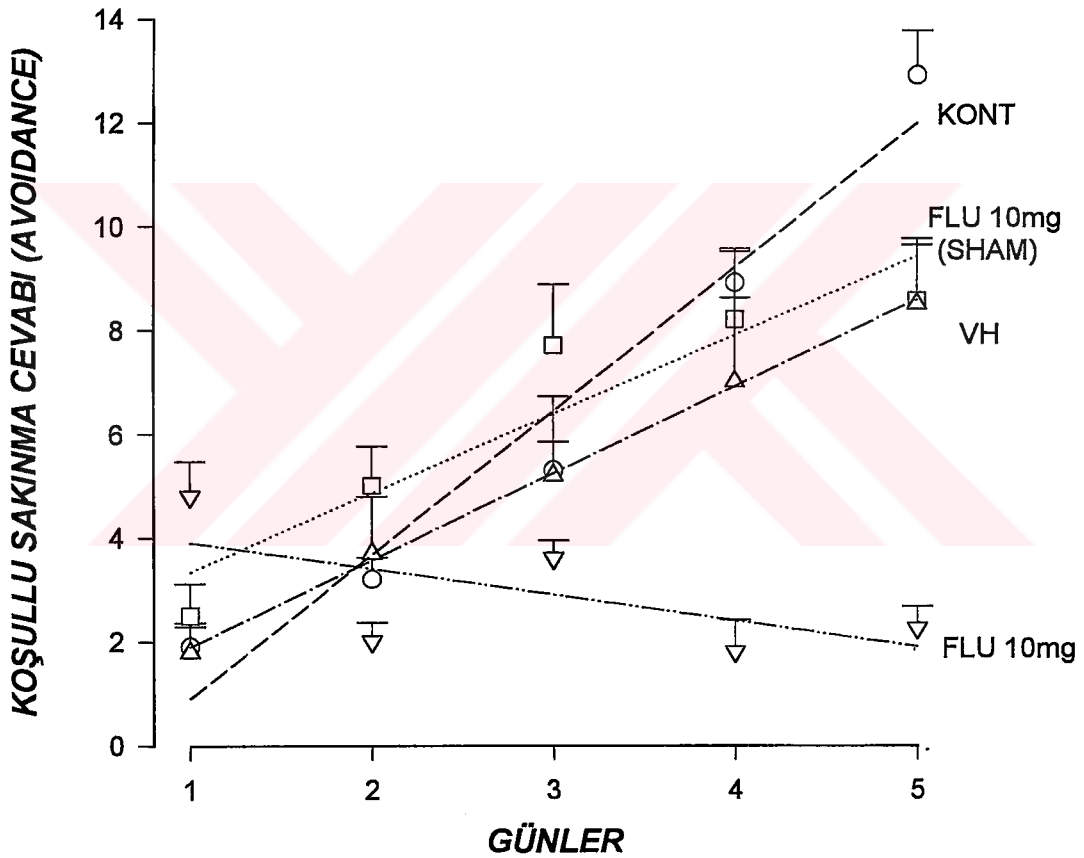
7 gün Elektro Konvülsiv Şok (ECSx7) verilmesini takiben vehikül alan grupta, koşullu sakınma cevabı kontrol (SHAMx7) grubuna göre, anlamlı olarak azalmıştır (t=2.519, p< 0.01) (Şekil 18). Yine ECSx7 uygulanan gruplarda, Flumazenilin 1mg/kg, 5mg/kg ve 10mg/kg dozları ile koşullu sakınma cevabında oluşan azalma kontrol grubuna göre anlamlıdır (sıra ile t=4.47, p<0.01, t=4.833, p<0.01 ve t=12.17, p<0.01). Flumazenilin bu artan dozları, ilk kontrol (SHAMx7) ile değil de, ECSx7 uygulanan ikinci kontrol



Şekil 18- Flumazenilin farklı dozlarının SHAMx7 ve ECSx7 uygulanan gruplarda koşullu sakınma cevabına (acquisition) etkisi. SHAMx7(kontrol), ECSx7 'den(Vh) farklı (t=2.519, p< 0.01). FLU 10mg, ECSx7 'den(Vh) farklı (t=5.127, p<0.01).

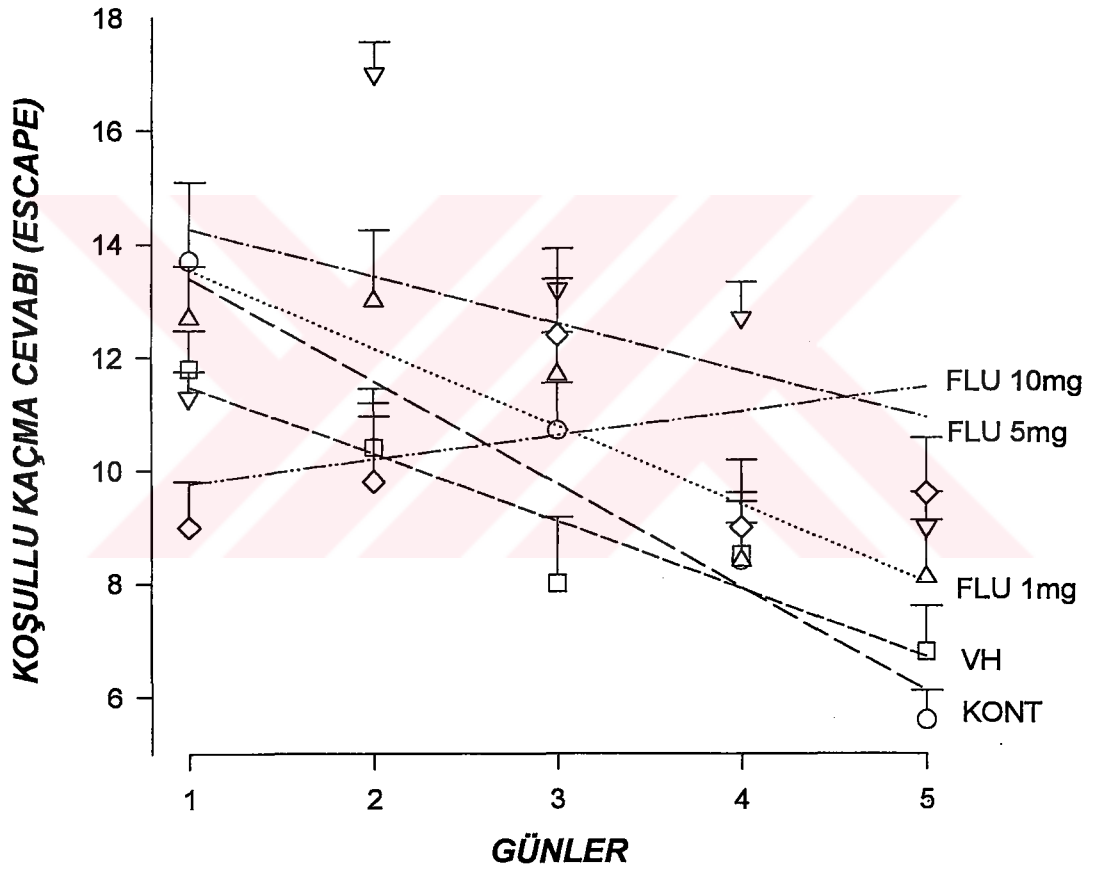
grubu ile karşılaştırıldığında, 1mg/kg ve 5mg/kg dozları bir değişiklik oluşturmazken, 10mg/kg dozu oldukça anlamlı bir şekilde koşullu sakınma cevabını azaltmıştır ($t=5.127, p<0.01$).

10mg/kg flumazenil alan SHAMx7 grubu, SHAMx7 'ye ait kontrol grubuna göre sakınma cevabını anlamlı olarak azaltıyor ($t=3.259, p<0.01$)(şekil 19). 10mg/kg flumazenil alan gruplar arasında ise, ECSx7 alan grupta koşullu sakınma cevabı anlamlı azalmıştır ($t= 5.488 p<0.01$).



