

T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

NÖROİNFLAMASYONUN DİKKAT EKSİKLİĞİ  
HİPERAKTİVİTE BOZUKLUĞU PATOFİZYOLOJİSİNDEKİ  
ROLÜNÜN İNCELENMESİ

Dr. Sabide Duygu UYGUN

Temel Nörolojik Bilimler Programı  
DOKTORA TEZİ

ANKARA

2025



T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

NÖROİNFLAMASYONUN DİKKAT EKSİKLİĞİ  
HİPERAKTİVİTE BOZUKLUĞU PATOFİZYOLOJİSİNDEKİ  
ROLÜNÜN İNCELENMESİ

Dr. Sabide Duygu UYGUN

Temel Nörolojik Bilimler Programı  
DOKTORA TEZİ

TEZ DANIŞMANI  
Prof. Dr. Emine EREN-KOÇAK

ANKARA  
2025

**ONAY SAYFASI****Nöroinflamasyonun Dikkat Eksikliği Hiperaktivite Bozukluğu****Patofizyolojisindeki Rolünün İncelenmesi****Dr. Sabide Duygu Uygun****Danışman: Prof. Dr. Emine Eren-Koçak**

Bu tez çalışması 17.01.2025 tarihinde jürimiz tarafından “Temel Nörolojik Bilimler Programı” nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

|                      |  |
|----------------------|--|
| <b>Jüri Başkanı:</b> | Prof. Dr. Yavuz Ayhan<br>(Hacettepe Üniversitesi)        |
| <b>Üye:</b>          | Doç. Dr. Gül Yalçın Çakmaklı<br>(Hacettepe Üniversitesi) |
| <b>Üye:</b>          | Doç. Dr. Dilek Ünal<br>(Hacettepe Üniversitesi)          |
| <b>Üye:</b>          | Doç. Dr. Deniz Ceylan Tufan Özalp<br>(Koç Üniversitesi)  |
| <b>Üye:</b>          | Doç. Dr. Hale Yapıcı Eser<br>(Koç Üniversitesi)          |

Bu tez, Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

27 Ocak 2025

Prof. Dr. Müge Yemişçi Özkan  
**Enstitü Müdürü**

## YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan **“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”** kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. <sup>(1)</sup>
- Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren ... ay ertelenmiştir. <sup>(2)</sup>
- Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir. <sup>(3)</sup>

03/02/2025

Sabide Duygu UYGUN

<sup>1</sup> “Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”

- (1) Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez **danışmanın** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulu** iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.
- (2) Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internetten paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez **danışmanın** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulunun** gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.
- (3) Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, **tezin yapıldığı kurum** tarafından verilir \*. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, **ilgili kurum ve kuruluşun önerisi** ile **enstitü** veya **fakültenin** uygun görüşü üzerine **üniversite yönetim kurulu** tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir.  
Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir.

## ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Prof. Dr. Emine Eren-Koçak danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

Dr. Sabide Duygu UYGUN

## TEŞEKKÜR

Gebeliğim boyunca hayvan modelini oluşturduğum, doğumuna kadar davranış deneylerini yaptığım ve doğumu sonrasında süt izinlerimde moleküler analizlerini tamamladığım bu tez çalışmasını canım oğlum Bartu'ya adıyorum.

Her koşulda bana sonsuz desteğini karşılıksız sunan canım aileme ve sevgili eşim Emre Uygun'a,

Doktora eğitimim boyunca bilgi ve tecrübesini, bilimsel merakını örnek aldığım, tez çalışmamın her aşamasına anlayış ve içtenlikle destek olan değerli tez hocam Prof. Dr. Emine Eren-Koçak'a,

Çalışmamın tüm aşamalarında büyük emeği olan, desteğini hiç esirgemeyen değerli arkadaşım Dr. Aslıhan Bahadır-Varol'a,

Çalışmamın davranış deneyleri sırasında emeği olan değerli arkadaşım Tansu Bilge Köse'ye,

Doktora tez sürecimin başlangıcından itibaren değerli önerileriyle katkı sağlayan Prof. Dr. Aygün Ertuğrul ve Doç. Dr. Hale Yapıcı-Eser'e,

Doktora sürecimin tanığı ve destekçisi canım arkadaşlarım Uzm. Dr. Tuğçe Bilbay, Doç. Dr. Dilek Ünal ve Dr. Taha Solakoğlu'na,

Çalışmamın tamamlanması için beni destekleyen başta değerli hocam Prof. Dr. Didem Behice Öztop olmak üzere, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk ve Ergen Ruh Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı öğretim üyelerine,

Enstitüdeki eğitimim süresince çalışmalarına katkı sağlayan Prof. Dr. Müge Yemişçi-Özkan, Prof. Dr. Hülya Karataş-Kurşun, Dr. Buket Demir, Dr. Canan Çakır-Aktaş, Dr. Melike Sever-Bahçekapılı, Dr. Doğa Başaran, Dr. Bengisu Solgun, Dr. Gökçe Gürler, Mesut Fırat, Prof. Dr. Eda Derle-Çiftçi, Dr. Onur Çağın Gürlek, Dr. Emre Cem Esen, Dr. Gülce Küreli, Dr. Ecehan Erk, Dr. Kadir Soylu, Dilan Bozanoğlu, Beyza Türken, Serenay Karataş, Meltem Anlı, Nursel İlikli, Hülya Erener, Tuğba Sarıtaş ve Zafer Akdoğan'a,

Çalışmamı destekleyen Hacettepe Üniversitesi BAP Koordinasyon Birimi'ne (TDK-2021-19407) sonsuz teşekkür ve minnetlerimi sunarım.

Dr. Sabide Duygu UYGUN

## ÖZET

**Uygun, S.D., Nöroinflamasyonun Dikkat Eksikliği Hiperaktivite Bozukluğu Patofizyolojisindeki Rolünün İncelenmesi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Temel Nörolojik Bilimler Programı Doktora Tezi, Ankara, 2025.** Dikkat eksikliği hiperaktivite bozukluğunun (DEHB) etiyolojisinde yüksek genetik kalıtım, yapısal/fonksiyonel beyin anormallikleri ve dopamin/noradrenalin dengesizlikleri öne çıkmakta, gen-çevre etkileşimlerinin rolü vurgulanmaktadır. Bu çalışmada, perinatal dönemde nikotine maruz bırakılmış (PNM) olan farelerin prefrontal korteksinde (PFK) nöroinflamatuvar sinyalizasyon ve DEHB benzeri davranış değişiklikleri incelenmiştir. PNM fareler, çiftleşmenin 2 hafta öncesinden doğum sonrası süttten kesilene kadar içme sularında 300 µg/ml nikotin ve %2 sükröz çözeltisine maruz bırakılmış, kontrol grubuna ise yalnızca %2 sükrözlu içme suyu verilmiştir. Postnatal 5. haftada davranış testleri uygulanmış, PFK'nin anterior singulat korteks (ASK), prelimbik korteks (PL) ve infralimbik korteks (IL) bölgelerinde kortikal kalınlık (KK), mikroglia aktivasyonu ve NF-κB sinyalizasyonu immünohistokimya ile değerlendirilmiştir. PNM farelerinde dikkat bozukluğu ile birlikte ASK'de artmış KK, NF-κB aktivasyonu, mikroglia sayısı ve aktivasyonu saptanmıştır. Sonuçlar, PNM'nin nöroinflamasyon aracılığıyla DEHB gelişimine katkıda bulunabileceğini göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** DEHB, nöroinflamasyon, kortikal kalınlık, annenin sigara kullanımı, perinatal nikotine maruz bırakma

Bu çalışma Hacettepe Üniversitesi (TDK-2021-19407) tarafından desteklenmiştir.

## ABSTRACT

**Uygun, S. D., Investigation of the Role of Neuroinflammation in the Pathophysiology of Attention Deficit Hyperactivity Disorder, Hacettepe University Graduate School of Health Sciences, Doctor of Philosophy Thesis in Basic Neurologic Sciences (Neuroscience), Ankara, 2025.** In the etiology of attention deficit/hyperactivity disorder (ADHD), high genetic heritability, structural/functional brain abnormalities, and dopamine/noradrenaline imbalances are prominent, emphasizing the role of gene-environment interactions. This study investigated neuroinflammatory signaling and ADHD-like behavioral changes in the prefrontal cortex (PFC) of perinatal nicotine-exposed (PNE) mice. PNE mice were exposed to a solution of 300 µg/ml nicotine and 2% sucrose in their drinking water from two weeks before mating until weaning, while the control group received only 2% sucrose. Behavioral tests were conducted in the 5th postnatal week, and cortical thickness (CT), microglial activation, and NF-κB signaling were assessed using immunohistochemistry in the anterior cingulate cortex (ACC), prelimbic cortex (PL), and infralimbic cortex (IL) of the PFC. Increased CT, microglial cell number and activation, and NF-κB expression were observed in the ACC of PNE mice, correlating with attentional impairment. These findings suggest that PNE may contribute to ADHD development through neuroinflammation.

**Key Words:** ADHD, neuroinflammation, cortical thickness, maternal smoking, perinatal nicotine exposure

This study is supported by Hacettepe University (TDK-2021-19407).

## İÇİNDEKİLER

|   |      |
|---|------|
| ONAY SAYFASI  | iii  |
| YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI  | iv   |
| ETİK BEYAN  | v    |
| TEŞEKKÜR  | vi   |
| ÖZET  | vii  |
| ABSTRACT  | viii |
| İÇİNDEKİLER   | ix   |
| SİMGELER VE KISALTMALAR   | xi   |
| ŞEKİLLER  | xiv  |
| TABLOLAR  | xv   |
| <b>1. GİRİŞ</b>   | 1    |
| <b>2. GENEL BİLGİLER</b>  | 4    |
| 2.1. Dikkat Eksikliği/Hiperaktivite Bozukluğunun Klinik Özellikleri                         | 4    |
| 2.2. Dikkat Eksikliği/Hiperaktivite Bozukluğunda Anormal Kortikal Kalınlık Bulguları        | 5    |
| 2.3. Dikkat Eksikliği/Hiperaktivite Bozukluğu Etiyolojisinin Nöroinflamasyonla İlişkisi     | 6    |
| 2.4. Nöroinflamasyon, Mikroglia Aktivasyonu ve Sinaptik Budanma İlişkisi                    | 12   |
| 2.5. Dikkat Eksikliği/Hiperaktivite Bozukluğuna Yönelik Perinatal Nikotin Maruziyeti Modeli | 14   |
| <b>3. GEREÇ VE YÖNTEM</b>   | 16   |
| 3.1. Perinatal Nikotin Maruziyeti Modeli  | 16   |
| 3.2. Davranışsal Analizler  | 17   |
| 3.2.1. Lokomotor Aktivite ve Açık Alan Testi  | 18   |
| 3.2.2. Y-Labirent Testi   | 19   |
| 3.2.3. Uçurumdan Kaçınma Reaksiyonu Testi   | 19   |
| 3.3. Kortikal Kalınlığın Değerlendirilmesi  | 20   |
| 3.4. İmmünofloresan Boyama  | 21   |
| 3.4.1. Iba-1'in İmmünofloresan İşaretlenmesi  | 21   |
| 3.4.2. NF-κB'nin İmmünofloresan İşaretlenmesi   | 22   |
| 3.5. İstatistiksel Analiz   | 22   |

