

Soy içi C57BL/6J Farelerde Beklentisel Bulantı ve Kusma Modeli

Çınar Furkan İlhan¹

Sezen Kışlal²

Orta Doğu Teknik Üniversitesi

Orta Doğu Teknik Üniversitesi

Özet

Beklentisel bulantı ve kusma (BBK) kemoterapinin en yaygın görülen yan etkilerinden biri olup, klasik koşullamanın örneği olarak kabul edilmektedir. Kemoterapide kullanılan ekipmanlar, kliniğin kokusu, hemşirelerle etkileşim gibi nötr uyarılar, bir ya da daha fazla kemoterapi seansından sonra hastalık ile eşleştirilerek koşullu uyarıcı haline gelebilmektedir. Bu eşleştirme sonucunda kanser hastaları aynı çevresel uyarılarla tekrar karşılaştığında koşullu tepki yani BBK gösterirler. Sıçanlar ve soy dışı fareler kullanılarak yapılan klinik öncesi araştırmalarda, kanser hastalarında görülen BBK benzeri bir durumu modellemek için lityum klorür (LiCl) gibi bulantı ortaya çıkaran ilaçlar, çevresel uyarılarla birden çok koşullama oturumu ile eşleştirilmiştir. Bu paradigma koşullu çevre itinmesi (KÇİ) olarak adlandırılmaktadır. Bu çalışmamızda soy içi C57BL/6J farelerde, kanser hastalarında görülen BBK'yı taklit eden bir hayvan modeli oluşturmak amacıyla LiCl ile ortaya çıkan hastalık ile yeni bir çevrenin eşleştirildiği tek bir koşullama uygulandı. İlk deneyde, 30 dakika süren bir koşullama oturumunda farelere hastalık oluşturmak için 4.5 mEq/kg dozunda LiCl enjekte edildi. İkinci deneyde ise LiCl 6 mEq/kg ve 7.5 mEq/kg dozunda uygulandı. Kontrol hayvanlarına ise her iki deneyde izotonik sodyum klorür (NaCl) enjeksiyonları yapıldı. Koşullamadan 3 gün sonra gerçekleştirilen bellek testinde, hayvanlar koşullama kafeslerine 30 dakika maruz bırakılarak su ve şeker tüketimi ölçüldü. Her iki deneyde de bellek testinde deney ve kontrol grupları arasında sıvı tüketimleri açısından herhangi bir anlamlı fark gözlenmedi. Bu durum tek bir koşullama oturumunun, soy içi farelerde yetersiz kalması, hayvanların LiCl toksisitesine karşı duyarlı olması veya nöronal süreçlere bağlı olarak KÇİ öğrenmesinin gerçekleşmemesinden kaynaklanıyor olabilir. Aynı zamanda sıvı tüketimi KÇİ öğrenmesini göstermede yetersiz kalmış olabilir.

Anahtar kelimeler: Beklentisel bulantı, fare, klasik koşullama, kanser, koşullu çevre itinmesi

Abstract

Anticipatory nausea and vomiting (ANV), an instance of classical conditioning, is one of the side effects of chemotherapy treatment. After one or more treatment session, neutral stimuli such as chemotherapy equipment, smell of clinic, interaction with nurses can become conditioned stimuli as they are associated with illness. As a result, cancer patients show conditioned response (ANV), when they re-encounter same environmental stimuli. Nausea-inducing drugs such as lithium chloride (LiCl) are paired with contextual cues in multiple conditioning cycles to recapitulate ANV in rats and outbred mice. This paradigm is called conditioned context aversion (CCA). In this study, one conditioning trial was conducted during which a novel context was paired with LiCl in inbred C57BL/6J mice to create a novel animal model of ANV. In the first experiment, mice were injected with LiCl at a dose of 4.5 mEq/kg during the 30-minute conditioning trial. In the second experiment, LiCl was administered at the doses of 6 mEq/kg and 7.5 mEq/kg. Control animals were given isotonic sodium chloride (NaCl) injections. Retention tests were performed 3 days after conditioning by re-exposing animals to conditioning cages for 30 minutes and water/sucrose consumption was measured. No significant difference was observed between the fluid consumption of the experimental and control groups during retention tests in both experiments. Lack of CCA learning may be due to the inadequacy of single conditioning, the insensitivity of animals to LiCl toxicity, or neuronal processes. It is also possible that fluid consumption may not sensitive to demonstrate CCA learning.

Keywords: Anticipatory nausea, mice, classical conditioning, cancer, conditioned context aversion

Yazar Notu: ODTÜ Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (HDYEK) tarafından deneylerimiz etik olarak onaylandı (Karar Sayısı: 01; Karar Tarihi 01.02.2021).

Yazışma Adresi: ¹Dr. Çınar Furkan İlhan, Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Psikoloji Bölümü, Üniversiteler Mahallesi, Dumlupınar Bulvarı No:1 06800 Çankaya / Ankara, ORC-ID: 0000-0002-9313-5179

²Dr. Öğr. Üyesi Sezen Kışlal, Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Psikoloji Bölümü, Üniversiteler Mahallesi, Dumlupınar Bulvarı No:1 06800 Çankaya / Ankara, sezenk@metu.edu.tr, ORC-ID: 0000-0001-5169-2404

Gönderim Tarihi: 23.10.2022

Kabul Tarihi: 04.04.2023

Kanser hastaları, emotojenik kemoterapi tedavisinin bir sonucu olarak bulantı ve kusma yaşarlar (Hesketh, 1999). Bu iyatrojenik etkileri hafifletmek için antiemetik ilaçlar reçete edilmektedir (Hesketh ve ark., 2017). Ancak kemoterapiye bağlı bulantı ve kusma etkili bir şekilde kontrol edilmezse, kanser hastaları bulantı ve hastalık deneyimleri ile hastanedeki çevresel uyaranları eşleştirebilirler (Roscoe ve ark., 2011). Bu eşleştirme sonucunda, fizyolojik ve farmakolojik mekanizmalar ile açıklanamayan ve beklentisel bulantı ve kusma (BBK) olarak adlandırılan psikolojik bir bozukluk ortaya çıkar (Kamen ve ark., 2014). Kanser hastaların %30'unun BBK'dan muzdarip olduğu bilinmektedir (Boakes ve ark., 1993). BBK geliştiren hastalar fiziksel, bilişsel ve sosyal işlevselliklerindeki olumsuzluklara bağlı olarak yaşam kalitelerinde düşüş bildirmektedir ve kanser tedavisini bırakabilmektedirler (Kamen ve ark., 2014).

BBK, klasik koşullanmanın bir sonucu olarak ortaya çıkmaktadır (Stockhorst ve ark., 2007). Kemoterapi ilaçları koşulsuz uyaran (Ksuz U), bu ilaçların hastalarda ortaya çıkardığı bulantı ve kusma durumu ise koşulsuz tepkidir (Ksuz T) (Stockhorst ve ark., 1993). Kemoterapi seansları sonrasında hastane ortamındaki çevresel uyaranlar, hastalık hissi ile eşleştirilmesi sonucunda koşullu uyaran (Klu U) özelliği kazanır (Rodríguez, 2013). Bu durum ilişkisel bir öğrenme biçimi olan klasik koşullamadan kaynaklanmaktadır. Klinikteki kokular, eşyalar, sesler vb. potansiyel Klu U'lardır (Stockhorst ve ark., 2007). Kemoterapi seansları ilerledikçe Ksuz U ve Klu U arasındaki ilişkinin kurulmasına bağlı olarak, kemoterapi tedavisinin hatırlatıcıları mide bulantısı ortaya çıkarmaya başlar (Chan ve ark., 2015). Çevresel ipuçlarına karşı hastaların gösterdiği tepkiler ise koşullu tepkidir (Klu T) (Stockhorst ve ark., 1993). Klasik koşullanmanın bir sonucu olarak kanser hastalarında gözlemlenen bu olgu BBK olarak adlandırılmıştır (Rodríguez, 2013). Hastaların BBK geliştirme riski, tekrarlanan kemoterapi seansları ile artar ve tedavinin tamamlanmasından uzun süre sonra bile devam edebilmektedir (Aapro ve ark., 2005). Bu fenomenin altında yatan psikolojik ve nörobiyolojik temeli anlamak klinik bir öneme sahiptir. Kanser hastalarının yaşadığı stres ve rahatsızlık ile mücadele için yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi gerekmektedir.