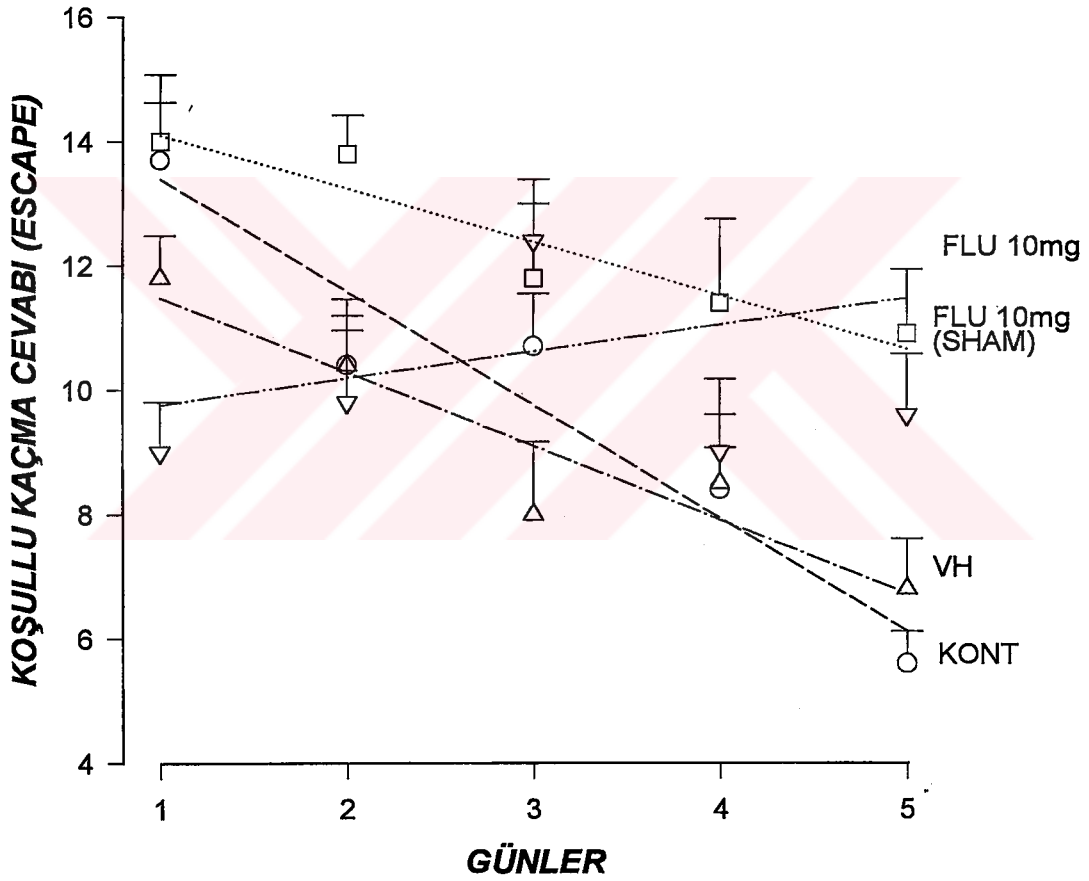
Şekil 19- Flumazenilin 10mg/kg dozunun SHAMx7 ve ECSx7 uygulanan gruplarda koşullu sakınma cevabı (acquisition) üzerine etkisi. FLU10mg(SHAM) KONT 'den farklı ($t=3.259, p<0.01$), FLU10mg(ECSx7) FLU10mg(SHAM)'dan farklı ($t=5.488 p<0.01$).

Vehikül alan ECSx7 ve SHAMx7 'nin kontrol grupları arasında koşullu kaçma cevabı yönünden fark yoktur (Şekil 20). SHAMx7 'ye ait kontrol grubu ile ECSx7 'ye ait flumazenil grupları (1mg/kg, 5mg/kg ve 10mg/kg) karşılaştırıldığında, flumazenilin 5mg/kg ve 10mg/kg dozları koşullu kaçma cevaplarında anlamlı bir artış göstermektedir (sıra ile $t=2.329$, $p<0.05$ ve $t=4.946$, $p<0.01$). ECSx7 'ye ait kontrol (vehikül) grubu ile karşılaştırıldığında ise, koşullu kaçma cevabını sadece flumazenilin 10mg/kg dozu anlamlı olarak artırmıştır ($t=3.664$, $p<0.01$).

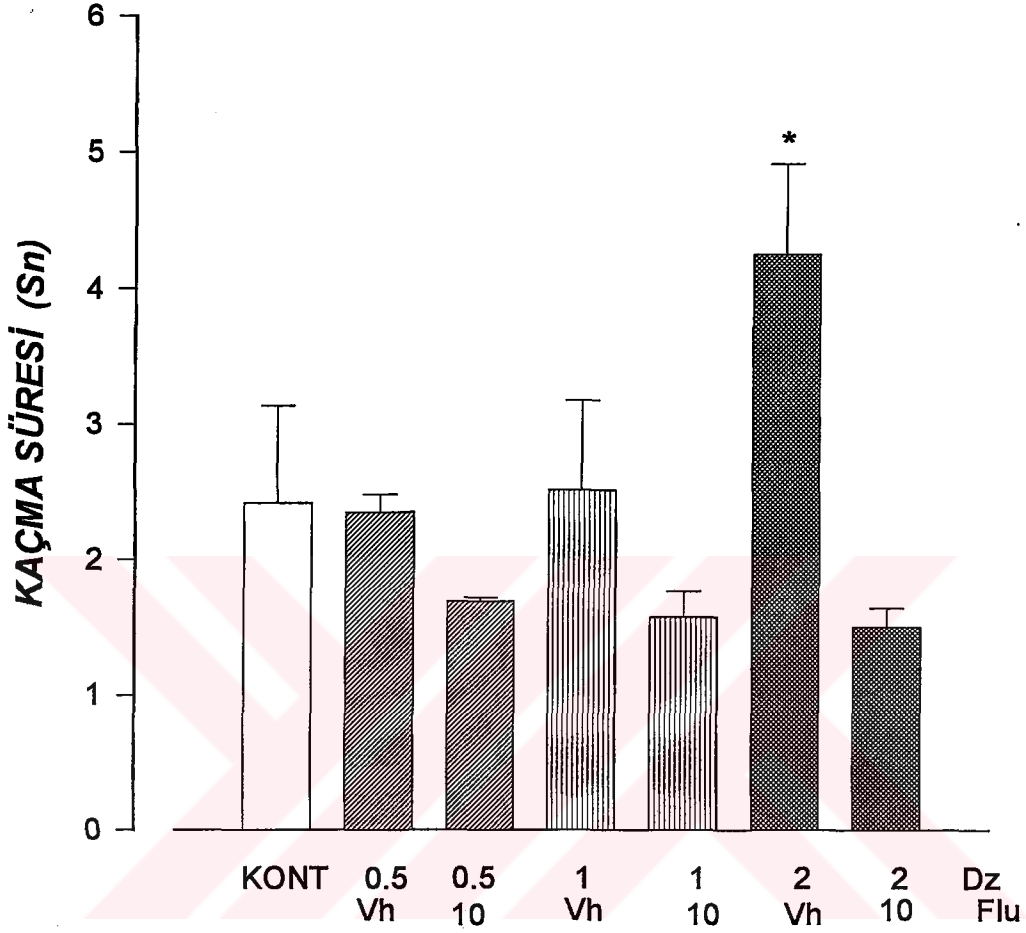


Şekil 20- Flumazenilin farklı dozlarının SHAMx7 ve ECSx7 uygulanan gruplarda koşullu kaçma cevabı üzerine etkisi. FLU10mg, ECSx7 'den(Vh) farklı ($t=3.664$, $p<0.01$).

Hem SHAMx7 uygulanan gruplarda, hem de ECSx7 uygulanan gruplarda da, flumazenilin 10mg/kg dozu, kendi kontrol gruplarına (SHAMx7 için KONT, ECSx7 için VH) göre koşullu kaçma cevabını anlamlı olarak yükseltmiştir ($t=2.214$, $p<0.05$ ve $t= 3.664$, $p<0.01$). SHAMx7 alan gruba göre ECSx7 alan grupta, Flumazenilin bu dozu, daha fazla anlamlı bir yükselme göstermiştir ($t=2.783$, $p<0.01$) (Şekil 21).