|  |    |
|--|----|
| <b>4. BULGULAR</b>                                       | 23 |
| 4.1. Davranışsal Sonuçlar                                | 23 |
| 4.1.1. Lokomotor Aktivite ve Açık Alan Testi             | 23 |
| 4.1.2. Y-Labirent Testi                                  | 25 |
| 4.1.3. Uçurumdan Kaçınma Reaksiyonu Testi                | 27 |
| 4.2. Kortikal Kalınlık Sonuçları                         | 27 |
| 4.3. İmmünofloresan Boyama Sonuçları                     | 28 |
| <b>5. TARTIŞMA</b>                                       | 35 |
| <b>6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER</b>                           | 43 |
| 6.1. Sonuçlar  | 43 |
| 6.1.1. Davranışsal Sonuçlar                              | 43 |
| 6.1.2. Kortikal Kalınlık Sonuçları                       | 43 |
| 6.1.3. Mikroglial Aktivasyon ve NF- $\kappa$ B Sonuçları | 43 |
| 6.1.4. Cinsiyet Farklılıklarına İlişkin Sonuçlar         | 43 |
| 6.1.5. Genel Sonuçlar                                    | 44 |
| 6.2. Öneriler  | 44 |
| 6.2.1. Gelecek Çalışmalar İçin Öneriler                  | 44 |
| 6.2.2. Klinik Uygulamalar İçin Öneriler                  | 44 |
| 6.2.3. Toplum Sağlığı İçin Öneriler                      | 45 |
| <b>7. KAYNAKLAR</b>                                      | 46 |
| <b>8. EKLER</b>  | 54 |
| EK-1: Hayvan Deneyleri Etik Kurul Kararı                 |    |
| EK-2: Tez Çalışması Orijinallik Raporu                   |    |
| EK-3: Dijital Makbuz                                     |    |
| <b>9. ÖZGEÇMİŞ</b>                                       | 57 |

## SİMGELER VE KISALTMALAR

|   |  |
|---|--|
| <b>AAT -</b>  | Açık Alan Testi  |
| <b>ABCD -</b>   | Ergen Beyni Bilişsel Gelişimi Çalışması (Adolescent Brain Cognitive Development) |
| <b>AL -</b>   | Alarminler   |
| <b>ANOVA -</b>  | Varyans Analizi (Analysis of Variance)   |
| <b>BOS -</b>  | Beyin Omurilik Sıvısı  |
| <b>CRP -</b>  | C-Reaktif Protein  |
| <b>D2 -</b>   | Dopamin D2 Reseptörü   |
| <b>DAMP -</b>   | Hasarla İlişkili Moleküler Paternler   |
| <b>DEHB -</b>   | Dikkat Eksikliği Hiperaktivite Bozukluğu   |
| <b>ELISA -</b>  | Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Enzim Bağlı İmmünosorbent Deneyi)             |
| <b>FIJI -</b>   | ImageJ tabanlı görüntü analizi yazılımı  |
| <b>GluN1, GluN2B -</b>                                | NMDA Glutamat Reseptör Alt Tipleri   |
| <b>Iba-1 -</b>  | Ionized Calcium-Binding Adapter Molecule 1 (Mikroglia belirteci)                 |
| <b>IFN-<math>\gamma</math> -</b>                      | İnterferon Gama  |
| <b>IL -</b>   | Infralimbik Korteks  |
| <b>IL-1, IL-2, IL-6, IL-10, IL-13, IL-16, IL-17 -</b> | İnterlökinler (proinflamatuvar ve anti-inflamatuvar sitokinler)                  |
| <b>IP-10 -</b>  | İnterferon Gamma-Induced Protein 10  |
| <b>IQR -</b>  | Çeyrekler Arası Aralık (Interquartile Range)                                     |

|                                  |  |
|----------------------------------|--|
| <b>KK -</b>                      | Kortikal Kalınlık  |
| <b>LMA -</b>                     | Lokomotor Aktivite   |
| <b>MCP-1 -</b>                   | Monosit Kemoatraktan Protein 1   |
| <b>MRG -</b>                     | Manyetik Rezonans Görüntüleme  |
| <b>NF-<math>\kappa</math>B -</b> | Nükleer Faktör Kappa B<br>(Proinflamatuvar Transkripsiyon Faktörü)           |
| <b>NLR -</b>                     | NOD-benzeri Reseptör   |
| <b>OSB -</b>                     | Otizm Spektrum Bozukluğu   |
| <b>PAMP -</b>                    | Patojen-İlişkili Moleküler Paternler   |
| <b>PBS -</b>                     | Fosfat Tamponlu Salin (Phosphate Buffered Saline)                            |
| <b>PBST -</b>                    | Fosfat Tamponlu Salin + Triton X-100   |
| <b>PFA -</b>                     | Paraformaldehit  |
| <b>PFK -</b>                     | Prefrontal Korteks   |
| <b>PL -</b>                      | Prelimbik Korteks  |
| <b>PNM -</b>                     | Perinatal Nikotin Maruziyeti   |
| <b>PRR -</b>                     | Patern Tanıma Reseptörleri   |
| <b>RANTES -</b>                  | Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted (Kemoatraktan) |
| <b>SEM -</b>                     | Standart Hata (Standard Error of the Mean)                                   |
| <b>SHS -</b>                     | Spontan Hipertansif Sıçanlar   |
| <b>SPSS -</b>                    | Statistical Package for the Social Sciences (İstatistik Yazılımı)            |
| <b>TLR -</b>                     | Toll-Like Receptor (Toll-benzeri Reseptör)                                   |
| <b>TLR4 -</b>                    | Toll-benzeri Reseptör 4 (Toll-Like Receptor)                                 |

|                                  |                                       |
|----------------------------------|---------------------------------------|
| <b>TNF-<math>\alpha</math></b> - | Tümör Nekroz Faktörü Alfa             |
| <b>TNF-<math>\beta</math></b> -  | Tümör Nekroz Faktörü Beta             |
| <b>UKRT</b> -                    | Uçurumdan Kaçınma Reaksiyonu<br>Testi |
| <b>WKR</b> -                     | Wistar Kyoto Sıçanlar                 |
| <b>YLT</b> -                     | Y-Labirent Testi                      |
| <b>Z-Stack</b> -                 | Z-Yığınlı Görüntüleme                 |



## ŞEKİLLER

| <b>Şekil</b>   | <b>Sayfa</b> |
|--|--------------|
| 2.1. Kronolojik yaşın gelişimsel olarak DEHB belirtilerinin görünümü ve şiddeti üzerine etkisi.                        | 5            |
| 2.2. DEHB’de kronolojik yaşa göre kortikal maturasyonda gecikme ve kortikal incelme.                                   | 6            |
| 2.3. DEHB’de maternal immun aktivasyon aracılı nöroinflamasyon hipotezi.   | 7            |
| 2.4. Nöroinflamasyon sürecinde nöron ve glia hücrelerinde gözlenen morfolojik ve işlevsel değişiklikler.               | 13           |
| 2.5. Jüvenil dönemde PFK’da mikroglia aracılı maturasyon.  | 14           |
| 2.6. Prenatal nikotin maruziyetinde oksidatif stres ve inflamasyon hipotezi.   | 15           |
| 3.1. Perinatal nikotin maruziyetini gösteren zaman çizelgesi.  | 17           |
| 3.2. Perinatal dönemde nikotine maruz kalanlar arasından DEHB fare modelini seçmek için kullanılan kriterin gösterimi. | 18           |
| 3.3. Davranış testlerinin düzenekleri.   | 19           |
| 3.4. Prefrontal korteksin alt bölgelerinin kortikal kalınlık ölçümü.   | 20           |
| 4.1. Açık alan testi davranış sonuçları.   | 24           |
| 4.2. Y-Labirent ve uçurumdan kaçınma reaksiyonu testleri davranış sonuçları.   | 26           |
| 4.3. Prefrontal korteksin alt bölgelerinin kortikal kalınlık sonuçları.  | 28           |
| 4.4. Prefrontal korteks alt bölgelerinde Iba-1 ile işaretlenmiş mikroglia sayıları.                                    | 29           |
| 4.5. Prefrontal kortekste mikrogliaların Iba-1 ile işaretlenmesi.  | 30           |
| 4.6. Prefrontal korteksin alt bölgelerinde mikroglia morfolojisi.  | 32           |
| 4.7. Prefrontal korteks alt bölgelerinde NF-κB çekirdek translokasyonu.  | 33           |
| 4.8. Prefrontal kortekste NF-κB çekirdek işaretlemesi.   | 34           |

**TABLolar**

| <b>Tablo</b> |  | <b>Sayfa</b> |
|--------------|--|--------------|
| <b>2.1.</b>  | Dikkat eksikliği hiperaktivite bozukluğunda inflamasyonu değerlendiren insan çalışmaları.  | 9            |
| <b>2.2.</b>  | Dikkat eksikliği hiperaktivite bozukluğunda inflamasyonu değerlendiren hayvan alışmaları. | 11           |



## 1. GİRİŞ

Dikkat eksikliği/hiperaktivite bozukluğu (DEHB) dikkatsizlik, hiperaktivite ve dürtüsellik belirtileri ile karakterize edilen, çocukluk çağında %5-10 gibi oldukça yüksek bir oranda görülen nörogelişimsel bir bozukluktur (1). Erkeklerde kızlardan iki kat daha sık görülmekle birlikte, belirtilerin görünümü ve şiddeti biyolojik cinsiyete bağlı olarak farklılıklar gösterebilmektedir (2). Erkeklerde DEHB daha çok hiperaktivite ve dışsallaştırma belirtileriyle, kadınlarda ise dikkat eksikliği ve içselleştirme belirtileriyle izlenmektedir (2). Uzunlamasına yapılan gözlem çalışmalarında DEHB'nin %65-85 oranında ergenlikte, %30-50 oranında erişkinlikte de devam ettiği gösterilmiştir (3). Tedavi edilmemiş hem kadın hem de erkek bireyler iş, aile ve sosyal yaşamında işlevselliğini önemli düzeyde etkileyebilecek kayıplar yaşayabilmektedir. Bu durum, bireylerin yaşam kalitesini artırmak için cinsiyet farklılıklarını da göz önünde bulunduran tanı ve tedavi yaklaşımlarının önemini vurgulamaktadır.