Koşullu Çevre İtinmesi (KÇİ), BBK'nın hayvan modelidir (Cloutier ve ark., 2017, 2018; Limebeer ve Parker, 2000). Özellikle sıçanlar üzerinde yapılan çalışmalar; hayvanlara görsel, duyuşsal ve kokusal çeşitli uyaranların bulunduğu bir çevrede hastalık oluşturan ilaçlar enjekte etmenin, hayvanların bu çevreye karşı itimne davranışı geliştirmesine neden olduğunu göstermiştir (Rodríguez ve ark., 2000). Bu modelde hastalık oluşturmak için kullanılan ilaçlar Ksuz U, hastalığın oluşturduğu gastrointestinal stres Ksuz T, çevresel uya-

ranlardan oluşan ortam ise Klu U'dır (Symonds ve Hall, 2000). Klasik koşullama öğrenmesine dayanan bu modelle KÇİ denilmektedir (Kisil ve Blizard, 2016). Kanser hastalarının yaşadığı BBK deneyimini taklit etmek için çeşitli KÇİ prosedürleri oluşturulmuştur (Rodríguez ve ark., 2000; Cloutier ve ark., 2017). Farmakolojik ajanlar, KÇİ çalışmalarında hastalığı ortaya çıkarmak için Ksuz U olarak kullanılmaktadır. Lityum klorür (LiCl) bu ajanlardan sıklıkla kullanılanlarından bir tanesidir (Symonds ve ark., 1998). Kemirgenlerde, intraperitoneal LiCl enjeksiyonu sonucunda hayvanlar gastrointestinal rahatsızlık yaşar (Sieklucka-Dziuba ve ark., 1998). LiCl ayrıca hipofaji (McCann ve ark., 1989), mide boşalması (McCann ve ark., 1989), karın üzerine yatma (Meachum ve Bernstein, 1992) gibi mide bulantısı/halsizlik ile ilişkili davranışların ortaya çıkmasına yol açar. LiCl'nin yüksek dozlarda bile güvenli olması, bu ilacın KÇİ çalışmalarında hastalık ortaya çıkarmak için sık sık kullanılmasına yol açmıştır (Sieklucka-Dziuba ve ark., 1998).

KÇİ'nin gelişimini ortaya koymak için çeşitli Klu T'ler incelenmiştir. Çalışmaların çoğunda, sıvı tüketimi, itimnenin gerçekleştiğini gösteren bir Klu T olarak ölçülür (Rodríguez ve ark., 2000; Symonds ve ark., 1998). Klu T olarak sıvı tüketimini kullanılan çalışmanın klasik bir örneği Rodríguez ve arkadaşları (2000) tarafından yapılmıştır (Rodríguez ve ark., 2000). Bu çalışmada, sıçanlara, çeşitli yeni uyaranlar içeren bir bağlama maruz bırakılmadan hemen öncesinde LiCl enjeksiyonu verilmiştir (Rodríguez ve ark., 2000). Ertesi gün, aynı sıçanlar, farklı çevresel uyaranlar içeren bir bağlama maruz bırakılmadan önce sodyum klorür (NaCl) enjeksiyonu almıştır (Rodríguez ve ark., 2000). Bu 2 günlük koşullama döngüsü 4 kez tekrarlanmıştır (Rodríguez ve ark., 2000). Son koşullama döngüsünü takiben hayvanlar 4 günlük iyileşme dönemine bırakılmış ve bu 4 günün sonucunda bağlamlardan bir tanesine tekrar maruz bırakılarak sükröz tüketimleri ölçülmüştür (Rodríguez ve ark., 2000). LiCl ile eşleştirilen bağlamda sükröz solüsyonuna erişim verilen sıçanların, NaCl ile eşleştirilen bağlamda aynı solüsyona erişim verilen sıçanlardan daha az solüsyon tükettiği bulunmuştur (Rodríguez ve ark., 2000). Bu sonuçlar sıçanların bağlamsal ipuçları ile gastrointestinal hastalığı eşleştirerek, daha sonra bu ipuçlarının varlığında test edildiklerinde Klu T (sükröz tüketiminde azalma) gösterdiğini ortaya koymaktadır (Rodríguez ve ark., 2000). Bu durum sıçanların BBK'yı modellemede kullanılabileceğini göstermektedir (Rodríguez ve ark., 2000).

KÇİ çalışmalarında, bağlamlarda çeşitli eksteroseptif ipuçları (dokunsal, işitsel, görsel ve koku) kullanılmış ve itimne davranışını ölçmek için tatlandırılmış solüsyonlar kullanılmıştır (Symonds ve ark., 1998). Ancak, geçmiş dönemde yapılan bir çalışmada küçük çevresel değişikliklerin rolü araştırılmıştır (Revusky ve

Parker, 1976). Bu çalışmada sıçanların, koşullama denemeleri sırasında daha önce hastalık ile eşleştirilmiş su şişelerine karşı itinme sergiledikleri gösterilmiştir (Revusky ve Parker, 1976). Bu durumun sıçanların hastalık ile su şişelerinin görüntüsü arasında kurduğu ilişkisel öğrenmeden kaynaklandığı ileri sürülmüştür (Revusky ve Parker, 1976). Daha sonra Nachman ve meslektaşları tarafından tartışıldığı gibi bu çalışmadaki su şişelerine verilen koşullu itinme tepkisi, görsel (farklı kapların görünümü) veya somatosensoriyel stimülasyona (oral duyumlar) bağlı olarak açıklanabilmektedir (Nachman ve ark., 1977). Duyusal ipuçlarının soy dışı farelerde itinme öğrenmesindeki rolünü değerlendiren yakın zamanlı bir çalışmada küçük görsel ipuçları hastalık ile eşleştirilmiştir (Kislal ve Blizard, 2016, 2018). Su şişelerinde yapılan (bir bant parçası eklemek gibi küçük bir değişikliğin bile), hastalıkla eşleştirildiğinde farelerde itinme davranışının ortaya çıkmasına yol açtığı gözlenmiştir (Kislal ve Blizard, 2016, 2018). Farelerin gösterdiği itinme davranışının haftalarca devam ettiği gözlenmiştir (Kislal ve Blizard, 2016, 2018). Diğer çalışmalarda kullanılan aromalı çözeltilerin etkisini ortadan kaldırmak için, bu çalışmada aynı zamanda sade su kullanılmıştır (Kislal ve Blizard, 2016, 2018). Bu çalışmanın sonuçları koşullu itinme öğrenmesinde görsel ipuçlarının önemini vurgulamakta ve ayrıca KÇİ'yi değerlendirmek için aromalı solüsyonların kullanılmasının gerekli olmadığını kanıtlamaktadır.

Farelerde spesifik genlerin ve transgenlerin rolünü aydınlatmak için geniş çaplı araştırmalar yapılmış olmasına ve farelerin öğrenme ve hafızanın nörobiyolojik temellerini araştıran çalışmalarda yaygın olarak kullanılmasına rağmen, KÇİ çalışmaları esas olarak sıçanlar üzerinde yürütülmüştür (Cloutier ve ark., 2017; Parker ve ark., 1984; (Rodríguez ve ark., 2000). Ancak yakın tarihli bir çalışmada C57BL/6J ve DBA/2J soylarından elde edilen farelerin BKİ geliştirebildiği gösterilmiştir (Kislal ve Blizard, 2016). Bu sonuçların genetik olarak heterojen farelerin bağlamsal ipuçlarına karşı itinme geliştirdiğini ve bu nedenle KÇİ çalışmalarında kullanılabilceği kanıtlayan ilk çalışmadır (Kislal ve Blizard, 2016). Laboratuvarımızda yaptığımız önceki çalışmalarımızda benzer bir yöntem kullanılarak CD1 farelerde tek bir koşullama oturumunun yeterli olduğunu gözlemledik (İlhan ve ark., incelemede). Bu deneylerde tek bir koşullama oturumundan 72 saat sonra, hayvanların su içmeleri herhangi bir enjeksiyon olmadan test edildiğinde, koşullama sırasında LiCl enjeksiyonu alan hayvanların NaCl enjeksiyonu alan hayvanlara göre anlamlı ölçüde düşük su tükettiği bulunmuştur.

Bu çalışmada, bellek ve öğrenme araştırmalarında yaygın olarak kullanılan bir tür olan C57BL/6J (B6) farelerinde KÇİ öğrenmesinin araştırılması hedeflenmek-

tedir. Amacımız, soy içi B6 farelerinin melez fareler gibi hastalık ile eşleştirilen yeni bir ortama koşullu itinme davranışı gösterip göstermeyeceğini araştırmak ve sıçanlar yerine KÇİ çalışmalarında kullanılabilcek iyi bir alternatif olup olmayacağını değerlendirmektir.