Şekil 21- Flumazenilin 10mg/kg dozunun SHAMx7 ve ECSx7 uygulanan gruplarda koşullu kaçma cevabı üzerine etkisi. FLU10mg(ECSx7) KONT 'den farklı ($t=3.664$, $p<0.01$), FLU10mg(ECSx7) ECSx7 'den(Vh) farklı ($t=2.78$, $p<0.01$).



Şekil 22- Diazepam ve flumazenilin kaçma süresine etkisi. * $p < 0.05$ (tüm gruplardan farklı)

Diazepam ile kaçma reaksiyon süresi artmaktadır (Şekil 22). Diazepamın bu etkisini 10mg/kg flumazenil anlamlı bir şekilde ortadan kaldırmaktadır ve 10mg/kg flumazenil tüm gruplarda kaçma süresini azalmaktadır.

V- TARTIŞMA

A - Flumazenilin koşullu sakınma ve kaçma cevapları (acquisition) üzerine etkileri

Benzodiazepin antagonisti flumazenilin, bizim çalışmamızdan farklı bir takım öğrenme ve bellek testlerinde de pozitif etkili olduğu gösterilmiştir (35,57,102). Bulgularımız benzodiazepin antagonisti flumazenilin koşullu sakınma cevabını pozitif olarak etkilediği izlenimi vermesine rağmen, burada gözlenen artışlar anlamlı değildir. Bu farklılık muhtemelen eğitim süresinden ve uygulanan modellerden kaynaklanabilir (117). Ayrıca 0.5mg/kg diazepam ile oluşturulan koşullu sakınma cevabındaki azalma da 10mg/kg flumazenil ile düzeltilmiştir. Ancak bu da istatistiksel bakımdan anlamlı seviyede bir düzelme değildir.

Çalışmamızda test süresinin 5 gün olmasına bağlı olarak ortaya çıkan "duruma bağlı" (state-dependent) öğrenme (94) nedeniyle, cevapların (acquisition) flumazenilin lehine artış göstermesi beklenirdi. Ancak her üç grup koşullu sakınma testinde kontrole göre anlamlı bir artış görülmedi.

Koşullu sakınma ve kaçma cevaplarının yorumlanması, genellikle bunların karşılaştırılması şeklinde yapılır (115). Antidepresanlar, narkotik analjezikler ve nöroleptikler sakınma cevabını bozarken, kaçma cevabını etkilemezler. Benzodiazepinler ve barbituratlar ise koşullu cevapları tamamen bozarlar (52,93). Çalışmamızda diazepam ile elde edilen bulgular bu literatürleri destekler niteliktedir. Gözlemlerimize göre, diazepam ile koşullu sakınma cevabı azalırken, kaçma cevabı artmaktadır. Flumazenil ise koşullu kaçma cevabını azaltırken, sakınma cevabını değiştirmemiştir. Ancak, farklı diazepam dozları ile koşullu sakınma cevabında oluşturulan bu azalmalardan, sadece 0.5mg/kg diazepamı ait azalma, benzodiazepin antagonisti flumazenil (10mg/kg) ile bloke edilmiştir. Kaçma cevaplarındaki azalmanın anlamlı düzeye ulaşamaması flumazenilin belirgin bir anksiyolitik etkisinin olmadığına işaret etmektedir.

Flumazenilin yüksek dozlarında benzodiazepin benzeri parsiyel agonistik etkileri de vardır (34,92). İlacın bu dozlarında uyanıklılık ve dikkati azaltması beklenir. Bu durum koşullu sakınma cevabını benzodiazepinler gibi azaltacağından, doğal olarak sedatif etki ön plana çıkacaktır. Bu dozların ayrıca, koşullu sakınma cevabını azaltması, koşullu kaçma cevabını ise artırması beklenir. Bununla beraber, bizim bulgularımız, çalışmada kullanılan en yüksek dozunda (20 mg/kg) flumazenilin böyle bir aktivitesi olmadığına işaret etmektedir. Bunun nedeni, çalışmamızda

kullandığımız denek sayısının yetersizliği veya çalışmalar arası bazı yöntem farklılıkları olabilir.

Grup

Sayısal
arlılık

Flumazenilin öğrenme ve belleği arttırdığı şeklindeki bulgular direk bir etkiden ziyade, benzodiazepin reseptörlerinin antagonize edilmesinden dolayı öğrenme ve bellekle ilgili (acquisition gibi) işlemlerin kolaylaştırılmasından kaynaklanabilir (109). Bu dolaylı etki, endojen benzodiazepin reseptör ligandlarının antagonize edilmesi ile oluşmaktadır. N-butil- β -karbolin 3-karboksilat ve N-desmetildiazepam gibi endojen benzodiazepinlerin insan ve sıçan beyinde varlığının gösterilmesi bu antagonizmanın organizmada doğal olarak da mevcut olduğunu göstermektedir (28).

Organizmadaki bu doğal endojen maddeler benzodiazepin reseptörlerinin agoistleri ve invers agonistleridir (27,85). Dolayısıyla benzodiazepinlere hem benzer hem de ters farmakolojik etkilere sahiptir (102,108). İvers agonistlerin bu ters etkileri anksiyete ve konvülsiyon oluşturuıcı etkiler ile bazı öğrenme ve bellek testlerini kolaylaştırıcı etkilerdir (57,93,102,109,138). Yükseltmiş artı labirentin etrafı açık bölümünde harcanan süre azaltılarak, anksiyete oluşturuıcı etkileri sıçanlarda tesbit edilmiş ve bu etkileri düşük doz flumazenil tarafından da bloke edilmiştir (56,90). Stres kullanılan testlerde (zorlu yüzme ve yükseltmiş artı labirent gibi) benzodiazepin bağlanması azalması, beyinde strese bağlı endojen benzodiazepin ligandlarının salıverilmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir (110). Agonistlerinki ise, benzodiazepin benzeri (anksiyolitik ve antikonvülsan gibi) etkilerdir.

Anksiyete ve strese cevabı düzenlemede rol onayan bu endojen benzodiazepin ligandları organizmada bir denge halindedir (87,34,86). Sakınma cevaplarının kazanılması sırasında oldukça fazla strese maruz kalınması benzodiazepin benzeri maddelerin salıverilmesinin artırmaktadır. Bu nedenle sakınma cevaplarının yorumlanmasında, flumazenilin antagonistik etkisinin önemi daha da artmaktadır.

Flumazenilin anksiyojenik olmayan düşük dozunun (5mg/kg), sıçanlara eğitim öncesi verildiğinde, koşullu sakınma ve inhibitör sakınma cevabını sıçanlarda artırdığını gösteren çalışmalar da bulunmakla beraber (65,102) test yöntemleri bizim kullandığımız modelden farklıdır. Bunun yanında eğitim öncesi endojen ters benzodiazepin ligandları verilerek yapılan inhibitör sakınma testlerinin de öğrenmeyi artırması (102) flumazenil ile aralarında bir benzerlik bulunduğunu göstermektedir. Düşük doz flumazenil (2mg/kg), invers agonistlerin öğrenmedeki pozitif etkilerini önlemektedir (57). Her iki bileşik de antagonistik özellikleri nedeni ile öğrenme ve bellek fonksiyonlarını pozitif olarak test tipine göre etkileyebilmektedir. Ancak eğitim

sonrası verilen aynı doz flumazenil, retansiyon gibi bellek fonksiyonlarında etkisiz bulunmuştur (102). Ayrıca kronik flumazenilin sıçanlarda araştırma (exploring) davranışını artırdığı tesbit edilmiştir (135). Bu nedenle eğitim öncesi verilen flumazenilin muhtemelen endojen benzodiazepinlerin agonistik etkisini önleyerek anksiyojenik etkiye bağlı dikkat ve uyanıklığı artırması ile pozitif etkilere yol açabileceği de düşünülebilir.

Benzodiazepinlerin sedatif etkisine tolerans çabuk (3 gün) geliştiği halde (32,40), amnezik etkisine toleransın çok daha geç (15 gün) gelişmesi, henüz tam açıklığa kavuşmamış bazı mekanizmaların varlığını da düşündürmektedir (55).

Sonuç olarak çalışmamız bir kazanma (acquisition) testi olması nedeni ile flumazenilin öğrenme üzerine pozitif etkileri şüphelidir. Gözlediğimiz bazı anlamlı etkiler, endojen benzodiazepinlerin antagonize edilmesine bağlı olabilir.