Son yıllarda DEHB'nin nörobiyolojik temeliyle ilişkili olarak kortikal kalınlıkta azalma ve kortikal maturasyonda gecikme gibi anormallikler saptanmış olmasına karşın halen genetik ve çevresel etkenler ile nöronal süreçler arasındaki bağlantılar ve bunların fenotipe yansımaları yeterince bilinmemektedir. Araştırmalar, dikkat eksikliği, hiperaktivite ve dürtüsellik gibi DEHB belirtilerinin dorsolateral, anterior singulat, ventromedial ve orbitofrontal korteks gibi prefrontal korteksin (PFK) alt bölgeleriyle bağlantılı devrelerle ilişkili olduğunu göstermektedir (4). Görüntüleme çalışmalarında, toplam beyin ve serebellum hacminde anlamlı azalmalar, frontostriatal alanlarda, temporoparietal loblarda, bazal gangliyalarda, korpus kallozumda, serebellumda, amigdalada, hipokampusta ve talamusta anormallikler, kortikal kalınlık ve yapısal bağlantısallıkta değişiklikler, gri ve beyaz cevher hacimlerinde azalmalar, anormal kortikal gelişim ve normal kortikal maturasyonda gecikme bildirilmiştir (5-7). Bunun yanı sıra fonksiyonel olarak yürütücü işlevlerle, bilişle, duygu ve sensorimotor işlevlerle ilişkili ağların aktivitesinde azalma saptanmıştır (8). Bu bozukluğun etkin tedavisinin yapılabilmesi ve koruyucu müdahale seçeneklerinin geliştirilebilmesi için kortikal maturasyonda gecikmede yer alan nöronal mekanizmaların aydınlatılmasına ihtiyaç vardır.

Dikkat eksikliği/hiperaktivite bozukluğuna yol açan moleküler mekanizmalar henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Kalıtlılabirliği yüksek bir bozukluk olan DEHB'nin patofizyolojisinde çevresel etkenlerin rolünü araştıran geniş ölçekli epidemiyolojik çalışmalarda prematürite, düşük doğum ağırlığı ve annenin gebelikte sigara içmesi, DEHB açısından önemli risk faktörleri olarak tanımlanmıştır (9). Prenatal dönemde annenin sigara içmesinin yanı sıra maternal enfeksiyon, maternal obezite ve kötü beslenme ve annenin evre kirliliğine maruziyeti gibi daha birçok çevresel etkeninin erken dönemde artmış in-utero inflamasyon aracılığıyla nöroinflamasyona yol açabildiği ve DEHB patofizyolojisinde rolü olabildiği ileri sürülmüştür (10). Ancak nöroinflamasyona yönelik mevcut kanıtlar dolaylı olup DEHB'li bireylerde ve belirli DEHB hayvan modellerinde saptanmış düşük dereceli periferik inflamasyon ile sınırlıdır (11). Bugüne kadar DEHB'ye yönelik olarak ne postmortem insan ne de hayvan beyinlerinde doğrudan PFK'nin alt bölgelelerine özgü inflamatuvar değişiklikleri gösteren bir çalışma bulunmamaktadır.

Erken dönemde çevresel etkenlere maruz kalmanın, epigenetik sinyal yolakları aracılığıyla gen ekspresyonu ve dolayısıyla nöronal gelişim üzerine uzun süreli bir etkiye sahip olabileceği düşünölmektedir. Prenatal nikotin maruziyeti, farelerde DEHB benzeri davranışlarla birlikte frontal korteks ve striatumda dopamin dönüşümünün azalması ve singulat kortekste hacim küçülmesi ile ilişkilendirilmiştir (12, 13). Ayrıca, farelerin CA1 piramidal nöronlarında dendritik diken yoğunluğunu azaltarak olgunlaşmamış dikenleri artırırken, olgun dikenleri azaltır. Bu değişiklikler, DEHB belirtilerine benzer şekilde kortikal maturasyonda gecikmeye işaret etmektedir. Buna karşılık, tek doz metilfenidat, genel diken yoğunluğunu etkilemeden sinaptik diken olgunlaşmasını desteklemektedir (14). Nörogelişim sırasında, özellikle mikrogliya aracılığıyla yürütölen nöroinflamatuvar sinyalizasyon, programlanmış nöronal hücre ölümlü, sinaptik budanma ve beyin gelişimi gibi süreçler için kritik öneme sahiptir (15). Bu sinyalizasyonun bozulması DEHB gibi nörogelişimsel bozukluklara yol açabilir (16). Ancak, prenatal nikotin maruziyetinin fenotipik sonuçlar üzerindeki etkilerinde inflamatuvar değişiklikler ve mikrogliya aktivitesinin rolü hala belirsizliğini korumaktadır.

Bu alışmada, DEHB hayvan modeli olarak perinatal nikotin maruziyeti (PNM) kullanılarak jüvenil dönemde PFK'nin farklı alt bölgelelerindeki

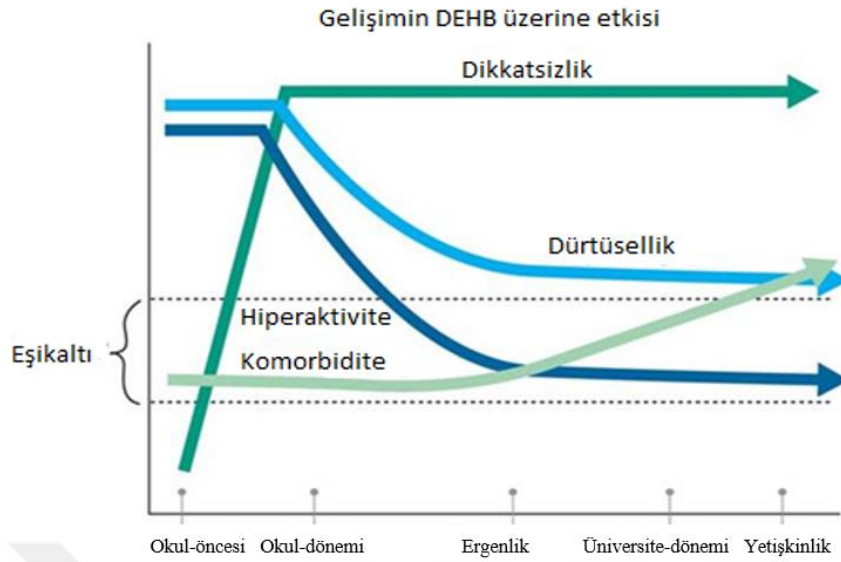
nöroinflamatuvar sinyalizasyon değişikliklerinin araştırılması amaçlanmıştır. Kortikal kalınlık ve nöroinflamatuvar sinyalizasyonda alt bölgeye özgü değişiklikler olup olmadığı araştırılmıştır. Ayrıca bu değişikliklerin hiperaktivite, dürtüsellik ve dikkat bozukluğu gibi DEHB benzeri davranışlarla ilişkisi ve cinsiyet farklılıkları incelenmiştir. Bu çalışma sonucunda ulaşılabilecek bilgiler DEHB'nin nörobiyolojik mekanizmalarının aydınlatılmasına katkı sağlayarak bozukluğun patofizyolojik mekanizmalarına özgül tedavi stratejilerinin geliştirilmesi çalışmalarına öncü olabilir.



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Dikkat Eksikliği/Hiperaktivite Bozukluğunun Klinik Özellikleri

Çocukluğun erken dönemlerinde başlayan DEHB belirtileri yaşam boyu sürer (Şekil 2.1.) (17). Epidemiyolojik veriler, DEHB'nin dikkat eksikliği belirtilerinin zamanla nispeten sabit kaldığını göstermiştir (18). Buna karşılık, hiperaktivite ve dürtüsellik belirtileri gelişimsel olarak azalma eğilimindedir. Klinik özellikleri heterojen olduğu için dikkat eksikliği baskın görünüm, hiperaktivite-dürtüsellik baskın görünüm ve hiperaktivite ve dürtüsellik birlikte görüldüğü bileşik görünüm olmak üzere üç tipi tanımlanmıştır (19). Yapılan araştırmalarda her iki cinsiyette de dikkat eksikliği baskın görünümün en yaygın olduğu, bunu sırasıyla hiperaktivite-dürtüsellik baskın görünümü ile bileşik görünümünün izlediği saptanmıştır (1). Tepki ketleme, planlama, organizasyon, soyutlama, işleyen bellek, dikkati bir yönden başka bir yöne çevirebilme, sözel akıcılık, duyguların düzenlenmesi, daha önceden kazanılmış bilgi ve becerilerin uygun ortamda amaca yönelik kullanılması yetilerini kapsayan yürütücü işlevlerde bozulmalar gözlenebilir. Okul öncesi dönemde DEHB'li çocuklar kreş veya anasınıfı ortamında diğer çocukların oyunlarını bozacak şekilde sürekli hareket halindedir, öfke nöbetleri ve karşı gelme davranışları ön plandadır. Okul döneminde DEHB belirtileri hem akademik başarıyı hem de sosyal uyumu büyük ölçüde etkilemekte, ikincil olarak bazı eş tanılar ortaya çıkmaktadır. Çocukluk döneminde ön planda olan hiperaktivite azalarak, ergenlikte yerini iç huzursuzluğuna bırakabilir. Bu gençlerde korumasız/erken cinsel ilişkiye girme, yasadışı davranışlarda bulunma, sigara, alkol ve madde kullanma, okulu bırakma ve meslek edinememe daha sık görülür (19). Eşlik eden psikiyatrik bozukluklar çok yaygın olup yaşla birlikte artış göstermektedir. Klinik çalışmalarda en sık davranım bozukluklarının, duygu durum bozukluklarının ve anksiyete bozukluklarının DEHB ile birlikte görüldüğü saptanmıştır. Bu çocuklarda anksiyete bozukluklarının, okul öncesi dönemden yetişkinliğe kadar %4'ten %47'ye kadar hızla artış göstererek DEHB'ye yüksek oranda eşlik ettiği belirlenmiştir (20).

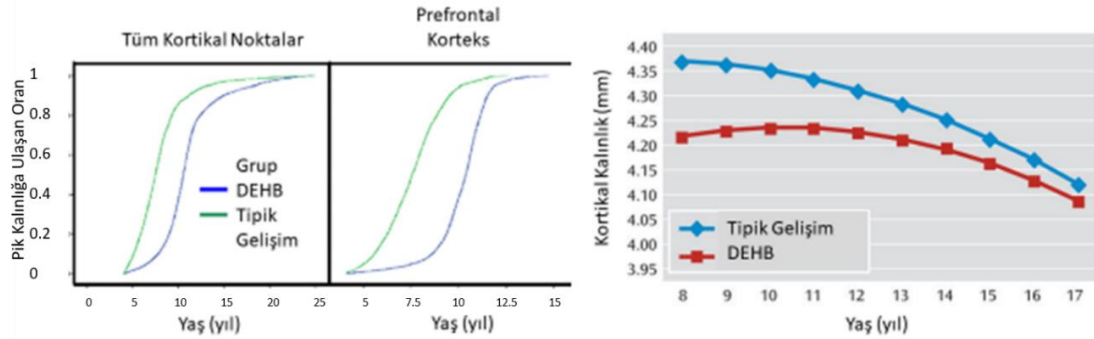


**Şekil 2.1.** Kronolojik yaşın gelişimsel olarak DEHB belirtilerinin görünümü ve şiddeti üzerine etkisi (“Stahl’s Essential Psychopharmacology: Neuroscientific Basis and Practical Applications” kitabının 2021 baskısından alınmıştır.).