Deney 1

Birinci deneyin amacı, soy içi B6 farelerin LiCl'nin neden olduğu hastalık ile eşleştirilmiş bir bağlama karşı KÇİ geliştirip geliştirmeyeceğini araştırmaktır. Bu amaçla, fareler, tek bir koşullama oturumuna alındı. Otuz dakikalık koşullama oturumunda hayvanlara yeni bir ortamda LiCl (4,5 mEq) veya NaCl (%0.9) enjeksiyonları yapıldı. KÇİ koşullama oturumundan iki gün sonra, hayvanlar koşullama ortamına herhangi bir enjeksiyon olmadan yeniden maruz bırakılarak ölçüldü. KÇİ davranışını ölçmede tatlandırılmış solüsyonların gerekip gerekmediğini araştırmak için fareler hem sükröz çözeltisi hem de sade su kullanılarak test edildi.

Yöntem

Hayvanların Bakımı

Her iki deneyde ağırlıkları 19 ila 25 g arasında değişen 12 haftalık B6 erkek fareler kullanıldı. Fareler, şeffaf duvarları (365 x 207 x 140 mm) olan kafeslerde birer hayvan olacak şekilde bakıldı. Koloni odası, 24 °C +/-1 sıcaklıkta 12 saat aydınlık/karanlık döngüsünde tutuldu. Hayvanların tüm deney boyunca standart fare yemine *ad libitum* erişimi sağlandı ancak aşağıda tarif edildiği gibi sudan yoksun bırakma uygulandı. Deneyler, Orta Doğu Teknik Üniversitesi Hayvan Etik Kurulu tarafından etik olarak onaylandı (Karar Sayısı:01; Karar Tarihi 01.02.2021).

Deney Grupları

Fareler vücut ağırlıklarına göre eş iki gruba ayrıldı: LiCl (n = 10) ve NaCl (n = 9). Koşullama sırasında, LiCl grubundaki hayvanlara lityum klorür (LiCl) enjeksiyonu ve NaCl grubundaki hayvanlara (NaCl) enjeksiyonu yapıldı.

İlaçların Enjeksiyonu

NaCl, LiCl ve sükröz Sigma (St. Louis, MO, ABD) markası kullanıldı. LiCl 4.5 mEq/kg dozda uygulandı. Kontrol hayvanlarına %0.9 NaCl enjeksiyonları yapıldı. Tüm ilaçlar 0.3 mL/kg'lık bir oranda enjekte edildi. Tüm ilaçlar intraperitoneal olarak uygulandı.

İşlem

Deney prosedürü Tablo 1'de verilmiştir. Deney prosedürü alıştırmaya, su içme eğitimi, koşullama, iyileşme, tat aşinalığı kazandırma ve bellek testinden oluşmaktadır.

Tablo 1. Deneysel Prosedür

1-7 Gün	8-10 Gün	11. Gün	12-13 Gün	14. Gün	15. Gün	16. Gün
Alıştırma	Su İçme Eğitimi	Koşullama	İyileşme	Tat Aşinalığı Kazandırma	Bellek Testi 1	Bellek Testi 2
Hayvanlar günde 3 dakika olmak üzere 5 gün boyunca ele alıştırıldı. Alıştırmanın son günü 17:30'da su kısıtlaması başlatıldı.	Hayvanlara 3 gün boyunca 10:00-10:30 ve 17:00-17:30 arasında su verildi.	12:30-13:00 arasında hayvanlara koşullama kafesinde LiCl veya NaCl enjeksiyonu yapıldı.	Hayvanlara 2 gün boyunca kendi kafeslerinde 10:00-10:30 ve 17:00-17:30 arasında su verildi	12:30-13:00 arasında hayvanlara neofobik etkiyi ortadan kaldırmak için sükröz verildi. 17:00-17:30 arasında hayvanlara su verildi.	12:30-13:00 arasında hayvanların koşullama kafeslerinde su veya sükröz tüketimi ölçüldü.	12:30-13:00 arasında hayvanların koşullama kafeslerinde su veya sükröz tüketimi ölçüldü.

Not. Deneysel prosedürü alıştırma, su içme eğitimi, koşullama, iyileşme, tat aşinalığı kazandırma ve bellek testi olmak üzere 6 aşamadan ve 16 günden oluşmaktadır.

Alıştırma. 7 günlük alıştırma aşamasının son 5 günü boyunca tüm fareler, manipülasyona alışmaları için günde 3 dakikalığına elde tutuldu. Son gün 17:30'da su şişeleri kafeslerden alınarak su kısıtlaması başlatıldı.

Su İçme Eğitimi. Hayvanlar, alıştırma aşamasını takip eden 3 gün süresince su içme eğitimi aldı. Bu süreçte sadece 10:00-10:30 ve 17:00-17:30 saatleri arasında farelerin kafeslerine standart plastik su şişeleri takıldı.

Koşullama. Su içme eğitiminin ertesi gününde saat 12:30'da başlayarak 30 dakikalık koşullama yapıldı. Farklı çevresel bir ortam oluşturmak amacıyla koşullama kafesleri ve koşullamanın yapıldığı odaya çeşitli görsel, duyuşsal, dokunsal ve kokusal uyarıcılar eklendi. Bu amaçla koşullama kafeslerinin duvarları siyah-beyaz bantlarla kaplandı ve kafeslerde yataklık olarak kedi kumu kullanıldı. Koşullama odasında, 75 desibellik beyaz gürültü, 60 wattlık loş kırmızı ışık ve limon yağı kokusu uyarıcıları eklendi. Koşullama sırasında her bir hayvan ayrı ayrı koşullama kafeslerine yerleştirildi ve koşullama odasına taşındı. 15 dakika sonra, hayvanlara hastalık ortaya çıkarmak için LiCl ya da kontrol uygulama olarak NaCl enjeksiyonları yapıldı. Koşullama sırasında paslanmaz çelik bilyeli uçlu ağızları olan yeşil cam şişeler hayvanlara su vermek için kullanıldı. 30 dakikalık koşullama oturumu başlamadan önce ve koşullama oturumu sonlandıktan hemen sonra su şişeleri tartılarak hayvanların sıvı tüketimi ölçüldü.

İyileşme. İki günlük iyileşme süresince hayvanlar koloni odasındaki kendi kafeslerinde su eğitim aşamasında olduğu gibi belirli saatlerde su verildi.

Tat Aşinalığı Kazandırma. İyileşmeyi takip eden

ertesi gün hayvanlara 12:30-13:00 saatleri arasında koloni odasındaki kafeslerinde sükröz çözümü (%0.5) ve 17:00-17:30 saatleri arasında su verildi.

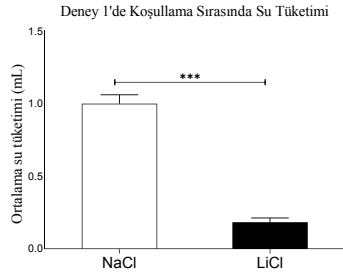
Bellek Testi. Tat aşinalığı kazandırma aşamasından sonra her bir hayvan 12:30'dan başlayarak 30 dakika boyunca herhangi bir enjeksiyon yapılmadan koşullama kafeslerine tekrar koyularak, koşullama odasına yerleştirildi. Birinci bellek testinde her iki gruptaki (LiCl ve NaCl) farelerin yarısı su diğer yarısı ise sükröz tüketimi için test edildi. İkinci bellek testinde ise fareler ilk bellek testinde kullanılmayan çözümü ile test edildi. Birinci ve ikinci bellek testinde su verilen hayvanların tüketimleri tek bir data haline getirilerek gruplar arasında su içme davranışı arasında fark olup olmadığı karşılaştırıldı. Aynı şekilde birinci ve ikinci bellek testinde sükröz verilen hayvanların tüketim verileri tek bir data haline getirilerek gruplar arasında sükröz içme davranışı açısından fark olup olmadığı karşılaştırıldı.

Veri Analizi

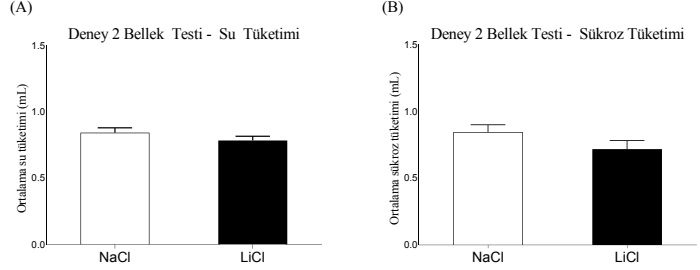
İstatistiksel analizler GraphPad Prism (Version 9) kullanılarak yapıldı. Veriler t-testi, tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve Tukey post-hoc testi ile analiz edildi. İstatistiksel anlamlılık $p < .05$ olarak tanımlandı.