B - Diazepam ve flumazenilin lokomotor aktivite üzerine etkileri

Çalışmamızda, diazepamın 0.5mg/kg dozu tüm gruplarda lokomotor aktiviteyi anlamlı olarak azaltırken, 1mg/kg ve 2mg/kg dozu doza bağımlı bir lokomasyon azalması sergilemektedir. Ancak lokomotor aktivite çalışması, koşullu sakınma ve kaçma testlerinden sonra yapılmıştır. Bu testlerin anksiyojenik olması yanısıra motor cevaplar gerektirmesi sonuçları etkilemiş olabilir. Yine diazepamın bu etkileri, flumazenil ile horizontal aktivitede tamamen önlenirken, amblatuvar aktivitede böyle bir etki gözlenmemiştir. Vertikal aktivitede ise flumazenil, diazepamın 1mg/kg ve 2mg/kg dozlarında oluşan azalmayı önlerken 0.5mg/kg dozundaki azalma yine devam etmektedir. Diazepamın çok düşük dozları lokomasyonda artış göstermekte,, ancak bu artış özellikle 0.5mg/kg altındaki dozlarda ve farelerde görülmektedir (74). Bu artışın da katekolaminerjik ve dopaminerjik sistemin aktivitesinin artmasına bağlı olduğu düşünülmektedir. Yüksek dozlarda görülen doza bağlı azalma ise sedasyona, dolayısıyla GABAerjik sistemin aktivasyonuna bağlı olabilir.

C - Elektro-konvülsiv şok verilen sıçanlarda flumazenilin koşullu sakınma ve kaçma cevaplarına (aquisition) etkileri

Bulgularımız, SHAMx7 alan kontrol grubu ile ECSx7 alan kontrol grubu arasında anlamlı bir farkın bulunduğunu göstermesi yanında, ECSx7 uygulanan gruplarda flumazenilin koşullu sakınma cevabını oldukça anlamlı şekilde azalttığına da işaret etmektedir. ECS ile ilgili bir tek koşullu sakınma çalışmasına rastlanmış ve bu çalışmada da kazanılmış bilginin (acquisition) kaybolması veya sönmesi (extinction) değerlendirilmiştir (46). 1985 de yapılan bu çalışmada SHAMx7 alan grubu ile ECSx7 alan grubun koşullu sakınma cevapları arasında bir fark bulunmamıştır. Ancak bu çalışma 4 gün devam etmiş ve sadece 4. gündeki sakınma cevapları karşılaştırılmıştır. Bizim çalışmamız ise 5 gün devam etmiş ve tüm günler değerlendirilmiştir. 4. gündeki sonuçlar değerlendirildiğinde, bizim çalışmamızda da anlamlı fark bulunmamaktadır. Ayrıca kullanılan sıçanların türü ve ECS nin şiddetleri de bizimkinden farklıdır.

Daha önce yapılan ECS ile ilgili çalışmalar genelde pasif sakınma cevaplarının retansiyonlarını değerlendirilmekte ve ECS uygulamasında da farklı protokoller izlemektedir (13,66,68, ,69,104). Pasif sakınma cevapları da (acquisition) ECS ile değişmektedir (71). Yeni kazanılan bilgilerin kaybolması şeklinde bir özellik gösteren ECS'nin, 24 saatlik intervaller nedeniyle azalması zaten beklenir. Ayrıca bu grubun koşullu kaçma cevapları ve lokomotor aktivitelerinde de farklılık bulunmamıştır. Bu da azalmanın doğrudan öğrenme ve bellek ile ilişkili olmasını kuvvetlendirmektedir.

Çalışmamızda flumazenil 10mg/kg dozda, koşullu sakınma cevabını anlamlı olarak azaltırken, koşullu kaçma cevabını anlamlı olarak yükseltmiştir. Flumazenilin bu dozunun, tam tersine, koşullu sakınma cevabını artırması veya değiştirmemesi beklenirdi (65). Aynı dozun koşullu kaçma cevabını artırması ise, benzodiazepin-barbitürat benzeri etkilerinin varlığına işaret etmektedir (52). Ancak flumazenilin, diazepam benzeri etkisinin ortaya çıkması için yüksek dozlarda (20-50mg/kg) kullanılması gerekirdi (100,136).

Flumazenilin parsiyel ters agonistik özelliğinin bulunması düşük maksimal etki göstermesine yol açabilir ki, bunun için yüksek doz gerekir. Bu agonistik etkiler için olası başka bir durum da, reseptör yüzdesinin büyük bir kısmının işgal edilmesi (37,44) olabilir. Çalışmamızda SHAMx7 alan gruplara aynı doz flumazenil

verildiğinde koşullu sakinme cevabının azalmaması, yüksek doza bağlı benzodiazepin benzeri agonistik etkisinin yüksek dozdan kaynaklanmadığını göstermektedir.

Flumazenilin bu dozu ECS'ye bağlı olarak, benzodiazepin benzeri agonistik etki oluşturabilir. ECS verilen sıçanlarda, 3H-Diazepam ile yapılan bağlanma çalışmalarında benzodiazepin reseptörlerinin yükselmiş (upregulation) olduğu gösterilmiştir (42), ancak bu durum gözlediğimiz agonistik etkiyi açıklamamaktadır. ECS bilinmeyen bir mekanizma ile benzodiazepin reseptörlerinin flumazenile hassasiyetini artırarak bağlanmasını artırmış veya reseptör işgalinin yüzdesini artırmış da olabilir.

Flumazenilin direk antagonist özelliğine bağlı olarak da benzodiazepin reseptörlerini (up-regulation) veya reseptör hassasiyetini artırabilir. Böyle bir çalışma bulunmakla beraber flumazenil 14gün 4mg/kg dozda verildiğinde buna benzer bir artış oluşturulmuştur (134)

ECS'nin kolinerjik sistem başta olmak üzere birçok sistem ile etkileşmesinden dolayı, bu etki (koşullu sakinme cevabının azalması ve kolşulu kaçma cevabının artması) ECS'ye bağlı olarak başka sistemlerde oluşan değişikliklerden de kaynaklanabilir. Kolinerjik transmisyonadaki azalmaya bağlı olarak bir öğrenme ve bellek bozukluğu da olabilir. Mevcut bulgularımız ve literatür çerçevesinde bu etkiyi açıklayabilmemiz zordur. Bunun için ilave çalışmalara ihtiyaç vardır.

Sonuç olarak tüm bulgularımız, flumazenilin direk etkisinden ziyade, benzodiazepin antagonizmasına dayanan dolaylı bir etki sergilemektedir. Öğrenmenin olmaması, bunun yanında flumazenil ile lokomotor cevaplarda diazepamın etkisinin kalkması ve kaçma reaksiyon sürelerinin flumazenil ile azalması; etki şeklinin sedayonun kalkmasına veya anksiyojenik etkinin hakim olmasına göre pozitif yöne kayabileceğini göstermektedir. ECS ise flumazenilin etkisini tamamen değiştirmekte, benzodiazepin benzeri etkiler oluşturmaktadır. Bütün bunlar, flumazenilin öğrenme ve bellekteki pozitif etkilerinin benzodiazepin antagonizmasına bağlı olarak ortaya çıktığı izlenimini vermektedir.

ÖZET

Anksiyolitik ve antikonvülsan olarak oldukça sık kullanılan, benzodiazepinler öğrenme ve bellek bozukluklarına yol açmaktadır. Bu nedenle çalışmamızda benzodiazepin antagonisti flumazenilin (Ro 15-1788) öğrenme ve belleği artırıp artırmadığını inceledik. Flumazenilin etkisini mekik kutusunda (shuttle-box) bir öğrenme testi olan koşullu sakınma yöntemi ile araştırdık. Vehikül , flumazenil (5, 10, 20mg/kg i.p.) ve diazepam (0.5, 1, 2mg/kg i.p.) verilen sıçanların, koşullu sakınma cevaplarını kazanmaları test edildi. Flumazenil verilen gruplarda sakınma cevabını kazanma performansları değişmedi, ancak diazepam verilen gruplarda azaldı. Diazepam ve flumazenil birlikte verilerek test edildiğinde ise, flumazenilin kendi etkisinin olmamasına rağmen, diazepam ile sakınma cevabında oluşan azalmayı önlemiştir.