## 2.2. Dikkat Eksikliği/Hiperaktivite Bozukluğunda Anormal Kortikal Kalınlık Bulguları

Çok sayıda çalışma, DEHB’li bireylerde birden fazla yapısal anormalliğin yaygın olarak bulunduğunu savunurken, bunlarla ilgili tam bir görüş birliği henüz sağlanamamıştır. Manyetik rezonans görüntüleme (MRG), gri ve beyaz madde arasındaki kontrastı göstererek, nöropsikiyatrik bozukluklarda beyin yapısının değerlendirilmesinde kritik bir rol oynar. Kontrasta dayalı olarak, çeşitli beyin bölgeleri için kortikal kalınlık gibi biyobelirteçler belirlenir (21). Normal gelişim sırasında yaşamın erken dönemlerinde zirveye ulaştıktan sonra kademeli olarak azalmaya başlayan korteks kalınlığı ile ilgili olarak DEHB’li bireylere ait sonuçlar tutarsızdır. Tipik gelişim gösteren çocuklarla benzer kortikal kalınlık verileri ile, DEHB’li çocuklarda kortikal kalınlıkta genel ya da PFK, parietal ve temporal bölgeler gibi belirli beyin bölgelerinde azalmalar olduğu ve bu değişikliklerin yaşla birlikte ortadan kalktığı ya da yetişkin DEHB’li bireylerde de benzer şekilde azalmaların olduğu yönünde bulgular mevcuttur (22, 23). Buna karşın, DEHB belirtileri ile bağlantılı olabilecek precuneus ve supramarginal girus gibi bazı önemli beyin bölgelerinde artmış kortikal kalınlık saptanmıştır (21). Bu farklı sonuçlar, DEHB’deki

azalmış/gecikmiş kortikal budanma ve maturasyon nedeniyle, normal işleyişte görülen yaşa bağlı kortikal kalınlık azalmalarının bölgesel olarak azalabileceğini ya da yavaşlayabileceğini düşündürmektedir (Şekil 2.2.) (6, 7).

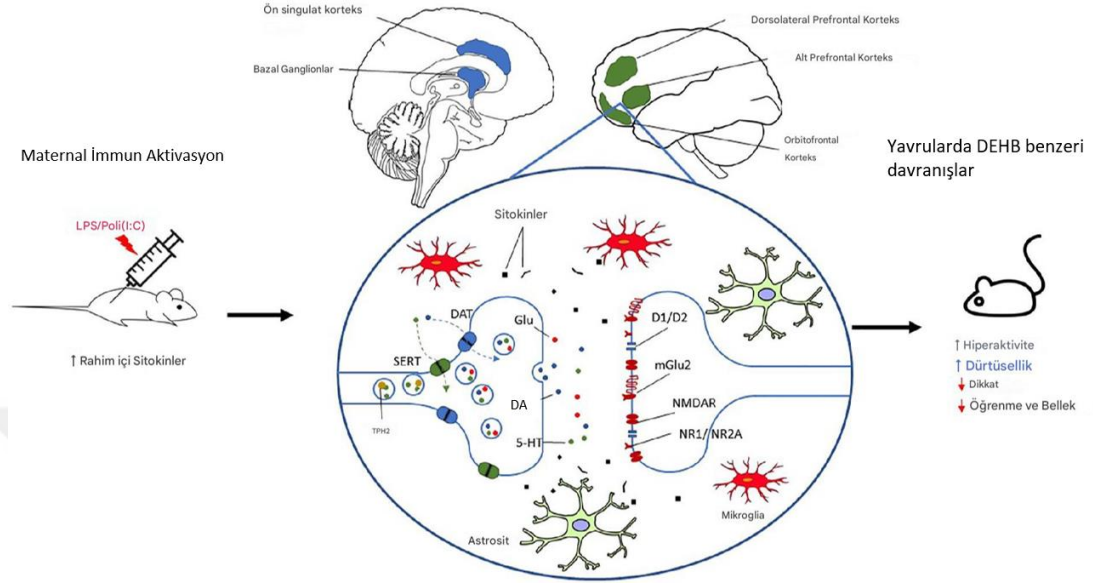


**Şekil 2.2.** DEHB’de kronolojik yaşa göre kortikal maturasyonda gecikme ve kortikal incelleme (Shaw ve arkadaşlarının 2007 ve 2011 yıllarında yayınlanmış makalelerinden alınmıştır.).

### 2.3. Dikkat Eksikliği/Hiperaktivite Bozukluğu Etiyolojisinin Nöroinflamasyonla İlişkisi

Karmaşık etiyolojisinde hem genetik hem de çevresel etkenlerin rol oynadığı düşünülmektedir. Güçlü kanıtlar, DEHB’nin yüksek derecede kalıtılabilir olduğunu (%70-80) göstermektedir (19). Bununla birlikte, nörogelişimin erken evrelerinde çevresel risk faktörlerine maruz kalma, DEHB oluşumunda %10-40’lık bölümü açıklasa da nedensellikleri halen araştırılmaktadır (24). Gelişimsel psikopatoloji alanında, gen-çevre etkileşimi giderek daha fazla kabul görmekte ve DEHB’de de bu etkileşimler incelenmektedir. Biyolojik açıdan bakıldığında, gen ve çevre her zaman birlikte etki eder. İlk bulgular, genetik olarak yatkın bireylerin belirli çevresel risk faktörlerine maruz kaldıklarında DEHB geliştirme olasılıklarının daha yüksek olduğunu göstermektedir. Ancak genetik ve çevresel faktörlerin etkileşiminin DEHB üzerindeki etkilerinin kesin mekanizması halen net değildir. Maternal enfeksiyonlar, maternal obezite veya yetersiz beslenme, gebelikte annenin sigara içmesi veya çevresel toksinlere maruz kalması gibi bazı çevresel faktörler öne çıkmaktadır. Bunların erken dönemlerde intrauterin ortamda inflamasyona neden olduğu düşünülmekte, bu inflamasyonun maternal immun aktivasyon aracılığıyla fetüste

nöroinflamasyona yol açarak DEHB'nin patofizyolojisinde rol oynayabileceği öne sürülmektedir (Şekil 2.3.) (10).



**Şekil 2.3.** DEHB’de maternal immun aktivasyon aracılı nöroinflamasyon hipotezi (Dunn ve arkadaşlarının 2019 yılında yayınlanmış makalesinden alınmıştır.).

Etiyolojiye yönelik yapılan bazı insan ve hayvan çalışmalarında, DEHB patofizyolojisinde nöroinflamasyonun yer aldığına dair dolaylı kanıtlar elde edilmiştir (10). Postmortem beyin dokusu incelemelerinde, çocukluk çağı DEHB olgularında görülen subkortikal volumetrik azalmalar ile apoptoz, oksidatif stres ve otofaji olmak üzere bu üç yolağın gen ekspresyon profillerinin anlamlı derecede korele olduğu gösterilmiştir (25). İnsan çalışmalarında, DEHB’li bireylerin hem periferik dolaşımında hem de beyin omurilik sıvısı örneklerinde IL-2, IL-5, IFN gama, IL-10 ve TNF beta gibi sitokinlerin düzeylerinin yüksek olduğu bulunmuştur (Tablo 2.1.) (26-32). Ancak bu çalışmaların çoğunda inflamatuvar sitokinlerin düzeyleri periferik dolaşımda ölçülmüş, çalışmalarda değerlendirilen sitokinlerin çeşitlilik gösterdiği ve düzeylerindeki değişikliklerin tutarlı olmadığı bildirilmiştir (11). Bu çalışmaların sonuçları, sitokinlerin düzeyleri karmaşık olsa da DEHB olan hastalarda düşük düzeyde bir periferik inflamasyonun olduğunu düşündürmektedir. Merkezi sinir sistemine kandan giren immün hücrelerin (kan-kökenli nöroinflamasyon) ve/veya

merkezi sinir sisteminde yerleşik hücrelerin (MSS-kökenli nöroinflamasyon) nöroinflamasyona katkısı yoğun bir biçimde araştırılmakla birlikte, günümüzde giderek artan kanıtlar migren, otizm spektrum bozukluğu, depresyon ve anksiyete bozuklukları gibi nöropsikiyatrik hastalıkların patogenezinde MSS-kökenli inflamasyonun rolünü gündeme getirmektedir (33-36). Yüksek seviyelerde inflamasyon sinyali artışının sinaptik plastisite, nörogenez ve çeşitli bilişsel süreçleri etkileyebildiği bilinmektedir (37). Bu artışın, dopaminerjik transmisyon da dahil olmak üzere çeşitli nörotransmitter sistemlerini düzenleyebildiği ileri sürülmektedir (38). Özetle, inflamatuvar yanıtın bilişsel işlevlerde bozulma gibi DEHB'ye benzer belirtilere yol açması, DEHB'nin atopik dermatit ve tip 1 diyabet gibi otoimmün hastalıklarla sık birliktelik göstermesi, DEHB'li bireylerde düşük dereceli periferik inflamasyon ile birlikte, antibazal gangliyon antikorları ve dopamin taşıyıcısına karşı antikorlar gibi otoantikorlarda artış olması ve DEHB'nin IL-1RA geni ile birlikte inflamasyon, hücre adezyonu ve gen ekspresyonunun düzenlenmesinde rol oynayan genlerle ilişkili bulunmasından yola çıkılarak, teorik olarak nöroinflamasyonun DEHB patofizyolojisinde rol oynayabileceği hipotezi ortaya atılmıştır (10, 39).