Bulgular

Koşullama sırasında grupların tükettikleri sıvı miktarları Şekil 1'de gösterilmektedir. Bağımsız örneklem t testi sonuçları LiCl grubundaki ($M = 0.183$, $SD = 0.094$) hayvanların su tüketimlerinde NaCl grubuna ($M = 1.001$,

Şekil 1. Koşullama Sırasında Su Tüketimi

Not. Deney 1'de koşullama sırasında LiCl enjeksiyonu alan fareler NaCl enjeksiyonu alan fareler göre daha az su tüketmişlerdir. Değerler ortalama \pm SH şeklinde verilmiştir. *** $p < .001$

Şekil 2. Bellek Testleri Sırasında Su ve Sükroz Tüketimi

Not. Deney 1'de bellek testleri sırasında ortalama sıvı tüketimi. (A) Birinci bellek testi sırasında grupların tükettikleri ortalama su miktarı gösterilmektedir. (B) İkinci bellek testi sırasında grupların tükettikleri ortalama sükroz miktarı gösterilmektedir. Koşullama sırasında LiCl veya NaCl enjeksiyonu alan farelerin bellek testleri sırasında su ve sükroz tüketimlerinde herhangi bir azalma gözlenmemiştir. Değerler ortalama \pm SH şeklinde verilmiştir.

SD = 0.184) göre anlamlı bir şekilde düşüş olduğunu göstermektedir, $t(17) = 12.36, p < .001$.

Grupların tükettikleri su miktarları Şekil 2(A)'da gösterilmektedir. Bağımsız örneklem t testi sonuçları LiCl (M = 0.784, SD = 0.102) ve NaCl (M = 0.843, SD = 0.109) grubundaki hayvanların su tüketimlerinde anlamlı bir fark olmadığını göstermektedir, $t(17) = 1.224, p = .233$. Grupların tükettikleri sükroz miktarları Şekil 2(B)'de gösterilmektedir. Bağımsız örneklem t testi sonuçları LiCl (M = 0.717, SD = 0.203) ve NaCl (M = 0.844, SD = 0.165) grubundaki hayvanların sükroz tüketimlerinde anlamlı bir fark olmadığını göstermektedir, $t(17) = 1.487, p = .155$

Tartışma

Birinci deneyimizin amacı, B6 farelerin KÇİ öğrenmesi geliştirip geliştirmeyeceğini test etmektir. Bu amaçla, çeşitli uyarıcılar ile donatılmış yeni bir ortamda deney grubundaki farelere hastalık oluşturmak amacıyla LiCl, kontrol grubundaki hayvanlara olarak NaCl enjeksiyonları yapıldı. Koşullama sırasında LiCl enjekte edilen hayvanların hastalık haline bağlı olarak su tüketimlerinde azalma gözlemlendi. Ancak NaCl enjeksiyonu yapılan hayvanların su tüketimlerinde herhangi bir azalma olmadı. KÇİ'yi test etmek amacıyla koşullamadan 3 gün sonra hayvanlar koşullamanın yapıldığı aynı ortama herhangi bir enjeksiyon olmadan tekrar maruz bırakıldı. Birinci bellek testinde farelerin yarısının su tüketimleri ölçülürken diğer yarısının sükroz tüketimleri ölçüldü. İkinci bellek testinde ise ilk bellek testinde su tüketimleri ölçülen hayvanların sükroz, sükroz tüketimleri ölçülen hayvanların ise su tüketimleri ölçüldü. Yeni bir bağlamda LiCl veya NaCl enjeksiyonu alan hayvanların iki testteki sıvı tüketimlerinde de herhangi bir azalma gözlenmedi.

Deney 2

Birinci deneyde B6 farelerin KÇİ geliştirmemesinin altında yatan nedenlerden birisi kullanılan LiCl dozunun (4.5 mEq/kg) bu tür farelerde yeterince güçlü bir hastalık hissi oluşturmada yetersiz kalması olabileceği düşünülmüştür. LiCl toksisitesine duyarlılıktaki genetik mekanizmaların rolü üzerine yapılan araştırmalarda farelerde tür farklılıkları olduğu görülmektedir (El-Kassem ve Singh, 1983; Ingram, 1982). Ölümcül dozda verilen LiCl sonrasında ölüme kadar geçen sürenin değerlendirilmesi, B6 farelerinin LiCl toksisitesine en duyarlı tür olan 129/ReJ'den 15 kat daha dirençli olduğunu göstermektedir. Bir başka çalışmada diğer altı fare türüyle (129/ReJ, S.W., C3H/S, DBA/2, Balb/c) kıyaslandığında, B6 farelerin idrar yoluyla lityumu vücuttan atma konusunda en başarılı tür olduğu ortaya konulmuştur (El-Kassem ve Singh, 1983). Bu bulguları destekler nitelikte DBA/2J farelerinin, B6 farelere kıyasla LiCl ile eşleştirilen bir tattan daha fazla kaçınma davranışı gösterdikleri bildirilmiştir (Risinger ve Cunningham, 2000). Bu bulgulara dayanarak ikinci deneyde hastalık ortaya çıkarmak amacıyla kullanılan LiCl'in dozu artırılmıştır.

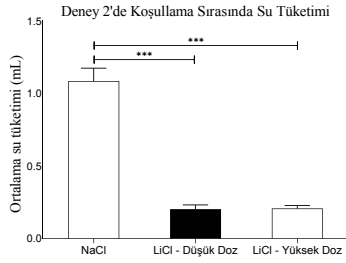
Yöntem

Hayvanların Bakımı

Hayvanların barınma, bakım ve beslenme durumları Deney 1 ile aynıdır.

Deney Grupları

İkinci deneyde, Deney 1'de olduğu gibi, daha önce herhangi bir deneyde kullanılmamış fareler kullanılmıştır. Fareler vücut ağırlıklarına göre eş üç gruba ayrıldı: LiCl – Düşük Doz (n = 8), LiCl – Yüksek Doz (n = 8) ve NaCl (n = 8). Koşullama sırasında, LiCl – Düşük Doz

Şekil 3. Koşullama Sırasında Su Tüketimi

Not. Deney 2’de koşullama sırasında ortalama sıvı tüketimi. Koşullama sırasında LiCl enjeksiyonu alan fareler NaCl enjeksiyonu alan fareler göre daha az su tüketmişlerdir. Değerler ortalama \pm SH şeklinde verilmiştir. *** $p < .001$

ve LiCl – Yüksek Doz grubundaki hayvanlara LiCl (i.p) enjeksiyonu ve NaCl grubundaki hayvanlara NaCl (i.p) enjeksiyonu yapıldı.

İlaçların Enjeksiyonu

LiCl 6 mEq/kg (düşük doz) ve 7.5 mEq/kg (yüksek doz) olarak uygulandı. Kontrol grubundaki hayvanlara %0.9 NaCl enjeksiyonları yapıldı. Tüm ilaçlar 0.3 mL/kg’lık bir oranda enjekte edildi.

İşlem

Hayvanların koşullanması ve test edilmesinde uygulanan işlemler Deney 1 ile aynıdır.

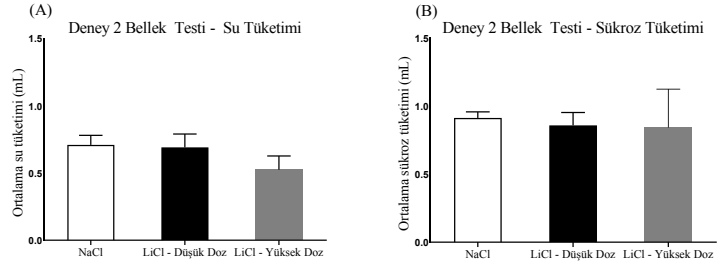
Veri Analizi

Veri analizinde kullanılan teknikler Deney 1 ile aynıdır.

Bulgular

Koşullama sırasında grupların tükettikleri sıvı miktarları Şekil 3’te gösterilmektedir. Tek yönlü ANOVA testi sonuçları grupların su tüketim miktarları arasında anlamlı bir fark olduğunu göstermiştir. Tukey testi sonuçları NaCl ($M = 1.085$, $SD = 0.252$) grubundaki hayvanların hem LiCl – Düşük Doz ($M = 0.202$, $SD = 0.084$; $p < .001$) hem de LiCl – Yüksek Doz ($M = 0.208$, $SD = 0.059$; $p < .001$) grubundaki hayvanlara kıyasla anlamlı derecede daha yüksek su tükettiğini göstermiştir. LiCl – Düşük Doz grubu ile LiCl – Yüksek Doz grubu arasında ise anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p = .998$).