İkinci olarak, flumazenilin etkisini öğrenme ve bellek bozucu etkilere sahip olan elektrokonvulzif şok uygulanan sıçanlarda araştırdık. Sıçanlara günde bir defa 7 gün şok verilmiştir. Son şoktan 24 saat sonra, flumazenil (1, 5, ve 10mg/kg) ve vehikül verilen sıçanlar koşullu sakınma testine alınmıştır. Flumazenilin 10mg/kg dozu, ECSx7 ve SAHMx7 alan kontrol grupları ile karşılaştırıldığında koşullu sakınma cevaplarını anlamlı olarak bozmuştur veya azaltmıştır. Bulgularımız flumazenil ile oluşturulan benzodiazepin antagonizmasının öğrenmeyi artırmadığını, ECSx7 uygulanan gruplarda ise diazepam benzeri etki oluşturduğunu gösterdi.

SUMMARY

Benzodiazepines, a class of drugs widely employed as anxiolytics and anticonvulsants, can induce impairments of learning and memory. The purpose of the present investigation was to determine if a benzodiazepine receptor antagonist, flumazenil (Ro 15-1788), could enhance learning and memory. We investigated the effects of flumazenil on learning task in a conditioned avoidance test. Rats were tested for acquisition of a conditioned avoidance response following vehicle, flumazenil (5, 10, 20mg/kg i.p.) and diazepam (0.5, 1, 2mg/kg i.p.). Acquisition performance was not increased in flumazenil-treated rats when compared with vehicle-treated rats, but it was decreased in diazepam-treated rats. Diazepam and flumazenil also tested in combination for their influence on acquisition performance. Flumazenil had no effect by itself, but prevented the impairment produced by diazepam. Secondly, we investigated the effects of flumazenil on the memory-impairing action of convulsant electroshock in rats. Rats were administered one electroconvulsive shock daily for 7 days (ECSx7) and were tested also for acquisition of a conditioned avoidance response following vehicle or flumazenil (1, 5, 10mg/kg i.p.), 24 hours after the last ECS-treatment. Acquisition performance was impaired in flumazenil (10mg/kg) treated rats when compared with ECSx7 and vehicle-treated rats or SHAMx7 and flumazenil (10mg/kg) treated rats. These effects of flumazenil suggest that antagonism of benzodiazepine receptors does not lead to increased learning performance but leads to diazepam-like effect in ECSx7 treated rats.

VI- KAYNAKLAR

- 1--**Agmo A. ve Giardano M.** : The locomotor-reducing effects of GABAergic drugs do not depend on the GABA-A receptor, *Psychopharmacology (Berlin)*, 87:51-54, 1985.
- 2-**Agmo A., Pruneda R., Guzman M. ve Gutierrez M.** : GABAergic drugs and conflict behavior in the rat: Lack of similarities with the actions of benzodiazepines, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.*, 344:314-322, 1991.
- 3-**Alvarez E. O. ve Banzan M.** : Behavioral effects of GABA in the hippocampal formation: functional interaction with histamine, *Behavioral Brain Research.*, 37:133-143, 1990.
- 4-**Arendt T., Allen Y., Sinden J., Schugens M.M., Marchbanks R. M., Lantos P.L. ve Gray J.A.** : Cholinergic-rich brain transplants reverse alcohol- induced memory deficits, *Nature*, 332:448-450, 1988.
- 5-**Artola A. ve Singer W.** : Long-term potentiation and NMDA receptors in rat visual cortex, *Nature*, 330:649-652, 1987.
- 6-145-**Austin M. C. ve Kalivas P.W.** : Enkephalinergic and GABAergic modulation of motor activity in the ventral pallidum, *J.Pharmacol. Exp. Ther.*, 252 :1370-1377, 1990.
- 7-**Baddley A. D. ve Warrington E. K.** : Amnesia and the distinction between long- and short-term memory, *J. Verb. Behav.* 9:176-189, 1970.
- 8-10-**Baddeley A. D.** : Implications of neuropsychological evidence for theories of normal memory, *Philos Trans. R. Soc. Lond. (Biol.)*, 298: 59-72, 1982.
- 9-**Barbee J. G.** : Memory, benzodiazepine, and anxiety: Integration of theoretical and clinical perspectives, *J. Clin. Psychiatry*, 54(10 suppl):86-101, 1993.
- 10-**Bartus R. T., Dean R. L., Beer B. ve Lippa A. S.** : The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction: a critical review, *Science*, 217:408-416, 1982.
- 11-**Benavides F., Guilloux D. E., Allam A., Uzan J., Mizoule J., Renault M. C., Dubroeuq M. C., Guermy C. ve Le Fur G.** : Opposite effects of an agonist, Ro

5-4864, and an antagonist, PK 11195 of the peripheral type benzodiazepine binding site on audiogenic seizure in DBA/J2 mice, *Life science*, 34:2613-2620, 1984.

12-Bergstom D. A. ve Kellar K. J. : Effect of electroconvulsive shock on monoamine receptor binding sites in rat brain, *Nature*, 278:464-466, 1979.

13-Bhattacharya S. K., Upadhyay, S. N. ve Jaiswal A. K. : Effect of piracetam on electroshock induced amnesia and decrease in brain acetylcholine in rats, *Indian Journal of Experimental biology*, 31:822-824, 1993.

14-Bidzseranova, A. Penke B., Toth G. ve Telgdy G. : The effects of atrial natriuretic peptide on electroconvulsive shock-induced amnesia in rats. Transmitter-mediated action, *Neuropeptides*, 19: 103-106, 1991.

15-Black A. H., Nadel L. ve O'keefe J. : Hippocampal function in avoidance learning and punishment, *Psychological Bulletin*, 84:1107-1129, 1977.

16-Blanchard D. C. ve Blanchard R. J. : Innate and conditioned reaction to threat in rats with amygdaloid lesion, *Journal of Comparative and Physiological Psychology*:81:281-290, 1972.

17-Brandt A. L. ve Oakes F. D. : Preanesthesia medication:double blind study of a new drug,diazepam, *Anesth. Analg. ,* 44:125, 1965

18-Bruno G., Mohr E., Gillespi M., Fedio P. ve Chase T. N. : Muscarinic agonist therapy of Alzheimer's disease. A clinical trial of RS-86, *Arch. Neurol*, 43:659-662,1986.

19-Buschke H. ve Fuld P. A. : Evaluating strength, retention, and retrieval in disordered memory and learning, *Neurology*, 24:1019-1025, 1974.

20-Brogden R. N. ve Goa K. L. : Flumazenil, *Drugs*, 35:448-467, 1988.

21-Caccia S., Carli M., Garattini S., Poggesi E., Rech R. ve Samanin R. : Pharmacological activities of clobazam and diazepam in the rat. Relation to drug brain level. *Arch. Int. Pharmacodyn.*, 243:275-283, 1980.

22-Churchill L., Bourdeles M., Austm M.C., Lolait S. J., Mahain L. C., O'carroll A. M. ve Kalivas P.W. : GABA_A receptors containing α and β subunits are mainly localized on neurons in the ventral pallidum, *Synapse*, 8:75-85, 1991.

23-Clarke R.P.F., Eccersley P.S., Frisby J.P. ve Thornton J.A. : The amnesic effect of diazepam, *Br. J. Anesthesiol.*, 42:690-697, 1970

24-Cohen E. ve Wurtman R. J. : Brain acetylcholine:increase after systemic choline administration, *Life Sci.* 16:1095-1102, 1975.