**Tablo 2.1.** Dikkat eksikliği hiperaktivite bozukluğunda inflamasyonu değerlendiren insan çalışmaları.

| Referans, Ülke                    | Örneklem                      | Değerlendirme  | Sonuç   |
|-----------------------------------|-------------------------------|--|---|
| Oades ve ark. 2010a, Almanya      | 35 DEHB, 21 Kontrol           | ELISA ile IFN gama, IL-1 beta, IL-2, IL-3, IL-6, IL-10, IL-13, IL-16 ve TNF alfa | DEHB grubunda IL-2, IL-6, IFN gama, IL-10, IL-13 ve IL-16 daha yüksek iken, IL-1 beta daha düşük olup istatistiksel olarak anlamlı değildir.  |
| Oades ve ark. 2010b, Almanya      | 35 DEHB, 21 Kontrol           | ELISA ile IL-1 beta, IL-2, IL-6, IL-10, IL-13, IL-16, IFN gama ve TNF alfa       | Artmış IL-16 ve IL-13, sırasıyla hiperaktivite ve dikkatsizlik ile ilişkili iken, azalmış IL-2, karşı gelme skorları ile ilişkilidir.   |
| Oades ve ark. 2011, Almanya       | 35 DEHB, 21 Kontrol           | ELISA ile IL-1 beta, IL-2, IL-6, IL-10, IL-13, IL-16, IFN gama ve TNF alfa       | Artmış IFN gama düşük doğum ağırlığı ve prematüriteyle, artmış IL-6 babanın sigara içmesiyle, azalmış TNF alfa ise obstetrik problemlerle ilişkilidir.  |
| O'Shea ve ark. 2014, ABD          | 600 prematüre çocuk           | MDS ile inflamasyonla ilişkili 25 protein  | Postnatal ilk iki hafta sırasında periferik dolaşımında tekrarlayan veya kalıcı artmış IL-6, IL-8 ve TNF-RI seviyeleri 2 yaşında dikkat problemleriyle ilişkilidir.   |
| Donfrancesco ve ark. 2016, İtalya | 58 DEHB, 36 Kontrol           | ELISA ile IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, TNF alfa ve IFN gama serum seviyeleri        | DEHB çocuklarda serum IL-6 ve IL-10 seviyeleri daha yüksektir.  |
| Hariri ve ark. 2012, İran         | 103 DEHB çocuk                | ELISA ile IL-6 ve İTM ile CRP seviyeleri   | Omega-3 yağ asidi tedavisini takiben belirtilerde iyileşme ile birlikte serum CRP ve IL-6 seviyelerinde anlamlı azalma vardır.  |
| Mittleman ve ark. 1997, ABD       | 42 DEHB, 22 Şizofreni, 24 OKB | ELISA ile IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IFN gama, TNF alfa, TNF beta, TNF beta/LT     | BOS örneklerinde DEHB çocukların %90'ında saptanabilir IL-2, %60'ında saptanabilir IFN gama, %70'inde saptanabilir TNF beta, %62'sinde saptanabilir IL-5 ve %7'sinde saptanabilir IL-10 seviyeleri mevcuttur. |

Nöroinflamasyon DEHB ilişkisi hayvan çalışmalarında spontan hipertansif sıçan modeli üzerinde araştırılmıştır (40, 41). Spontan hipertansif sıçan modelinde kontrol grubuna kıyasla serum örneklerinde IL-1 beta, MCP-1, RANTES ve IP-10 gibi inflamatuvar sitokin düzeyleri 5 haftalıkken artmış olarak, 10 haftalıkken ise benzer bulunurken, prefrontal korteks, korteksin kalan diğer bölgeleri, striatum ve hipokampus beyin bölgelerinde TNF alfa, IL-1 beta ve IL-10 gibi inflamatuvar sitokin

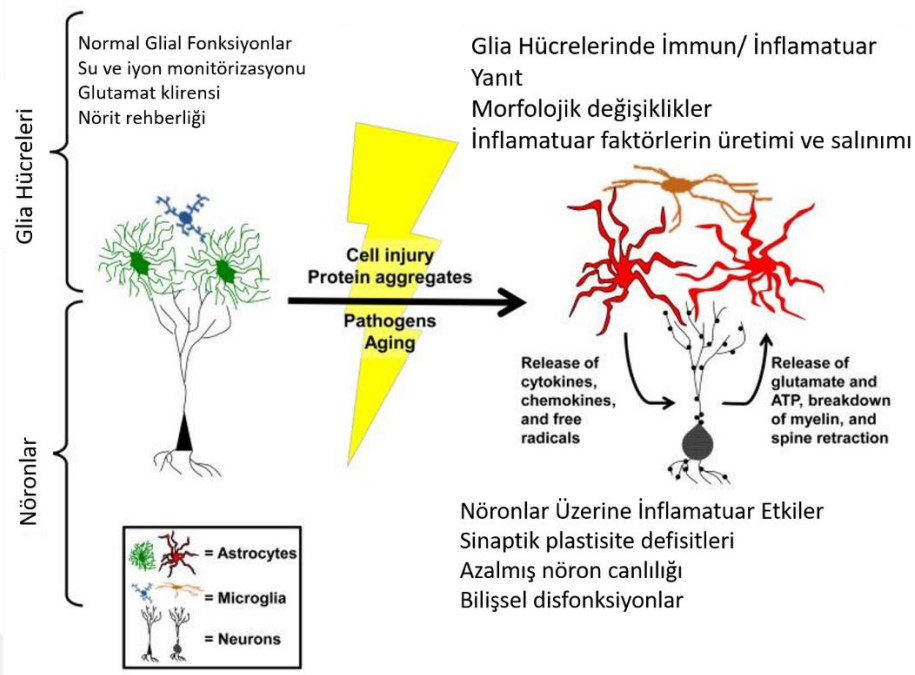
düzeyleri 90 günlükken azalmış olarak bulunmuştur (Tablo 2.2.) (40, 41). Hipertansiyon, DEHB ile ilişkili olmayıp bu hayvan modelinde karıştırıcı bir faktör olarak yer almaktadır. Spontan hipertansif sıçan modelindeki davranışsal defisitler, yüksek kan basıncının neden olduğu işlevsel bozulmayı ya da beyin hasarını yansıtır olabilir (42). Bu yüzden hipertansiyonun davranışı etkileyebildiği göz ardı edilmemelidir (43). Görüldüğü üzere bu alanda kısıtlı sayıda çalışma yapılmış olup henüz inflamasyonun nasıl bir mekanizma üzerinden DEHB tablosunu ortaya çıkarabildiği ile ilgili net bilgiler elde edilememiştir. Yazında daha önce juvenil dönemde DEHB'nin üç temel davranışsal belirti boyutuyla kortikal kalınlık (maturasyon) ve nöroinflamasyonu ilişkilendiren ve PFK'nin alt bölgelerine özgü değişiklikleri ve cinsiyet farklılıklarını inceleyen bir çalışma bulunmamaktadır.

**Tablo 2.2.** Dikkat eksikliği hiperaktivite bozukluğunda inflamasyonu değerlendiren hayvan çalışmaları.

| Referans, Ülke                  | Hayvan Modeli   | Sonuç ve Kısıtlılıklar  |
|---------------------------------|---|---|
| Kozłowska ve ark. 2019, Polonya | 5 ve 10 haftalık erkek Spontan Hipertansif Sıçanlar (SHR) (DEHB modeli) (n=12) ve Wistar Kyoto Sıçanlar (WKR) (Kontrol) (n=12)  | Serum IL-1 beta düzeyleri 5 haftalık SHR'lerde, WKR'lerden anlamlı olarak daha yüksek iken, 10 haftalık SHR'ler ve WKR'lerde benzer olup anlamlı olarak 5. haftadaki değerlerden düşüktür. Serum IL-6 düzeyleri 5 haftalık SHR'ler ve WKR'lerde benzer olup sadece 10 haftalık WKR'lerde anlamlı olarak azalmıştır. Serum MCP-1, RANTES ve IP-10 değerleri, 5 haftalık SHR'lerde WKR'lerden anlamlı olarak daha yüksek iken, 10 haftalık SHR'ler ve WKR'lerde benzerdir. Sağ ve sol olmak üzere toplam medial prefrontal kortikal (mPFC) hacimler (singulat, prelimbik ve infralimbik korteks dahil olmak üzere) 5 haftalık SHR'lerde WKR'lerden anlamlı olarak daha düşük iken, 10 haftalık SHR'lerde WKR'lerden anlamlı olarak daha yüksektir. Dopaminerjik markerlar (mPFC'de D2 reseptörü içeren nöron ve tirozin hidroksilaz içeren sinir lifi yoğunluğu) 5 haftalık SHR'lerde WKR'lerden anlamlı olarak daha yüksek iken, 10 haftalık SHR'ler ve WKR'lerde benzerdir. 10 haftalık SHR'lerde hipertansiyon gelişmiş olup görülen nörolojik ve immünolojik anormallikler bununla ilişkili olabilir. |
| Leffa ve ark. 2017, Brazilya    | 90 günlük erkek SHR'ler (n=7) ve WKR'ler (n=6)  | Prefrontal korteks, korteks (kalan diğer bölgeleri), striatum ve hipokampusta TNF alfa, IL-1 beta ve IL-10 düzeyleri SHR'lerde WKR'lerden daha düşüktür. Bu çalışmada 90 günlük hipertansif SHR'ler kullanılmıştır.   |
| Chan ve ark. 2016, Avustralya   | 1 günlük, 20 günlük ve 13 haftalık değerlendirilen, erkek Balb/c farelerden oluşan, gestasyon ve laktasyon sırasında maternal sigara dumanına maruz kalan grup ve kontrol grubu (Model prenatal nikotin maruziyeti ile benzerlik göstermektedir.) | Beyin IL-1R mRNA ekspresyonu, maternal sigara dumanına maruz kalan grupta 1 günlük, 20 günlük ve 13 haftalık anlamlı olarak kontrol grubundan daha yüksek iken, IL-1 beta mRNA ekspresyonu her iki grupta her yaşta benzerdir. IL-6 mRNA maternal sigara dumanına maruz kalan grupta sadece 13 haftalık artmıştır. TNF alfa mRNA ekspresyonu, maternal sigara dumanına maruz kalan grupta 1 günlük kontrol grubundan daha düşük iken, 20 günlük ve 13 haftalık benzerdir. TLR-4 mRNA ekspresyonu, maternal sigara dumanına maruz kalan grupta, kontrol grubuna göre 1 günlük anlamlı olarak daha düşük, 13 haftalık daha yüksek ve 20 günlük benzerdir. Gestasyon ve laktasyon dönemlerinde maternal sigara dumanına maruz kalmanın erkek yavru fareler üzerine etkileri hiçbir zaman davranış deneyleri ile değerlendirilmemiştir. Dolayısıyla maternal sigara dumanına maruziyetin davranışsal sonuçları bilinmemektedir.   |