Grupların tükettikleri su miktarları Şekil 4(A)’da gösterilmektedir. Tek yönlü ANOVA sonuçları üç grup arasında su tüketim miktarı açısından anlamlı bir fark olmadığını göstermektedir, $F(2, 21) = 1.227$, $p = .313$. Grupların tükettikleri sükröz miktarları Şekil 4(B)’de

Şekil 4. Bellek Testleri Sırasında Su ve Sükröz Tüketimi

Not. Deney 2’de bellek testleri sırasında ortalama sıvı tüketimi. (A) Birinci bellek testi sırasında grupların tükettikleri ortalama su miktarı gösterilmektedir. (B) İkinci bellek testi sırasında grupların tükettikleri ortalama sükröz miktarı gösterilmektedir. Koşullama sırasında yüksek dozda LiCl, düşük dozda LiCl veya NaCl enjeksiyonu alan farelerin bellek testleri sırasında su ve sükröz tüketimlerinde herhangi bir azalma gözlenmemiştir. Değerler ortalama \pm SH şeklinde verilmiştir.

gösterilmektedir. Tek yönlü ANOVA sonuçları üç grup arasında sükröz tüketim miktarı açısından anlamlı bir fark olmadığını göstermektedir $F(2, 21) = 0.199$, $p = .821$.

Tartışma

İkinci deneyimizin amacı, B6 farelerin KÇİ öğrenmesi daha yüksek dozlarda uygulanan LiCl sonrasında geliştirip geliştirmeyeceğini test etmektir. Bu amaçla yeni çevresel ipuçlarına maruz bırakılan hayvanlara 6 mEq/kg, 7.5 mEq/kg dozlarında LiCl veya % 0.9 NaCl enjeksiyonları yapıldı. Koşullama sırasında her iki dozda da LiCl verilen hayvanların tükettikleri su miktarında azalma gözlenirken, NaCl enjeksiyonu yapılan hayvanlarda bu durum söz konusu değildi. Koşullamadan 3 gün sonra tüm hayvanlar aynı çevresel uyarılara bırakılarak su ve sükröz tüketimleri test edildi. İki kere uygulanan bellek testinde hayvanlara herhangi bir enjeksiyon yapılmadı. Bellek testi sonuçları LiCl veya NaCl enjeksiyonu yapılan hayvanların tükettikleri su ve sükröz miktarlarında herhangi bir azalış olmadığını gösterdi. Bu sonuçlar B6 farelerin koşullama sırasında yüksek dozlarda LiCl enjeksiyonu alsalar bile, çevresel uyarılara karşı itim davranışı geliştirmediklerini göstermektedir.

Genel Tartışma

Bu çalışmada soy içi B6 farelerin LiCl ile ortaya çıkan hastalık ile eşleştirilmiş, çeşitli çevresel uyarılarından oluşan bağlama karşı koşullu itim davranışı geliştirip geliştirmeyeceğini araştırmaktı. Bu amaçla fareler koşullama sırasında, siyah-beyaz bantlarla duvarları kaplanan ve yataklık olarak kedi kumu kullanılan koşullama kafeslerine koyulduktan sonra içerisinde kırmızı ışıklandırma, beyaz gürültü ve limon yağı kokusu bulunan koşullama odasına 30 dakikalığına yerleştirildi. İlk

deneyde, koşullamanın 15. dakikasında farelere hastalık oluşturmak için 4.5 mEq/kg dozunda LiCl enjekte edildi. Kontrol hayvanlarına NaCl enjeksiyonları yapıldı. Koşullamadan 3 gün sonra gerçekleştirilen bellek testinde hayvanlar koşullama kafeslerine tekrar yerleştirildi ve koşullama odasına taşındı. 30 dakikalık bellek testinde hayvanlara herhangi bir enjeksiyon yapılmadı. KÇİ'nin göstergesi olarak hayvanların su ve sükröz tüketimleri ölçüldü. Bellek testinde LiCl veya NaCl enjeksiyonu yapılan hayvanların sıvı tüketim miktarları arasında anlamlı bir fark gözlenmedi. İkinci deneyde ise 6 mEq/kg ve 7.5 mEq olmak üzere LiCl iki farklı yüksek dozda uygulandı. Ancak bellek testinde hayvanların sıvı tüketimleri arasında tekrar anlamlı bir fark gözlenmedi.

Daha önceki çalışmalar sıçanların LiCl ile eşleştirilen çevreye tekrar maruz bırakıldıklarında sıvı tüketimlerinde azalma olduğunu ortaya koymaktadır (Rodriguez, 2013). C57BL/6J ile DBA/2J türleri ve büyük ile küçük türlerin melezenmesiyle elde edilen soy dışı farelerde yapılan iki çalışmada ise sıçanlar ile elde edilen bulgular tekrarlanmıştır (Kislal ve Blizard, 2016, 2018). Ancak bizim çalışmamızda soy içi B6 farelere yüksek dozlarda LiCl uygulandığında bile sıvı tüketimlerinde herhangi bir azalma bulgulanmadı. Hayvanlar LiCl uygulanan ortama tekrar maruz bırakıldığında NaCl uygulanan hayvanlar ile eşit miktarda su ve sükröz tüketimi gösterdiler. Hayvanların su tüketimlerinde azalma görülmemesinin bir nedeni, tek bir koşullamanın soy içi farelerde KÇİ öğrenmesinin oluşumu için yetersiz kalması olabilir. Sıçanlar ile yapılan çalışmalarda hayvanlara döngüler halinde birden çok koşullama gerçekleştirilmiştir (Cloutier ve ark., 2017). Tekrarlanan koşullama oturumları hayvanların LiCl ile oluşturulan hastalık ile çevresel uyaranlar arasında daha iyi bir ilişki kurmasına yol açıyor olabilir. Bunu destekler nitelikte sıçanlar ile yapılan bir çalışmada hayvanların tek bir koşullama oturumundan sonra öğrenmelerinin gerçekleşmediği gözlenmiştir (Parker ve ark., 1984). Ancak bizim soy dışı fareler ile daha önce yaptığımız çalışmalar tek bir koşullama oturumunun hayvanların KÇİ geliştirmesi için yeterli olduğunu ortaya koymaktadır (Kislal ve Blizard, 2016, 2018). İleriki çalışmalarda soy içi farelerin birden fazla koşullama sonucunda KÇİ geliştirilip geliştirmeyeceği araştırılmalıdır.

Soy içi farelerin KÇİ geliştirmemelerinin bir diğer nedeni, bu tür öğrenmenin gerçekleşmesi için gerekli nöronal süreçler ile ilişkili olabilir. Çalışmalar, B6 türü farelerin Morris su labirenti (Upchurch ve ark., 1988; Paylor ve ark., 1996; D'hooge ve ark., 2001), radyal labirent (Ammassari-Teule ve ark., 1993), bağlamsal korku koşullaması (Paylor ve ark., 1994; Bothe ve ark., 2004) gibi hipokampüse bağlı görevlerde yüksek performans sergilediğini; ancak çevresel kaçınma (Risinger

ve Cunningham, 2000), çevresel itinme (Siegfried ve Frischknecht, 1989), koşullu tat itinmesi (Risinger ve Cunningham, 2000) gibi görevlerde düşük performans sergilediğini göstermektedir. Sonuçlarımız bu bulgular ile birlikte ele alındığında, B6 soy içi farelerin BKİ geliştirmemesinin bir nedeni olarak bu tür öğrenmede görevli beyin bölgesinin amigdala olabileceğini ve B6 farelerdeki öğrenme eksikliğinin amigdala ile ilişkili görevlerde düşük performans göstermesine bağlı olduğunu düşündürmektedir. KÇİ öğrenmesinde görevli beyin bölgelerinin belirlenmesi için gelecekte daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir.

Daha önceki çalışmalarda Klu U olarak kullanılan bağlamanın özelliklerinin itinme davranışının oluşmasına etkisi olduğu gözlenmiştir (Prados ve Sansa, 2002). Bir çalışmada aydınlık ve küçük bir kafes LiCl ile ortaya çıkartılan hastalık hali ile eşleştirildiğinde Klu U işlevi kazansa da, büyük ve karanlık bir kafes aynı işlem sonrasında Klu U işlevi kazanmamıştır (Prados ve Sansa, 2002). Bu durumun kullanılan bağlamanın koloni kafesleri ile benzer olmasının nedeni olabileceği ileri sürülmüştür (Prados ve Sansa, 2002). Bizim çalışmamızdaki bağlamanın Klu U olarak işlev kazanmayışının nedeninin, bağlamanın içerisinde kullanılan uyarıcıların hayvanlarda itinme öğrenmesini oluşturmaya kadar güvenli olması pek olası değildir. Hayvanların kafeslerinde kullanılan ve rahat ettikleri talaş yerine sert ve taneçikli kedi kumu kullanılmıştır. Ayrıca bağlam içerisine güçlü bir koku, ses ve aydınlatma eklenmiştir. Bu uyarıcıların, hayvanların itinme öğrenmesinin geliştirmesine katkıda bulunacağı öngörülmüştür. Buna ek olarak daha önceki çalışmalar benzer uyarıcılar kullanılan bir bağlamda sıçanlar koşullandığını da göstermektedir (Rodriguez ve ark., 2000).