- 25-Cole S. O.** : Effects of benzodiazepines upon acquisition and performance: a critical assessment, *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 10:265-272, 1986.
- 26-Curran H. V.** : Tranquillising memories : A review of the effects of benzodiazepines on human memory, *Biological. Psychology*, 23:179-213, 1986.
- 27-De blas A. L. Park D. ve Friedrich P.:**Endogenous benzodiazepine-like molekules in the human, rat and bovine brain studied with a monoclanal antibody to benzodiazepines, *Brain Res.* 413:275-284, 1987.
- 28-De Robertis E., Pena C., Paladini A. C. Ve Medina J. H.** : New development on the search for the endogenous ligands of central benzodiazepine receptors, *Neurochem. Int.*, 13:1-11, 1988.
- 29-Devanand D. P., Dwork A. J., Hutchison E. R. Bolwik T. G. ve Sackeim H. A.** : Does ECT alter brain structure?, *Am. J. Psychiatry*, 151(7):957-970, 1994.
- 30-Egbe P. C.** : Locomotor effect of amperozide, antagonism of amphetamine-induced locomotor stimulation, *Arzneim.-Forsch./Drug Res.*, 39:1223-1224, 1989.
- 31-File S. E., Lister R. G. ve Nutt D. J.** : The anxiogenic action of benzodiazepine antagonists, *Neuropharmacology*, 21:1033-1037, 1982.
- 32-File S. E.** : Recovery from lorazepam tolerance the effects of a benzodiazepine antagonist (Ro 15-1788) on the development of tolerance, *Psychopharmacology*, 77:284-288, 1982.
- 33-File S. E.** : Behavioural effects of pentylenetetrazole reversed by chlordiazepoxide and enhanced by RO 15-1788, *Naunyn Schmiedberg's Arch. Pharmacol.*, 326:129-131, 1984.
- 34-File S. E. ve Pellow S.** : Intrinsic actions of the benzodiazepine receptor antagonist Ro 15-1788, *Psychopharmacology (Berlin)*, 88:1-11, 1986.
- 35-File S. E. ve Pellow S.** : Low and high doses of benzodiazepine receptor inverse agonists respectively improve and impair performance in passive avoidance but do not affect habituation, *Behav. Brain. Res.*, 30:31-36, 1988.
- 36-Gardner C. R.** : A review of recently-developed ligands for neuronal benzodiazepine receptors and their pharmacological activities, *Prog. Neuro-Psychopharmacol. & Biol. Psychiat.*, 16:755-781, 1992.
- 37-Gardner C.R.** : Functional in vivo correlates of the benzodiazepine agonist - inverse agonist continuum, *Prog. Neurobiol.*, 31:425-476, 1988.
- 38-Ghoneim M.M. ve Mewaldt S.P.** : Effects of diazepam and scopolamine on storage, retrieval and organisational processes in memory, *Psychopharmacologia* 44:257-262, 1975.

- 39-Ghoneim M. M. ve Mewaldt E. K. :** Studies on human memory: The interactions of diazepam, scopolamine and physostigmine, *Psychopharmacology*, 52:1-6, 1977.
- 40-Ghoneim M.M., Mewaldt S. P. ve Berie J. L. :** Memory and performance effects of single and 3-week administration of diazepam, *Psychopharmacology*, 73:147-151, 1981.
- 41-Gluck M. A. ve Granger R. :** Computational models of the neural bases of learning and memory, *Annu. Rev. Neurosci.* 16:667-706, 1993.
- 42-Gulati A., Srimal R. C., Dhavan B. N., Agarwal A. K. ve Seth P. K. :** Upregulation of brain benzodiazepine receptors by electroconvulsive shocks, *Pharmacol. Res. Commun.* 18 (6): 581-589, 1986.
- 43-Haefley W., Kulcsar A., Möhler H., Pieri L., Polc P., Schaffner R.** Possible involvement of GABA in the central actions of benzodiazepines, *Adv. Biochem. Psychopharmacol*, 14:131-151, 1975.
- 44-Haefely W. :** The biological basis of benzodiazepine actions, *The benzodiazepine current standards for medical practice*, Smith D. E. and Wesson D. R., Lancaster, MTP press, 7-41, 1985.
- 45-Haefley W. ve Hunkeler W. :** The story of flumazenil, *Eur. J. Anaesthesiol.*, 2 Suppl:3-14, 1988.
- 46-Hamburger-Bar R., Kindler S., Bertish T. ve Lerer B. :** Conditioned avoidance acquisition and extinction following repeated electroconvulsive shock: Strain effect and response to vasopressin, *Biol. Psychiatry*, 22:593-602, 1987.
- 47-Haslett W. H. K. ve Dundee J. W. :** Studies of drugs given before anaesthesia: XIV: two benzodiazepine derivatives, chlordiazepoxide and diazepam, *Br. J. Anaesth.*, 40:250, 1968.
- 48-Haubrich D. R., Wang P. F. L., Clody D. E. ve Wedeking P. W. :** Increase in rat brain acetylcholine induced by choline or deanol, *Life Sci.*, 17:975-980, 1975.
- 49-Heise G. A. ve Mc Connell H. :** Differences between chlordiazepoxide-type and chlorpromazine-type action in trace avoidance, *Proceeding of the 3rd World Congress of Psychiatry*, 2:917, 1961.
- 50-Heise G. A. :** Behavioral methods for measuring effects of drugs on learning and memory in animals, *Med. Res. Rev.*, 4:535-558, 1984.
- 51-Heise G. A. :** Facilitation of memory and cognition by drugs, *TIPS*, 8:65-68, 1987.
- 52-Herz A :** Drugs and the conditioned avoidance response, *Int. Rev. Neurobiol.*, 2:229-277, 1960.

- 53-Hunkeler W., Möhler H., Pieri L., Polc P., Bonetti E. P., Cumin R., Schaffner R. ve Haefely W. :** Selective antagonists of benzodiazepines, *Nature*, 290:514-516, 1981.
- 54-Holmes P. V. ve Drugan R. C. :** Differential effects of anxiogenic central and peripheral benzodiazepine ligands in test of learning and memory, *Psychopharmacology*, 104:249-254, 1991.
- 55-Ishira S., Hiramatsu M., Kameyama T. ve Nabeshima T. :** Development of tolerance to amnesic effects of chlordiazepoxide in relation to GABAergic and cholinergic systems, *European Journal of Pharmacology*, 230: 313-320, 1993.
- 56-Ízquierdo I., Cunha C. ve Medina J. H. :** Endogenous benzodiazepine modulation of memory processes, *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 14:419-424, 1990.
- 57-Ízquierdo I., Pereira M. E. ve Medina J. H. :** Benzodiazepine ligand influences on acquisition: Suggestion of an endogenous modulatory mechanism mediated by benzodiazepine receptors. *Behav. Neural. Biol.*, 54:27-41, 1990. αα
- 58-Izquierdo I., Medina J. H., Da-Cunha C., Wolfman C., Jerusalinsky D. ve Ferreira M. B. C. :** Memory modulation by brain benzodiazepines, *Brazilian J. Med. Biol. Res.*, 24:865-881, 1991.
- 59-Jackson H. C. ve Nutt D. J. :** Effects of benzodiazepine receptor inverse agonists on locomotor activity and exploration in mice, *European journal of pharmacology*, 221:199-203, 1992.
- ✕ **60-Jarrard L. E. :** On the role of hippocampus in learning and memory in the rats, *Behavioral and Neural Biology*, 60:9-26, 1993.
- 61-Jones D.M. Jones M.E.L., Levis M.J. ve Spriggs T.L.B. :** Drugs and memory : effects of low doses of nitrazepam and Hyoscine on retention. *Br. J. Clin. Pharmacol*, 7: 479-483, 1979.
- 62-Kandel E. R. ve Genes L. :** Nerve cells, and the remembrance of things past, *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.*, 1:103-125.
- 63-Krauth J. ve Blaeser S. J. :** Can a shuttle-box computer analog be used to condition human avoidance behavior. *Integrative Physiological and Behavioral Science*, 28:186-190, 1993.
- 64-Lal H. ve Forster M.J. :** Flumazenil improves active avoidance performance in aging NZB/BINJ and C57BL/6Nnia mice, *Pharmac. Biochem. Behav.* 35:747-750, 1990. α
- 65-Lal H., Kumar B. ve Forster M.J. :** Enhancement of learning and memory in mice by a benzodiazepine antagonist *FASEB J.* 2:2707-2711, 1988. α

66-Lazarova M. B., Petkov V. D., Petkov V.V. ve Mosharrof A. : Effects of Meclofenoxate and extr. rhodiola roseae L. on electro convulsive shock-impaired learning and memory in rats, *Meth. and Find. Exprl. Clin Pharmacol* , 8(9): 547-552, 1986.