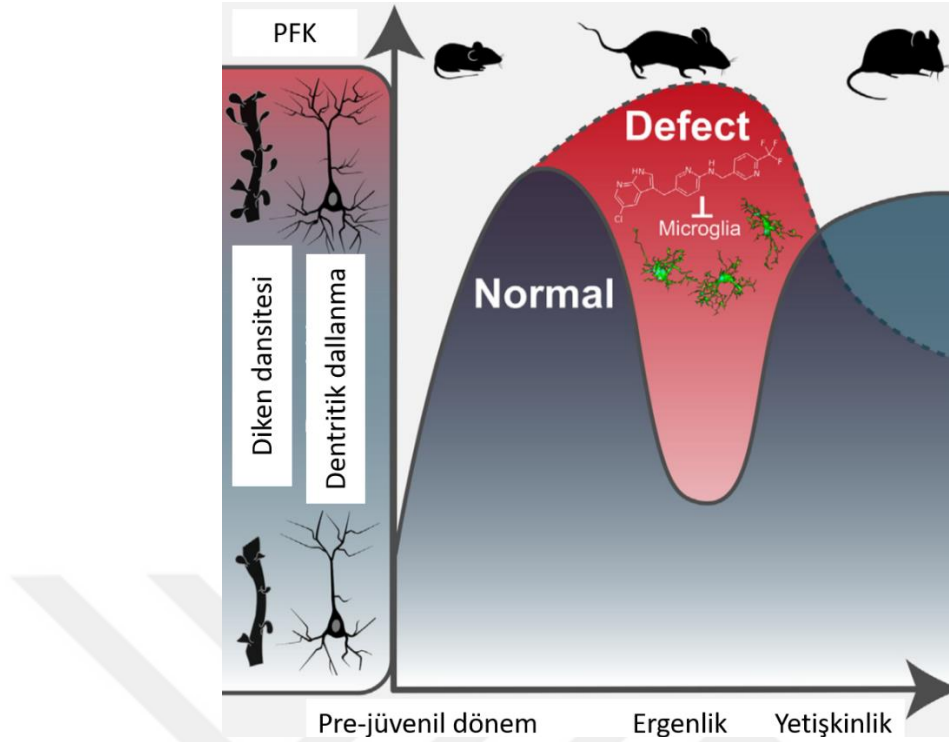
## 2.4. Nöroinflamasyon, Mikroglia Aktivasyonu ve Sinaptik Budanma İlişkisi

Klasik görüşe göre immün sistem kendinden olan (self) ve olmayan (non-self) uyarıları ayırt ederek sadece kendinden olmayanlara yanıt verir. Ancak son yıllarda immün sistemin yalnız dışarıdan gelen patojenlere değil aynı zamanda içten kaynaklanan tehlike ve hasarlara da yanıt verdiği gösterilmiştir. Dolayısıyla immün sistemin yanıt verdiği “hasarla ilişkili moleküler paternler” (DAMP), hem endojen “alarminler” hem de ekzojen “patojen-ilişkili moleküler paternler” (PAMP) olabilir. PAMP ve alarminler, “patern tanıma reseptörleri” (PRR) tarafından tespit edilir (44). Birçok PRR ailesi bilinmektedir. Bunlar arasında Toll-benzeri reseptör (TLR) ailesi, NOD-benzeri reseptör (NLR) ailesi ve AIM2-benzeri reseptör (ALR) ailesi sayılabilir. Bakteriyel lipidler/proteinler, endojen proteinler, nükleik asitler ve metabolitler gibi çok çeşitli ve sayıda molekül DAMP olarak görev alır. Tehdit durumunda alarminler hücre dışına salınır ve PRR’ye bağlanarak inflamatuvar yanıtı başlatır (Şekil 2.4.) (45). Pro-inflamatuvar transkripsiyon faktörü NF- $\kappa$ B’yi aktive ederek mikroglia ve diğer hücrelerden aktif hale gelen inflamatuvar sitokinlerin hücre dışına salınmasını tetikler (34). Bu sitokinlerin mikroglia aktivasyonunu arttırdığı, aktive mikroglianın morfolojik değişiklikler gösterdiği ve kendisi ile birlikte nöronun sağ kalımı ile ilgili hayati görevleri olan astrosit gibi diğer hücrelerin de aktivasyonunu etkileyen daha fazla inflamatuvar sitokin ürettiği düşünülmektedir (46).



**Şekil 2.4.** Nöroinflamasyon sürecinde nöron ve glia hücrelerinde gözlenen morfolojik ve işlevsel değişiklikler (Sama ve Norris'in 2013 yılında yayınlanmış makalesinden alınmıştır.).

Merkezi sinir sisteminin tüm hücrelerinin immün yanıtın farklı bileşenlerini ifade ettiği, yaralanma, hastalık veya yaşlanma gibi koşullar altında dinlenme durumundan aktif duruma geçerken morfolojik değişikliklerle birlikte işlevlerinin de değiştiği ve immün yanıtın yalnız patolojik süreçlerde değil, aynı zamanda nörogenez, nöronal göç, sinaptik budanma ve maturasyon gibi fizyolojik beyin işlevlerinde de rol aldığı gösterilmiştir (45, 47). Jüvenil dönemde normal gelişimin bir parçası olarak PFK'da mikroglia aracılı sinaptik budanma ve maturasyon üzerinden üst düzey bir yeniden yapılanma gerçekleştiğine dair veriler giderek artmaktadır (48-50). Bu bulgular klinikle de uyumludur, PFK devre bağlantıları ile ilişkili yürütücü işlevlerin olgunlaşması ergenliğin sonuna kadar devam etmektedir. Bu dönemdeki mikroglia ile ilişkili anormallikler, yetişkinlikteki kötü bilişsel yetiler ve morfolojik değişikliklerle ilişkilendirilmiştir (48, 51). Bununla birlikte, nörogelişim sırasındaki bu ince ayar ve yeniden düzenlemenin altında yatan mekanizmalar hâlâ net olarak bilinmemektedir (Şekil 2.5.) (51).

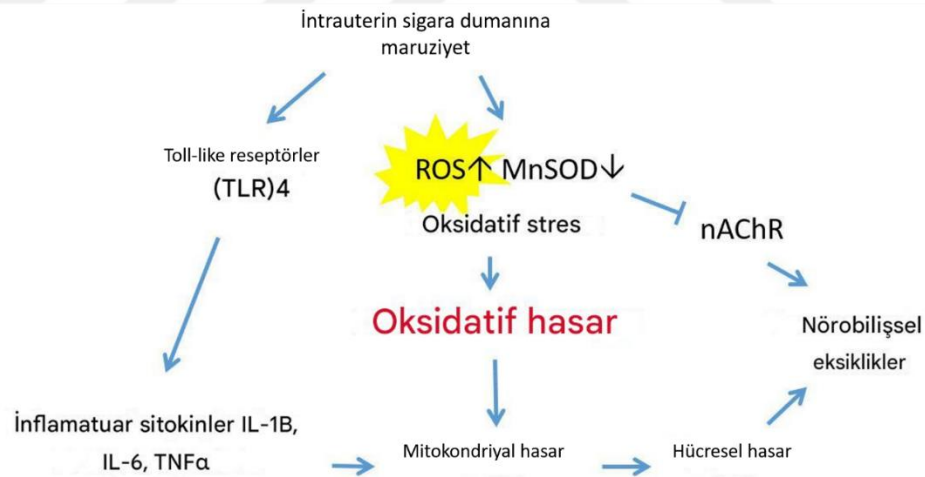


**Şekil 2.5.** Jüvenil dönemde PFK’da mikroglia aracılı maturasyon (Pöpplau ve arkadaşlarının 2024 yılında yayınlanmış makalesinden alınmıştır.).

### 2.5. Dikkat Eksikliği/Hiperaktivite Bozukluğuna Yönelik Perinatal Nikotin Maruziyeti Modeli

Dikkat eksikliği/hiperaktivite bozukluğu olan çocuklarda perinatal dönemlerde gizli ya da açık minimal derecede merkezi sinir sistemi hasarı olduğu belirtilmektedir (52, 53). Bu hasara toksik, enfeksiyöz, metabolik, mekanik ve dolaşım ile ilgili nedenler yol açabilir. Perinatal nikotin maruziyetinin yavrularda nöronal nikotinik asetilkolin reseptörleri üzerinden hücre içi kalsiyum artışı ve kalsiyum bağımlı sinyal kaskadlarının aktivasyonu aracılığıyla nörogenez ve dopaminerjik ve glutamaterjik gibi çeşitli nörotransmitter sistemlerinde bozulmalar ile DEHB benzeri bilişsel ve davranışsal sonuçlara neden olduğu bilinmektedir (54, 55). Perinatal nikotin maruziyeti, bozulmuş öğrenme ve dikkat ile artmış dürtüsellik ve hareketlilik gibi çeşitli davranışsal sonuçlarla ilişkilendirilmiş olmasına rağmen, cinsiyet bağımlı bulgular tutarlı olmaktan uzaktır (56, 57). Bu modelin her iki cinsiyette de bilişsel bozulmalara neden olduğu bulunmuşken, bazı çalışmalarda sadece yavru erkek farelerde dikkat ve çalışma belleğinde önemli defisitler ortaya çıkardığı ve bu davranışsal fenotiplerin DEHB ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (58-60). Perinatal

nikotin maruziyeti sonucu erişkin erkek farelerde hiperaktivite gözlenirken, bazı çalışmalarda lokomotor aktivitenin anlamlı derecede etkilenmediği bildirilmiştir (12, 58, 61-64). Ayrıca bu modelde sadece erkek farelerde anksiyete ve kompulsiyon benzeri davranışlar görüldüğü bulunmuştur (56, 57). Erkeklerde gözlenen bu anormal davranışsal sonuçlar, prefrontal kortekste glutamat reseptörü ile ilişkili genlerin ekspresyonundaki (glutamat metabotropik reseptörleri 1 ve 2 ile GluN1 ve GluN2B için mRNA kodlamasının ekspresyonunun azalması gibi) değişikliklerle ilişkilendirilmiştir. Maternal sigara dumanına maruz kalan yavru erkek farelerin beyinlerinde IL-1R, IL-6 ve TLR-4 mRNA ekspresyonu 13 haftalıkken kontrol grubuna kıyasla artmış olarak bulunmuştur (Tablo 2.2.) (64). Bu hayvan modelinde, DEHB'ye benzer şekilde farelerin beyinlerinde volumetrik azalmalar ve kognitif defisitler görülmekte olup erkek yavruların dişilerden daha fazla etkilendiği bilinmektedir (12). Bu nedenle perinatal dönemde nikotin maruziyeti olan hem dişi hem de erkek farelerin kullanımının nöroinflamasyonun araştırıldığı DEHB çalışmaları için uygun bir model olduğu düşünülmektedir (Şekil 2.6.) (12).



**Şekil 2.6.** Prenatal nikotin maruziyetinde oksidatif stres ve inflamasyon hipotezi (Chan ve arkadaşlarının 2020 yılında yayınlanmış makalesinden alınmıştır.).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu projedeki tüm deney süreçleri Hacettepe Üniversitesi Hayvan Yerel Etik Kurulu tarafından 2020/08-06 numarasıyla onaylanmış, laboratuvar hayvanlarının bakımı ve kullanımıyla ilgili etik standartlara uygun davranılmıştır.