KÇİ öğrenmesi test etmede sıvı tüketiminden farklı olarak bazı davranışlar da analiz edilmiştir. Tipik bir örneği Limebeer ve arkadaşları (2006) tarafından kullanılan modelde, hayvanların LiCl ve NaCl enjeksiyonu aldıkları çevrelerde orofasiyal ve somatik tepkileri dijital olarak kaydedilmiştir (Limebeer ve ark., 2006) LiCl ile eşleştirilen ortama tekrar maruz kaldıklarında sıçanların koşullu öğürme refleksi gösterdiği bulunmuştur (Limebeer ve ark., 2006). Bu refleksin KÇİ öğrenmesinin bir göstergesi olduğu ileri sürülmüştür. Daha eski tarihli bir başka çalışmada itinme göstergesi olarak ön ayak hareketi ve öğürme refleksi kullanılmıştır (Parker ve ark., 1984). LiCl ile eşleştirilen ortamda hayvanların daha fazla sıklıkta ayak hareketi ve öğürme refleksi gösterdiği bulunmuştur (Parker ve ark., 1984). KÇİ'yi ölçmek için vücut yıkama, kaşıma, arka ayakları üzerine kalkma gibi başka davranışsal göstergeler de kullanılmıştır (Doobay ve ark., 2021). Çalışmamızdaki bulguların bir diğer açıklaması B6 farelerin KÇİ geliştirdiği ancak sıvı tüketiminin KÇİ öğrenmesini tespit etmede yetersiz kal-

ması olabilir. KÇİ öğrenmesinin yukarıda bahsi geçen davranışsal göstergeleri farelerde incelenmemiştir. Gelecekteki çalışmalarda KÇİ öğrenmesini tespit etmede sıvı tüketimi yerine davranışsal bazı göstergelerin kullanılıp kullanılmayacağı araştırılmalıdır.

Sonuç

Soy içi farelerin tek koşullama oturumunda LiCl enjeksiyonu yapılan çevreye tekrar maruz bırakıldığında sıvı tüketimlerinde herhangi bir azalma gözlenmemiştir. Bu durum KÇİ öğrenmesinin çeşitli nedenlere bağlı olarak gerçekleşmemesinden ya da sıvı tüketiminin KÇİ öğrenmesini göstermede yetersiz kalmasından kaynaklanıyor olabilir. Gelecekteki çalışmalar soy içi farelerin bu tür öğrenme görevinde sıçanlardan ve soy dışı farelerden neden farklı olduğuna dair fikirler sunabilir.

Kaynaklar

- Aapro, M. S., Molassiotis, A., & Olver, I. (2005). Anticipatory nausea and vomiting. *Supportive Care in Cancer: Official Journal of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer*, 13(2), 117–121. <https://doi.org/10.1007/s00520-004-0745-8>
- Amassari-Teule, M., Hoffmann, H. J., & Rossi-Arnaud, C. (1993). Learning in inbred mice: strain-specific abilities across three radial maze problems. *Behavior Genetics*, 23(4), 405–412. <https://doi.org/10.1007/BF01067443>
- Boakes, R. A., Tarrrier, N., Barnes, B. W., & Tattersall, M. H. (1993). Prevalence of anticipatory nausea and other side-effects in cancer patients receiving chemotherapy. *European Journal of Cancer (Oxford, England:1990)*, 29A(6), 866–870. [https://doi.org/10.1016/s0959-8049\(05\)80427-7](https://doi.org/10.1016/s0959-8049(05)80427-7)
- Bothe, G. W., Bolivar, V. J., Vedder, M. J., & Geistfeld, J. G. (2004). Genetic and behavioral differences among five inbred mouse strains commonly used in the production of transgenic and knockout mice. *Genes, Brain, and Behavior*, 3(3), 149–157. <https://doi.org/10.1111/j.1601-183x.2004.00064.x>
- Chan, A., Kim, H. K., Hsieh, R. K., Yu, S., de Lima Lopes, G., Jr, Su, W. C., Baños, A., Bhatia, S., Burke, T. A., & Keefe, D. M. (2015). Incidence and predictors of anticipatory nausea and vomiting in Asia Pacific clinical practice--a longitudinal analysis. *Supportive Care in Cancer: Official Journal of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer*, 23(1), 283–291. <https://doi.org/10.1007/s00520-014-2375-0>
- Cloutier, C. J., Kavaliers, M., & Ossenkopp, K. P. (2017). Rodent sex differences in disgust behaviors (anticipatory nausea) conditioned to a context associated with the effects of the toxin LiCl: Inhibition of conditioning following immune stimulation with lipopolysaccharide. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 152(4)–12. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2016.08.006>
- Cloutier, C. J., Zevy, D. L., Kavaliers, M., & Ossenkopp, K.-P. (2018). Conditioned disgust in rats (anticipatory nausea) to a context paired with the effects of the toxin LiCl: Influence of sex and the estrous cycle. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 173, 51–57. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2018.08.008>
- D'Hooge, R., & De Deyn, P. P. (2001). Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain research. Brain Research Reviews*, 36(1), 60–90. [https://doi.org/10.1016/s0165-0173\(01\)00067-4](https://doi.org/10.1016/s0165-0173(01)00067-4)

- Doobay, M., Cross-Mellor, S. K., Wah, D., Kavaliers, M., & Ossenkopp, K. P. (2021). Toxin-induced aversive context conditioning: Assessing active aversive behaviors conditioned to the context of an automated activity monitor. *Physiology & Behavior*, *240*, 113559. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2021.113559>
- El-Kassem, M., & Singh, S. M. (1983). Strain dependent rate of Li⁺ elimination associated with toxic effects of lethal doses of lithium chloride in mice. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, *19*(2), 257–261. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(83\)90049-7](https://doi.org/10.1016/0091-3057(83)90049-7)
- Hesketh P. J. (1999). Defining the emetogenicity of cancer chemotherapy regimens: relevance to clinical practice. *The Oncologist*, *4*(3), 191–196.
- Hesketh, P. J., Kris, M. G., Basch, E., Bohlke, K., Barbour, S. Y., Clark-Snow, R. A., Danso, M. A., Dennis, K., Dupuis, L. L., Dusetzina, S. B., Eng, C., Feyer, P. C., Jordan, K., Noonan, K., Sparacio, D., Somerfield, M. R., & Lyman, G. H. (2017). Antiemetics: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Update. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, *35*(28), 3240–3261. <https://doi.org/10.1200/JCO.2017.74.4789>
- Ilhan, C. F., Ulke, E. N., Urcelay, G. P., & Kislal, S. (under review). Genetic and environmental influences on one-trial conditioned context aversion in mice [Manuscript submitted for publication].
- Ingram, D. K. (1982). Lithium chloride-induced taste aversion in C57BL/6J and DBA/2J mice. *The Journal of General Psychology*, *106*, 233–249.
- José Prados, Joan Sansa, (2002). Differential Acquisition of Aversion by Two Distinctive Contexts Paired with Lithium-Induced Illness, *Learning and Motivation*, *33*(2), 253-268, <https://doi.org/10.1006/lmot.2001.1107>.
- Kamen, C., Tejani, M. A., Chandwani, K., Janelins, M., Peoples, A. R., Roscoe, J. A., & Morrow, G. R. (2014). Anticipatory nausea and vomiting due to chemotherapy. *European journal of Pharmacology*, *722*, 172–179. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2013.09.071>
- Kislal, S., & Blizard, D. A. (2016). Conditioned context aversion learning in the laboratory mouse. *Learning and Behavior*, *44*(4), 309–319. <https://doi.org/10.3758/s13420-016-0217-2>
- Kislal, S., & Blizard, D. A. (2018). Acquisition and retention of conditioned aversions to context and taste in laboratory mice. *Learning and Behavior*, *46*(2), 198–212. <https://doi.org/10.3758/s13420-017-0303-0>
- Limebeer, C. L., & Parker, L. A. (2000). The antiemetic drug ondansetron intereferes with lithium-induced conditioned rejection reactions, but not lithium induced taste avoidance in rats. *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes*, *26*(4), 371–384. <https://doi.org/10.1037/0097-7403.26.4.371>
- Limebeer, C. L., Hall, G., & Parker, L. A. (2006). Exposure to a lithium-paired context elicits gaping in rats: A model of anticipatory nausea. *Physiology & Behavior*, *88*(4-5), 398–403. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2006.04.014>
- McCann, M. J., Verbalis, J. G., & Stricker, E. M. (1989). LiCl and CCK inhibit gastric emptying and feeding and stimulate OT secretion in rats. *The American Journal of Physiology*, *256*(2 Pt 2), R463–R468. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1989.256.2.R463>
- Meachum, C. L., & Bernstein, I. L. (1992). Behavioral conditioned responses to contextual and odor stimuli paired with LiCl administration. *Physiology & Behavior*, *52*(5), 895–899. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(92\)90368-c](https://doi.org/10.1016/0031-9384(92)90368-c)
- Nachman, M., Rauschenberger, J., Ashe, J.H. (1977). Stimulus Characteristics in Food Aversion Learning. In: Milgram, N.W., Krames, L., Alloway, T.M. (eds) *Food Aversion Learning*. Springer, Boston, MA. https://doi.org/10.1007/978-1-4757-1299-5_3
- Parker, L. A., Hills, K., & Jensen, K. (1984). Behavioral CRs elicited by a lithium- or an amphetamine-paired contextual test chamber. *Animal Learning & Behavior*, *12*(3), 307–315. <https://doi.org/10.3758/BF03199972>
- Paylor, R., Tracy, R., Wehner, J., & Rudy, J. W. (1994). DBA/2 and C57BL/6 mice differ in contextual fear but not auditory fear conditioning. *Behavioral Neuroscience*, *108*(4), 810–817. <https://doi.org/10.1037//0735-7044.108.4.810>
- Paylor, R., Baskall-Baldini, L., Yuva, L., & Wehner, J. M. (1996). Developmental differences in place-learning performance between C57BL/6 and DBA/2 mice parallel the ontogeny of hippocampal protein kinase C. *Behavioral Neuroscience*, *110*(6), 1415–1425. <https://doi.org/10.1037//0735-7044.110.6.1415>
- Revusky, S., & Parker, L. A. (1976). Aversions to unflavored water and cup drinking produced by delayed sickness. *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes*, *2*(4), 342–353. <https://doi.org/10.1037/0097-7403.2.4.342>
- Risinger, F. O., & Cunningham, C. L. (2000). DBA/2J mice develop stronger lithium chloride-induced conditioned taste and place aversions than C57BL/6J mice. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, *67*(1), 17–24. [https://doi.org/10.1016/S0091-3057\(00\)00310-5](https://doi.org/10.1016/S0091-3057(00)00310-5)