67- Lerer B. ve Belmaker R. H. : Receptors and the mechanism of action of ECT, *Biol. Psychiat.* 17:497-511, 1982.

68-Lerer B., Stanley M., Demetriou S. ve Gershon S. : Effect of electroconvulsive shock on muscarinic cholinergic receptor in rat cerebral cortex and hippocampus, *Journal of Neurochemisry*, 41(6):1680-1683, 1983

69-Lerer B., Stanley M., McIntley I. ve Altman H. : Electroconvulsive shock and brain muscarinic receptors: Relationship to anterograde amnesia, *Life Sciences*, 35:2659-2664, 1984.

70-Lerer B. : Studies on the role of brain cholinergic systems inthe therapeutic mechanisms and adverse effects of ECT and lithium, *Biol. Psychiatry*, 20:20-40, 1985.

71-Lerer B., Stanley M., Keegan M. ve Altman H. : Proactive and retroactive effects of repeated Electroconvulsive shock on passive avoidance retantion in rats. *Physiol Behav.* 36: 471-474,1986.

72-Lister R. G. : The amnesic action of benzodiazepine in man, *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 9:87-93, 1985.

73-Lister R. G. : Ethologically-based animal models of anxiety disorders, *Pharmacol.Ther.*, 46:321-329, 1990.

74-Lopez F., Miller L. G., Greenblatt D. J., Paul S. M. ve Shader R. I. : Low dose alprazolam augments motor activity in mice, *Pharmacology Biochemistry & Behavior*, 30:511-513, 1988.

75- Kandel E. R. : Cellular mechanisms of learning and the biological basis of individuality, *Principles of Neural Science*,third edition, (eds) Kandel E. R., Schawetz J. H. and Jessel T. M., New York, Elsevier Press, 997-1008, 1991.

76-Kendall R. E. :The present status of electroconvulsive therapy, *Br. J. Psychiat.* 189:265-283, 1981.

77-Kemble E. D. ve Tapp J. T. : Passive and active avoidance performance folowing small amydaloid lesions in rats, *Physiology and Behavior*, 3:713-718, 1968.

78-Klepner C. A., Lipa A. S., Benson D. I., Sano M. C. ve Beer B. : Resolution of two biochemicallyand pharmacologically distinct benzodiazepine receptors, *Phamac. Biochem. Behav.*,11:457-462, 1979.

- 79-Krueger R. B., Sackeim H. A. ve Gamzu E. R. :** Pharmacological treatment of the cognition side effects ECT:a review, *Psychopharmacol-Bul*, 28 (4):209-224, 1992.
- 80-Kupfermann I. :** Learning and memory, *Principles of Neural Science*, third edition, (eds) Kandel E. R., Schawetz J. H. and Jessel T. M., New York, Elsevier Press, 997-1008, 1991.
- 81-Majewska M. D. :** Neurosteroids:Endogenous bimodal modulators of the GABA_Areceptor mechanism of action and physiological significance, *Progress in Neurobiology*, 38:379-395,1992.
- 82-Mandema J. W., Gubbens -stibbe J. M. ve Danhof M. :** Stability and pharmacokinetics of flumazenil in rats, *Psychopharmacology*, 103:384-387, 1991.
- 83-Mandema J. W.,Gubbens-Stibbe J. M. ve Danhof M. :** Stability and phatmacokinetics of flumazenil in the rat, *Psychopharmacology*, 103:384-387, 1991.
- 84-McDonald J. R. ve White N. M. :** Atriple dissociation of memory systems: Hippocampus, amygdala and striatum, *Behavioral Neuroscience*, 107:3-22, 1993.
- 85-McGaugh J. L. ve Alpern H. P. :** Effects of electroshock on memory: amnesia without convulsions, *Science*, 152:665-666, 1966.
- 86-Medina J., Pena C., Paladini A. C., Novas M. L., ve De Robertis E. :** acute stress induces an increase in rat cerebral cortex levels of n-butyl- β -carboline 3-carboxylate, an endogenous benzodiazepine binding inhibitor,*Neurochem. Int.*, 11:255-259, 1987.
- 87-Medina J., Novas M. L., Wolfman C., H. ve De Robertis E. :** Presence of benzodiazepine -like molecule in mammalian brain and milk, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 152:534-539, 1988.
- 88-Mewalt S.P, Hinrichs J.V. ve Ghoneim M. M. :** Diazepam and memory: support for a duplex model of memory, *Mem. Cognit.*, 11:557-564, 1983.
- 89-Miller A. L., Faber R. A., Patch J. H. ve Alexander T. :** Factors affecting amnesia, seizure duration and efficacy in ECT, *Am. J.Psychiatry*, 142:692-696, 1985.
- 90-Novas M. L., Wolfman C., Medina J. H, ve De Robertis E. :** Proconvulsant and anxiogenic effects of n-butyl β -carboline 3-carboxylate,an endogenous benzodiazepine binding inhibitor. *Pharmacol. Biochem. Behav.*,30:331-336, 1988.
- 91-Möhler H. ve Okada T. :** Benzodizepine receptors: demonstration in the central nervous system, *Science*, 198:849-851, 1977.

- 92-Möhler H. ve Richards J. G. :** The benzodiazepine receptor : a pharmacological control element of brain function, *European Journal of Anaesthesiology*, Supl. 2:15-24, 1988.
- 93-Nagatani T. ve Yamamoto T. :** Antagonism by propyl- β -carboline 3-carboxylate of passive avoidance impairment induced by diazepam, *European Journal of Pharmacology*, 198:109-112, 1991.
- 94-Nakagawa Y., Iwasaki T., Ishima T. ve Kimura K. :** Interaction between benzodiazepine and GABA-A receptors in state-dependent learning, *Life Sciences*, 52:1935-1945, 1993.
- 95-Ohno M., Yamamoto T. ve Watanabe S. :** Effects of intrahippocampal injections of N-methyl-D-aspartate receptor antagonists and scopolamine on working and reference memory assessed in rats by a three-panel runway task, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 263:943-950, 1992.
- 96-Olsen R. W., Bureau M. H., Endo S. ve Smith G. :** The GABA_A receptor family in the mammalian brain, *Neurochemical Research*, 16:317-325, 1991.
- 97-Pandey G. N., Heinze W. J., Brown B. D. ve Davis J. M. :** Electroconvulsive shock treatment decreases β -adrenergic receptor sensitivity in rat brain, *Nature*, 280:234-235, 1979.
- 98-Pandit S. K. ve Dundee J. W. :** Preoperative amnesia : the incidence following the IM injection of commonly used premedicants, *Anaesthesia*, 25:493-499, 1970.
- 99-Paredes R. G. ve Agmo A. :** GABA and behavior: The role of receptor subtypes, *Neuroscience and Behavioral Reviews*, 16:145-170, 1992.
- 100-Pellow S. ve File S. E. :** Review: Multiple sites of action for anxiogenic drugs: Behavioral, Electrophysiological, and biochemical correlations, *Psychopharmacology*, 83: 304-317, 1984.
- 101-Penfield W. ve Mathieson G. :** Memory, *Arch. Neurol.*, 31:145-154, 1974
- 102-Pereira M. E., Medina J. H. ve Izquierdo I. :** Effect of pre-training flumazenil administration on retention of three different tasks in rats, *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 22:1501-1505, 1989.
- 103-Perry E.K., Tomlinson B. E., Blessed G., Bergman K., Gibson P. H. ve Perry R. H. :** Correlation cholinergic abnormalities with senile plaques and mental test scores in senile dementia, *Br. Med. J.*, 2:1456, 1978.
- 104-Peterson R. C. ve Conheim H. :** Diazepam and human memory : influence on acquisition, retrieval and state dependent learning, *Prog. Neuro-Psychopharmacol.*, 4:81, 1980.