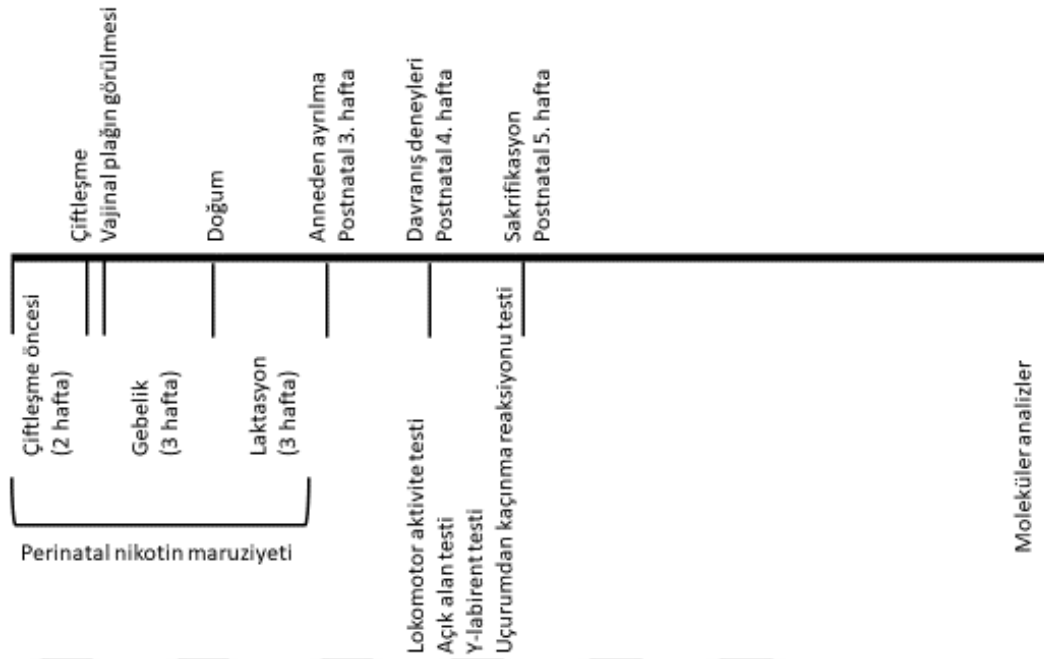
#### 3.1. Perinatal Nikotin Maruziyeti Modeli

Yirmi dört dişi ve 12 erkek C57BL/6 cinsi fare (10-12 haftalık) Hacettepe Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden temin edilmiştir. Bu fareler 12 saat aydınlık/12 saat karanlık döngüsünde tutulmuş ve yiyecek ile suya sınırsız erişim sağlanmıştır.

Dişi fareler rastgele iki gruba ayrılmıştır: Nikotin + sükroz grubu ve yalnızca sükroz grubu. Nikotin + sükroz grubundaki farelere, içme sularında 300 µg/ml nikotin ve %2 sükroz içeren su verilmiştir. Yalnızca sükroz grubundaki farelere ise sadece %2 sükroz içeren içme suyu verilmiştir. Sükroz, nikotinin acı tadını maskeleyerek için tatlandırıcı olarak kullanılmıştır.

Fareler deney süresince sağlıklı bir görünüme sahip olmuş ve tüy bakımlarını düzenli olarak sürdürmüştür. Bu özel içme sularına 2 hafta boyunca maruz bırakılmalarının ardından dişi fareler, herhangi bir maddeye maruz kalmamış (ilaç-naif) erkek farelerle çiftleştirilmiştir. Her kafese iki dişi ve bir erkek fare yerleştirilmiştir. Dişi farelerde vajinal tıkaçlar gözlemlendiğinde (bu durum gebeliğin başladığını gösterir), erkek fareler kafeslerden çıkarılmıştır.

Deneyin her iki grubundaki dişi fareler, gebelik ve emzirme süreci boyunca deneyde belirtilen içme sularına maruz bırakılmaya devam etmiştir (Şekil 3.1.). Nikotin + sükroz grubundaki dişi farelerden 17 yavru (9 erkek, 8 dişi), yalnızca sükroz grubundaki dişi farelerden ise 8 yavru (4 erkek, 4 dişi) dünyaya gelmiştir. Yavrular, sütten kesilene kadar doğdukları gruba ait içme sularını tüketmeye devam etmiştir. Doğumdan sonra 21. günde sütten kesilen yavrular, cinsiyetlerine göre ayrılarak her kafese 4-5 fare yerleştirilmiştir. Tüm deney gruplarının içme suları haftalık olarak değiştirilmiştir.



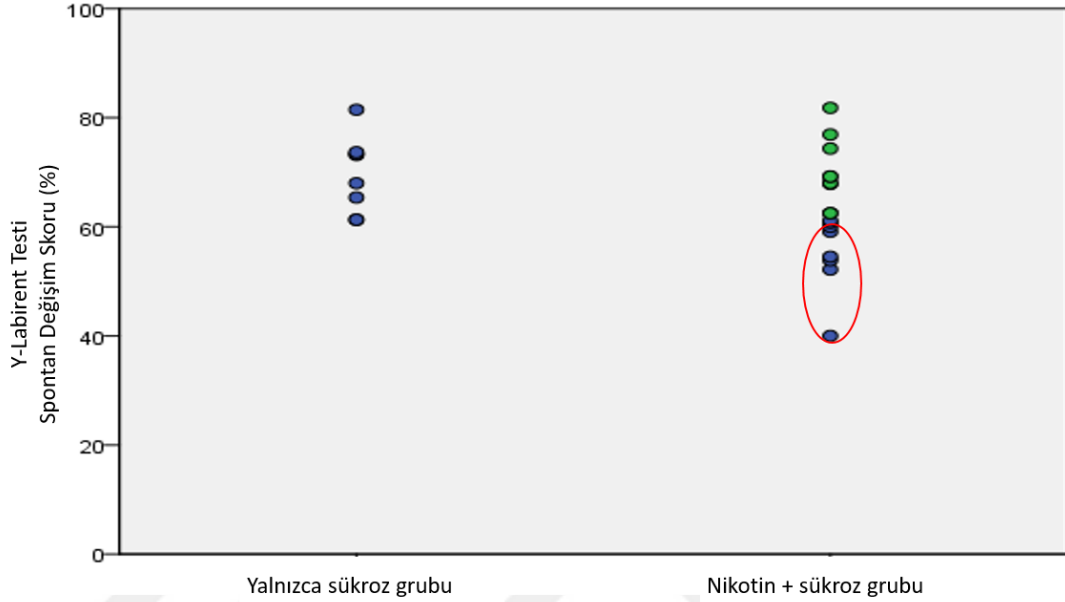
Şekil 3.1. Perinatal nikotin maruziyetini gösteren zaman çizelgesi.

### 3.2. Davranışsal Analizler

Dikkat eksikliği/hiperaktivite bozukluğunun hiperaktivite, dikkat bozukluğu ve dürtüsellik olmak üzere temel belirtilerini değerlendirmek amacıyla doğumdan sonraki 5. haftada bazı davranış testleri uygulanmıştır. Lokomotor aktivite (LMA) ve açık alan testi (AAT) hiperaktiviteyi, Y-labirent testi (YLT) dikkat bozukluğunu ve uçurumdan kaçınma reaksiyonu testi (UKRT) ise dürtüsellik ölçmek için kullanılmıştır. Bu testler, DEHB belirtilerinin öncelikle PFK ve bağlantılı sinir devreleriyle ilişkili olması nedeniyle tercih edilmiştir (4). Ayrıca, açık alan testi ile DEHB'ye sıklıkla eşlik eden anksiyete benzeri davranışlar da değerlendirilmiştir.

Çevresel faktörlerin DEHB ile ilişkili değişikliklerin yaklaşık %10-40'ından sorumlu olduğu tahmin edildiğinden, anne karnında nikotine maruz kalmış tüm yavruların DEHB benzeri davranışlar geliştirmesi beklenmemiştir (24). Bu nedenle, doğumdan sonra 5. haftada Y-labirent testinde dikkat bozukluğunu gösteren düşük spontan değişim skoru sergileyen dişi ve erkek yavrular seçilmiş, daha sonraki analizlerde kontrollerle birlikte bu fareler kullanılmıştır (Şekil 3.2.). Bu seçim, dikkat eksikliği belirtilerinin hiperaktivite ve dürtüsellikten daha uzun süre devam etme eğiliminde olması ve DEHB'nin seyrinde daha kalıcı ve istikrarlı bir model sergilemesi göz önünde bulundurularak yapılmıştır (65). Perinatal dönemde nikotine

maruz kalan toplam 17 yavrudan %47,1'ini temsil eden 8 fare yukarıda belirtilen kritere göre seçilmiştir. Kontrol grubu olarak, yalnızca sükröz içeren içme suyuna maruz kalan dişi farelerden doğan 8 yavru çalışmaya dahil edilmiştir. Her cinsiyet grubu için örneklem sayısı (n) 4 olarak belirlenmiştir.



**Şekil 3.2.** Perinatal dönemde nikotine maruz kalanlar arasından DEHB fare modelini seçmek için kullanılan kriterin gösterimi (Mavi noktalar ile belirtilen hayvanlar çalışmaya dahil edilmiştir.).

### 3.2.1. Lokomotor Aktivite ve Açık Alan Testi

Açık alan testi, hem lokomotor aktiviteyi (LMA) hem de anksiyete benzeri davranışları değerlendirmek amacıyla uygulanmıştır. Her fare, 22.5 x 22.5 x 30 cm boyutlarındaki bir arenaya yerleştirilmiş ve ortamı keşfetmesi için 10 dakika boyunca serbest bırakılmıştır (Şekil 3.3.). Bu süre boyunca farelerin hareketleri bir video kamera ile kaydedilmiştir. Lokomotor aktiviteyi ölçmek için farelerin 10 dakika içinde arenada kat ettikleri toplam mesafe kaydedilmiştir. Anksiyete benzeri davranışları değerlendirmek için ise ilk 5 dakika boyunca arenanın merkezindeki 5 x 5 cm<sup>2</sup>'lik alanda geçirilen toplam süre analiz edilmiştir. Davranış analizleri Ethovision XT-8 yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.



**Şekil 3.3.** Davranış testlerinin düzenekleri (soldan sağa sırasıyla; lokomotor aktivite ve açık alan testi, Y-labirent testi ve uçurumdan kaçınma reaksiyonu testi).