- Rodriguez, M., Lopez, M., Symonds, M., & Hall, G. (2000). Lithium-induced context aversion in rats as a model of anticipatory nausea in humans. *Physiology & Behavior*, *71*(5), 571–579. [https://doi.org/10.1016/s0031-9384\(00\)00376-0](https://doi.org/10.1016/s0031-9384(00)00376-0)
- Rodríguez M. (2013). Individual differences in chemotherapy-induced anticipatory nausea. *Frontiers in Psychology*, *4*, 502. <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2013.00502>
- Roscoe, J. A., Morrow, G. R., Aapro, M. S., Molassiotis, A., & Olver, I. (2011). Anticipatory nausea and vomiting. *Supportive Care in Cancer: Official Journal of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer*, *19*(10), 1533–1538. <https://doi.org/10.1007/s00520-010-0980-0>
- Siegfried, B., & Frischknecht, H. R. (1989). Place avoidance learning and stress-induced analgesia in the attacked mouse: role of endogenous opioids. *Behavioral and Neural Biology*, *52*(1), 95–107. [https://doi.org/10.1016/s0163-1047\(89\)90206-9](https://doi.org/10.1016/s0163-1047(89)90206-9)
- Siekłucka-Dziuba, M., Gustaw, K., Dziuba, J., & Kleinrok, Z. (1998). Wpływ chlorku litu na zachowanie szczurów poddanych krótkotrwałej oligemicznej hipoksji [The effect of lithium chloride on the rat behavior after short-term oligemic hypoxia]. *Annales Universitatis Mariae Curie-Skłodowska. Sectio D: Medicina*, *53*, 59–69.
- Stockhorst, U., Klosterhalfen, S., Klosterhalfen, W., Winkelmann, M., & Steingrueber, H. J. (1993). Anticipatory nausea in cancer patients receiving chemotherapy: classical conditioning etiology and therapeutical implications. *Integrative Physiological and Behavioral Science: The Official Journal of the Pavlovian Society*, *28*(2), 177–181. <https://doi.org/10.1007/BF02691224>
- Stockhorst, U., Enck, P., & Klosterhalfen, S. (2007). Role of classical conditioning in learning gastrointestinal symptoms. *World Journal of Gastroenterology*, *13*(25), 3430–3437. <https://doi.org/10.3748/wjg.v13.i25.3430>
- Symonds, M., Hall, G., Lopez, M., Loy, I., Ramos, A., & Rodriguez, M. (1998). Is fluid consumption necessary for the formation of context-illness associations? An evaluation using consumption and blocking tests. *Learning and Motivation*, *29*(2), 168–183. <https://doi.org/10.1006/lmot.1997.0998>
- Symonds, M., Hall, G. (2000). Contextual conditioning with an illness US is attenuated by the antiemetic ondansetron. *Psychobiology* *28*, 360–366. <https://doi.org/10.3758/BF03331993>
- Upchurch, M., & Wehner, J. M. (1988). Differences between inbred strains of mice in Morris water maze performance. *Behavior Genetics*, *18*(1), 55–68. <https://doi.org/10.1007/BF01067075>

Summary

Anticipatory Nausea and Vomiting in C57BL/6J Inbred Mice

Çınar Furkan İlhan

Middle East Technical University

Sezen Kışlal¹

Middle East Technical University

Cancer patients experience nausea and vomiting because of emetogenic chemotherapy treatment (Hesketh, 1999). Antiemetic drugs are prescribed to alleviate these iatrogenic effects (Hesketh et al., 2017). However, if chemotherapy-induced nausea and vomiting are not effectively controlled, cancer patients may associate their feelings of illness with environmental stimuli in the hospital (Roscoe et al., 2011). As a result, 30% of cancer patients develop anticipatory nausea and vomiting (ANV) (Kamen et al., 2014). Patients who develop ANV report a low quality of life due to impaired in physical, cognitive and social functionality and they may discontinue cancer treatment (Kamen et al., 2014).

The ANV is accepted as an instance of classical conditioning (Stockhorst et al., 2007). In the terminology of classical conditioning, chemotherapy drugs are the unconditioned stimulus (US) that causes nausea and vomiting which is the unconditioned response (UR) (Stockhorst et al., 1993). As the chemotherapy sessions continue, patients associate environmental stimuli in the hospital with nausea and vomiting which causes these stimuli to become conditioned (CS) (Rodríguez, 2013). Smells, equipment, sounds, etc. in the clinic are potential CSs (Stockhorst et al., 2007). As chemotherapy sessions progress, reminders of chemotherapy treatment induce nausea (Chan et al., 2015). This phenomenon, observed in cancer patients as a result of classical conditioning, is called ANV (Rodríguez, 2013). The risk of developing ANV increases with repeated chemotherapy sessions and may persist long after the treatment (Aapro et al., 2005). Understanding the psychological and neurobiological mechanisms of ANV has substantial clinical value to develop new treatment methods.

Conditioned Context Aversion (CCA) is employed as the animal model of ANV (Cloutier et al., 2017, 2018; Limebeer and Parker, 2000). Researchers have shown that injecting illness-inducing agents in a novel environment containing various cues causes rats to develop aversion to that context. (Rodríguez et al., 2000). In this model, illness-causing agent is the US that causes the

gastrointestinal stress which is the UR. The context in which illness is experienced is the CS. (Symonds and Hall, 2000). Lithium chloride (LiCl) is frequently used as an illness inducing agent (Symonds et al., 1998).

Although extensive studies have been conducted in mice to elucidate the role of specific genes and transgenes involved in the neurobiological basis of learning and memory, CCA studies have been mainly conducted on rats (Cloutier et al., 2017; Parker et al., 1984; Rodríguez et al., 2000). Only one recent study investigated the development CCA in mice (Kışlal and Blizard, 2016).

In this study, we investigated CCCA learning in C57BL/6J (B6) mice, a strain that commonly used in memory and learning studies. Our aim was to evaluate whether inbred B6 mice would show conditioned aversion to a illness-paired context.

Experiment 1

The aim of our first experiment was to investigate whether inbred B6 mice would develop CCA to a context after its pairing with LiCl-induced illness.