- 105-Petkov V.D., Mosharrof A. H., Kehayov V. V., Konstantinova E. ve Getova D. :** Effect of cdp-choline on learning and memory process in rodents, *Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol*, 14(8):593-695, 1992.
- 106-Petkov V.D., Mosharrof A. H., Kehayov V. V., Konstantinova E. ve Getova D. :** Effect of cdp-choline on learning and memory process in rodents, *Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol*, 14(8):593-695, 1992.
- 107-Porsolt R. D., Mc Arthur R. A. ve Lenegre A. :** Psychotropic screening procedures. *Methods in behavioral pharmacology* , Haaren J. P. ,The Netherlands, Elsevier pres, 23-51,1993.
- 108-Prado de Carvalho L., Grecksch G., Chapouthier G., Rossier J. :** Anxiogenic and nonanxiogenic benzodiazepine antagonists, *Nature*, 301:64-66,1983.
- α **109-Prather P. L., Forster M. J. ve Lal H. :** Learning and memory enhancing effects of Ro 15-4513:Acomparison with flumazenil, *Neuropharmacology*, 31:299-306, 1992. α
- 110-Rago L., Kiivert R. A., Harro J. ve Pold M. :** Behavioral differances in an elevated plus maze: correlation between anxiety and decreased number of GABA and benzodiazepine receptor in mouse cerebral cortex, *Nauyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 337:675-678, 1988.
- 111-Randall L. O., Heise G.A., Schallek W., Bagton R. E., Banziger R. F., Boris A., Moe R.A. ve Abrams W. G. :** Pharmacological and clinical studies on Valium (TM), a new psychotherapeutic agent of the benzodiazepine class, *Current Therapy Research*, 3:405-425, 1961.
- 112-Rastogi S. K. ve Ticku M. K. :** Involvement of a GABA ergic mechanism inn the anticonvulsant effect of pentobarbital against maximal electrshock-induced seizures in rats, *Pharmacol. Biochem. & Behav.* 22:141-146, 1985.
- 113-Richardson J.T.E., Frith C.D., Scott E., Crow T. ve Cunningham-Owes D. :** The effects of intravenous diazepam and hyoscine upon recognition memory, *Behav. Brain Res.*, 14:193-199, 1984.
- 114-Ridley R. M, Aitken D. M. ve baker H. F. :** Learning about rules but about reward is impaired following lesionsof the cholinergic projectionto the hippocampus, *Brain Research.*, 502:306-318, 1989.
- 115-Rodriguez R. :** Effect of various psychotropic on the performance of avoidance and escape behaviors in rats, *Pharmacol. Biochem. & Behav.* 43: 1155-1159, 1992.

- 116-Roozendaal B., Koolhaas J. M. ve Borus B. :** The central amygdala is involved in conditioning but not in retention of active and passive shock avoidance in male rats, *Behavioral and Neural Biology*, 59:143-149, 1993
- 117-Thiébot M. H. :** Some evidence for amnesic-like effects of benzodiazepines in animals, *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 9:95-100, 1985.
- 118-Sanger D. J. ve Joly D. :** Anxiolytic drugs and the acquisition of conditioned fear in mice, *Psychopharmacology*, 85:284, 1985.
- 119-Sansona M. :** Scopolamine-induced locomotor stimulation in mice: Effect of diazepam and a benzodiazepine antagonist, *Psychopharmacology*, 77:292-293, 1982.
- 120-Saunders D. B. ve Trap R. G. :** Basic and clinical biostatistics, USA; academic press, 101-185, 1990.
- 121-Sawada Y., Hanano M., Sugiyama Y. ve Iga T. :** Prediction of the disposition of nine weakly acidic and six weakly basic drugs in humans from pharmacokinetic parameters in rats, *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics*, 13:477-493, 1985.
- 122-Shepherd R. A. :** Behavioral effects of GABA agonists in relation to anxiety and benzodiazepine action, *Life Science*, 40:2429-2436, 1987.
- 123-Shindler C. W. ve Harvey J. A. :** Use of classical conditioning procedures in behavioral pharmacology, *Drug Dev. Res.*, 20:169-187, 1990.
- 124-Shindler C. W. :** Classical conditioning. Methods in behavioral pharmacology, Haaren J. P., The Netherlands, Elsevier press, 553-779, 1993.
- 125-Sieghart W. :** Pharmacology of benzodiazepine receptors: An update, *Journal of Psychiatry and Neuroscience*, 19:24-29, 1994.
- 126-Sivilotti L. ve Nistri A. :** GABA receptor mechanism in the central nervous system, *Progress in Neurobiology*, 36:35-92, 1991.
- 127-Söderpalm B., Svensson L., Hulthe P., Johannessen K. ve Engel J. A. :** Evidence for a role for dopamine in the diazepam locomotor stimulating effect, *Psychopharmacology*, 104:97-102, 1991.
- 128-Spignoli G., Magnani M., Giovannini M. G. ve Pepeu G. :** Effect of proglutamic acid on ECS and scopolamine-induced memory disruption and brain acetylcholine levels in rats, *Pharmacological Research Communications*, 19:901-912, 1987.
- 129-Squire R. F. ve Braestrup C. :** Benzodiazepine receptors in rat brain, *Nature*, 266:732-734, 1977.

- 130-Stern Y., Sano M. ve Mayeux R.** Long-term administration of oral physostigmine in Alzheimer's disease, *Neurology*, 38:1837-1843,1988.
- 131-Sutherland R. J. ve Rudy J. W.** :Configural association theory:The role of the hippocampal formation in learning memory and amnesia, *Psychobiology*, 17:129-144, 1989.
- 132-Sutherland R. J. ve Mcdonald R. J** :Hippocampus, amigdala and memory deficits ,*Behavioural Brain Research*, 34:57-79, 1990.
- 133-Sutherland R. J Mcdonald R. J., Hill C. R. ve Rudy J. W.** : Damage to the hippocampal formation in rats selectively impairs the ability to learn cue relationships, *Behavioral and Neural Biology*, 52:331-356,1989.
- 134-Urbancic M. ve Marezynski J. T.** : Cronic exposure to Ro 15-1788: Differential effect on flunitrazepam binding to cortex and hippocampus, *European Journal of pharmacology*, 171: 1-7, 1989.
- 135-Urbancic M., Gadek M. A. ve Marczynski T. J.** : Cronic exposure to flumazenil : anxiolytic effect and increased exploratory behavior, *Pharmacolgy & Biochemistry & Behavior*, 35: 503-509, 1989.
- 136-Urbancic M., Gadet M. A. ve Marczynsky T. J.** : Chronic exposure to flumazenil: Anxiolytic effect and increased exploratory behavior, *Pharmacology Biochemistry & Behavior*, 35: 503-509, 1990.
- 137-Yoshida S. ve Suzuki N.** : Antiamnesic and cholinomimetic side effects of the cholinesterase inhibitors, physostigmine, tacrine and NIK-247 in rats, *European Journal of Pharmacology*, 250:117-124, 1993.
- 138-Venault P., Chapouthier G., Prado de Carvalho L., Simiand J., Morre M., Dodd R. ve Rossier J.** : Benzodiazepine impair and β -carboline enhances performance in learning and memory tasks, *Nature*, 321:864-866,1986.
- 139-Venault P., Chapouthier G., Carvalho L. P., Simiand J., Morre M., Dodd R. H. ve Rossier J.** : Benzodiazepine impairs and B carboline enhances performance in learning and memory tasks, *Nature*,321:864, 1984.
- 140-Wecker L.** : Neurochemical effects of choline supplementation, *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 64:329-333, 1985.
- 141-Wigstrom H., Gustafsson B.** : Facilitated induction of hippocampal long lasting potentiation during blockade of inhibition, *Nature*, 301:603-604, 1983.
- 142-Weingartner H.** : Models of memory dysfonctions. *Principles of Neural Science*, Third edition,edited by Kandel E. R. and Schwartz J. H. and Jessell, Elsevier press, Amsterdam, 1991.
- 143-Wurtman R. J.** : Alzheimer's disease, *Sci. Amer.* 2:1316-1321, 1983

144-Zis A. P., Nomikos G. G., Brown E. E., Damsma G. ve Fibiger H. C. : Neurochemical effects of electrically and chemically induced seizures: an in vivo microdialysis study in the rat hippocampus, *Neuropsychopharmacology*, 7(3):189-195, 1992.

145-Zorumski C. F. ve Isenberg K. E. : Insights into the structure and function of GABA-benzodiazepine receptors: ion channels psychiatry, *Am. J. Psychiatry*, 148:162-173, 1991.



T.C. YÜNEKİREKİM İNAN
DOKÜMANTASYON MERKEZİ