Method

Housing

12-week-old B6 male mice weighing between 19 and 25 g were used. Mice were housed in cages with transparent walls (365 x 207 x 140 mm). The colony room was maintained on a 12-hour light/dark cycle at 24 °C +/-1. Animals were given *ad libitum* access to standard mouse chow but water restricted as described. Experiments were ethically approved by the Middle East Technical University Animal Ethics Committee.

Experimental Groups

Mice were divided into two groups according to their body weights: LiCl (n = 10) and NaCl (n = 9). During conditioning, animals in the LiCl group received injections of lithium chloride (LiCl); animals in the NaCl group received an injections of sodium chloride (NaCl).

Drug Injection

NaCl, LiCl and sucrose were purchased Sigma (St. Louis, MO, USA). LiCl was administered at a dose of 4.5 mEq/kg NaCl injections (0.9%) were used as sham treatment. All drugs were injected at a volume of 0.3 mL/kg. All injections were given intraperitoneally.

Procedure

The experiment consisted of habituation, water acclimation (WA), conditioning, recovery, taste familiarization, and recovery phases.

First, the animals were handled 3 minutes per day for the last 5 days of the 7-day habituation phase. On the last day, water restriction was started at 17:30. Then, the animals received 3 WA sessions during which standard plastic water bottles were presented only between 10:00-10:30 and 17:00-17:30. On the next day of the WA session, 30 minutes conditioning was conducted starting at 12:30. Various visual, auditory, tactile, and olfactory stimuli were added to the conditioning cages and the conditioning room to create a novel context. The walls of the conditioning cages were covered with black and white tapes, and cat litter was used as bedding in the conditioning cages. In the conditioning room, 75 decibels of white noise, 60 watts of dim red light, and lemon oil scent were employed. During conditioning, each animal was placed in its conditioning cage and moved to the conditioning room. After 15 minutes, animals received injections of LiCl to induce illness or NaCl as sham treatment. Green glass bottles with stainless steel ball-bearing spouts were used to present water and sucrose. Fluid consumption was measured by weighing these bottles before and after conditioning. During the two-day recovery period, the animals were given access to water as in the WA phase in their homecages. The next day following the recovery period, the animals were given sucrose solution (0.5%) in their home cages in the colony room between 12:30-13:00 to familiarize them to the taste of the solution and water between 17:00-17:30 hours. After the next day of the taste familiarization phase, each animal was placed back in the conditioning cages and conditioning room for 30 minutes starting at 12:30 without any injection. In the first retention, half of the mice in both groups (LiCl and NaCl) were tested for water consumption and the other half for sucrose consumption. In the second retention, the mice were tested with the solution that was not used in the first retention test.

Data Analysis

Statistical analyzes were performed using GraphPad Prism (Version 9). T-test, one-way analysis of variance (ANOVA) and Tukey post-hoc tests were used to determine statistical significance for the conditioning and retention tests. Alpha level was set at $p < .05$.

Results

Independent sample t-test results showed that LiCl group ($M = 0.183$, $SD = 0.094$) drank significantly less water than NaCl group ($M = 1.001$, $SD = 0.184$) during conditioning, $t(17) = 12.36$, $p < .001$.

During retentions, independent sample t-test results showed no significant difference in water consumption among LiCl ($M = 0.784$, $SD = 0.102$) and NaCl ($M = 0.843$, $SD = 0.109$) groups, $t(17) = 1.224$, $p = .233$. Also no significant difference was observed in sucrose consumption among LiCl ($M = 0.717$, $SD = 0.203$) and NaCl ($M = 0.844$, $SD = 0.165$) groups, $t(17) = 1.487$, $p = .155$.

The aim of our first experiment was to test whether B6 mice would develop CCA. During conditioning, animals injected with LiCl but not NaCl showed suppression of water consumption. However, there was no difference in both sucrose and water consumption during retention test.

Experiment 2

In our second experiment, we increased the dose of LiCl to see whether B6 mice would develop CCA with higher doses.

Housing

Housing conditions were the same as our first experiment.

Experimental Groups

Mice were divided into three groups according to their body weights: LiCl – Low Dose ($n = 8$), LiCl – High Dose ($n = 8$) and NaCl ($n = 8$). During conditioning, animals in the LiCl – Low Dose group was injected with 6 mEq/kg LiCl, and animals in the LiCl – High Dose group was injected with 7.5 mEq/kg LiCl and animals in the NaCl group were injected with 0.9% NaCl.

Drug Injections

LiCl was administered at 6 mEq/kg (low dose) and 7.5 mEq/kg (high dose) doses. 0.9% NaCl injections were used as sham treatment. All drugs were injected at a rate of 0.3 mL/kg.

Procedure

The procedure was the same as that used in the first experiment.

Data Analysis

Data analysis was the same as our first experiment.

Results

One-way ANOVA test results showed that there was a significant difference in water consumption among the three groups during conditioning. Tukey post-hoc test results showed that NaCl ($M = 1.085$, $SD = 0.252$) group had lower water intake than both LiCl – Low Dose ($M = 0.202$, $SD = 0.084$; $p < .001$) and LiCl – High Dose ($M = 0.208$, $SD = 0.059$; $p < .001$) groups. No significant difference was observed among the LiCl – Low Dose group and the LiCl – High Dose group ($p = .998$).

During retention, one-way ANOVA results showed no significant difference in water consumption, $F(2, 21) = 1.227$, $p = .313$ among the three groups. Also, there was no significant difference in sucrose consumption among the three groups, $F(2, 21) = 0.199$, $p = .821$.

The aim of our second experiment was to test whether B6 mice would develop CCA with higher doses of LiCl. During retention tests, the three groups displayed similar water and sucrose consumption.

Discussion

The present study was conducted to investigate whether inbred B6 mice would develop CCA against a novel context. In the first experiment, mice were injected with LiCl at a dose of 4.5 mEq/kg to induce illness. In the second experiment, LiCl dose was increased to 6 mEq/kg and 7.5 mEq/kg. Control animals were injected with saline. During retention tests, water and sucrose consumptions were used as the index of CCA. In both experiments, there was no significant difference in sucrose and water consumption of animals injected with either LiCl or NaCl.

Previous studies have shown that fluid consumption of rats decreases when they are re-exposed to the environment where they received LiCl injections (Rodríguez, 2013). These findings also replicated in outbred mice (Kislal and Blizard, 2016, 2018). However, in our study, no significant reduction in fluid consumption was observed even when LiCl were administered in high doses. One reason for the lack of aversion-induced suppression of fluid consumption may be that a single conditioning trial was insufficient for inbred mice to develop CCA. Previously, one study found that rats did not develop aversion after a single conditioning trial (Parker et al., 1984). However, our previous studies with outbred mice reveal that a single conditioning trial is sufficient for animals to develop CCA (Kislal and Blizard, 2016, 2018). Future studies should investigate whether inbred mice will develop CCA with multiple conditioning trial.

Another reason for the lack of aversion in inbred mice may be related to neuronal processes required for

such learning to occur. Studies have shown that B6 mice show high performance in hippocampus- but not amygdala-related task (D'hooge et al., 2001; Risinger and Cunningham, 2000). However, the neural substrate for CCA learning remain elusive. Further research is needed to identify brain regions involved in CCA learning.

Researchers also measured other behaviors to investigate the development of CCA. Limebeer et al. (2006), recorded orofacial and somatic responses of animals in an environment where they received LiCl and NaCl injections (Limebeer et al., 2006). Rats were found to exhibit a conditioned gaping reaction when they are re-exposed to the reinforced context (Limebeer et al., 2006). It has been suggested that this reflex is an indicator of CCA learning. In another study, forepaw movement and gaping reflex were employed to investigate CCA (Parker et al., 1984). It was found that animals showed more frequent foot movements and gaping reflexes in the environment paired with LiCl (Parker et al., 1984). Other behavioral indicators, such as body washing, scratching, and rearing were also used to measure CCA (Doobay et al., 2021). Another explanation of our findings may be that B6 mice did develop CCA, but fluid consumption was insufficient to detect CCA learning. The aforementioned behavioral indicators of aversion learning have not been studied in mice. Future studies should investigate whether some behavioral indicators can be used instead of fluid consumption to detect CCA learning.

Conclusion

No suppression of fluid consumption was observed when inbred mice were re-exposed to the environment where they experienced illness. The reason for this observation may be that inbred mice is not sensitive to develop CCA with our procedural design. It is also possible that inbred mice did develop CCA, but our response measure was not suitable to detect the development of aversion learning. Future studies may offer insights into why inbred mice differ from rats and inbred mice in CCA learning.