### 3.2.2. Y-Labirent Testi

Dorsal PFK ile ilişkili uzamsal çalışma belleği ve dikkat gibi prefrontal işlevleri değerlendirmek için özel olarak oluşturulmuş bir Y-labirenti kullanılmıştır (59). Labirent, üçgen merkezden Y şeklinde açılan üç koldan (her kol 35 cm uzunluğunda  $\times$  6 cm genişliğinde  $\times$  10 cm yüksekliğinde) oluşmaktadır (Şekil 3.3.). Tüm kolların ve test odasının duvarlarına, her bir kolun fare tarafından farklı olarak tanınmasını kolaylaştırmak için üçgen, daire ve kare gibi görsel ipuçları yerleştirilmiştir. Davranışsal görev, farenin Y-labirentinin merkezine konulmasıyla başlamış ve 3 kolun tümüne serbest erişim sağlanmıştır. Farenin davranışı, video kamera kullanılarak 10 dakikalık bir süre boyunca kaydedilmiştir. Her bir kola girişlerin sayısını ve kollara girişlerinin sırasını hesaplamak için video kayıtları analiz edilmiştir (bu amaçla kollar A, B ve C olarak etiketlenmiştir). Farenin dört bacağının da bir kola girmesi o kola giriş olarak kabul edilmiştir. Spontan değişim, tekrarlanan giriş olmaksızın üç ardışık kola girme (örn. ABC, BCA, CBA) olarak tanımlanmıştır. Spontan değişim skoru, kollar arası değişimler  $\div$  (giriş sayısı - 2)  $\times$  100 formülü ile hesaplanmıştır. Bu skor, uzamsal çalışma belleği ve dikkat performansı olarak değerlendirilmiştir.

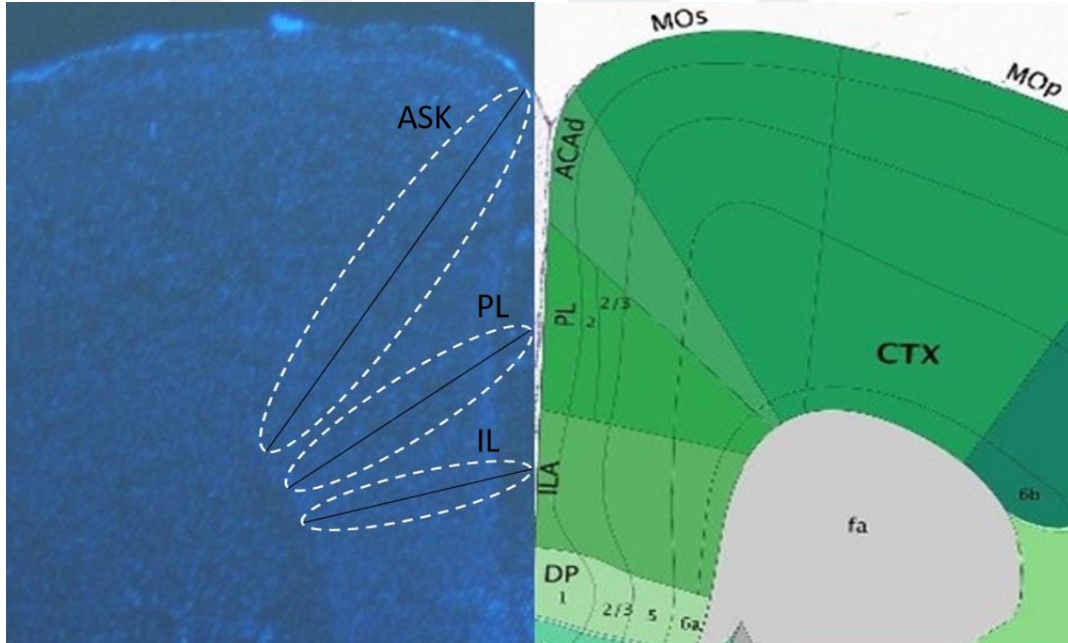
### 3.2.3. Uçurumdan Kaçınma Reaksiyonu Testi

Ventral PFK ile ilişkili dürtüsellliği değerlendirmek için uygulanmıştır (66). Bu amaçla 50 cm yüksekliğindeki yuvarlak bir platform (çapı 20 cm) kullanılmıştır (67). Test, hayvanın platformun merkezine yerleştirilmesiyle başlatılmıştır (Şekil 3.3.).

Farenin davranışı, platformun üstüne yerleştirilecek bir video kamera ile 30 dakikalık bir süre boyunca kaydedilmiştir (59). Platformun 1/3'lük merkezinde geçirilen süre Ethovision XT-8 yazılımı kullanılarak hesaplanmıştır. Bu sürenin daha kısa olması dürtüselliğin göstergesi olarak değerlendirilmiştir.

### 3.3. Kortikal Kalınlığın Değerlendirilmesi

Prefrontal korteksin alt bölgelerinin kortikal kalınlıkları, kortikal maturasyonu değerlendirmek amacıyla ölçülmüştür. Farelerin PFK bölgelerinden elde edilen 20 mikrometre kalınlığındaki kesitler, Nikon Eclipse E600 floresan mikroskobu ile 1x büyütmede görüntülenmiştir. Fare beyin atlasına göre stereotaksik koordinatlarla belirlenen anterior singulat korteks (ASK: 1.10 mm – 0.02 mm), prelimbik korteks (PL: 2.80 mm – 2.46 mm) ve infralimbik korteks (IL: 1.98 mm – 1.54 mm) bölgelerinin kortikal kalınlıkları, elde edilen görüntüler üzerinden ImageJ yazılımı kullanılarak hesaplanmıştır (Şekil 3.4.) (68).



**Şekil 3.4.** Prefrontal korteksin alt bölgelerinin (ASK: Anterior Singulat Korteks, PL: Prelimbik Korteks, IL: İnfralimbik Korteks) kortikal kalınlık ölçümü (Sağdaki fare beyin atlası görüntüsü “Paxinos and Franklin’s the mouse brain in stereotaxic coordinates” kitabının 2019 baskısından alınmıştır.).

### 3.4. İmmünofloresan Boyama

Perinatal nikotin maruziyeti ile DEHB'nin modellendiği fareler ile kontrollerde PFK'nın tüm alt bölgelerinde (ASK, PL, IL) inflamatuvar sinyal yollarındaki farklılıklar immünohistokimyasal işaretlemeler ile araştırılmıştır. Davranış testleri tamamlandıktan sonra, fareler anestezi altında 1X fosfat tamponlu salin (PBS) ve %4 paraformaldehit (PFA) ile perfüze edilmiştir. Beyinler kafatasından çıkarıldıktan sonra %4 PFA çözeltisinde 24 saat süreyle post-fiksasyona bırakılmıştır. Daha sonra beyinler, %30 sükröz çözeltisinde tamamen dibe çökene kadar dehidrate edilmiştir. Ardından, Leica kriyostat kullanılarak 20 µm kalınlığında koronal kesitler seri şekilde alınmıştır. İmmünofloresan boyama için süreklilik gösteren dondurulmuş kesitler arasından fare beyin atlasına göre stereotaksik koordinatlarla belirlenmiş beyin kesitleri seçilmiştir. Çalışmamızda, Iba-1 (mikroglia belirteci) ve çekirdek içindeki pro-inflamatuvar transkripsiyon faktörü NF-κB'nin işaretlenmesine odaklanılmıştır.

Görüntüler Leica konfokal mikroskobu ile kaydedilmiş ve FIJI J yazılımı ile işlenmiştir. Iba-1 ile işaretlenmiş mikroglia hücrelerinin sayısı belirlenmiştir. Mikroglia belirteci Iba-1 için Z-yığınlı (Z-stack) görüntüler de elde edilmiş ve analizler MATLAB tabanlı 3DMorph yazılımı kullanılarak yapılmıştır (69). Mikroglia morfolojisini değerlendirmek için, toplam hücre hacmi (dallanma için dolaylı bir gösterge) ve ramifikasyon (dallanma) indeksi (Z-yığınlı görüntülerde mikroglia uzantılarının otomatik izlenmesiyle elde edilen, karmaşıklığı ve dallanmayı nicel olarak ölçen bir değer) hesaplanmıştır. NF-κB sinyalinin çekirdek bölgesinde gözlenmesi, NF-κB aktivasyonu olarak yorumlanmıştır. NF-κB aktivasyonu, çekirdek bölgesinde NF-κB ile işaretlenmiş toplam hücre sayısının, Hoechst pozitif toplam hücre sayısına oranı ile hesaplanmıştır.

#### 3.4.1. Iba-1'in İmmünofloresan İşaretlenmesi

Beyin kesitleri, 1X PBS ile yıkandıktan sonra, %0,5 Triton X içeren PBS (PBST) ile 15 dakika boyunca geçirgen hale getirilmiştir. Daha sonra kesitler, %10 normal keçi serumu (NGS) içeren PBST ile oda sıcaklığında 1 saat bloke edilmiştir. Blokağın ardından kesitler, Iba-1 antikoru (1:200) ile 4°C'de 2 gün boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası kesitler, 1X PBS ile 5 dakika boyunca 3 kez yıkanmış ve ardından 488/594 anti-tavşan sekonder antikoru (1:200) ile oda sıcaklığında 1 saat

inkübe edilmiştir. Bu işlemi takiben kesitler, 1X PBST ile 15 dakika yıkanmış ve Hoechst boyası eklenerek çekirdekler görselleştirilmiştir.

### 3.4.2. NF-κB'nin İmmünofloresan İşaretlenmesi

Beyin kesitleri, 1X PBS ile yıkandıktan sonra, %10 sitrat tamponu içinde 80°C'de 15 dakika inkübe edilmiştir. Bu inkübasyonun ardından kesitler, 1X PBS ile 5 dakika boyunca 3 kez yıkanmış, ardından 1X PBST ile 15 dakika boyunca geçirgen hale getirilmiştir. Kesitler, %10 NGS içeren PBST ile oda sıcaklığında 1 saat bloke edilmiştir. Blokajın ardından, kesitler NF-κB antikoru (1:200) ile 4°C'de 2 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası kesitler, 1X PBS ile 5 dakika boyunca 3 kez yıkanmış ve ardından 488/594 anti-tavşan sekonder antikoru (1:200) ile oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilmiştir. Bu işlemi takiben kesitler, 1X PBST ile 15 dakika yıkanmış ve Hoechst boyası eklenerek çekirdekler görselleştirilmiştir.

### 3.5. İstatistiksel Analiz

Çalışmamızın istatistiksel analizleri SPSS yazılımı (sürüm 25.0) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Perinatal nikotin maruziyeti ile DEHB'nin modellendiği fareler ile kontrollerin sonuçları, ortalama  $\pm$  standart hata (SEM) şeklinde sunulmuştur. Cinsiyetler ve gruplar arasındaki istatistiksel farklılıkları değerlendirmek için iki yönlü varyans analizi (ANOVA) uygulanmıştır. Gruplar (PNM ve kontrol fareleri) arasında, cinsiyete göre eşleştirilmiş ikili karşılaştırmalar için Mann-Whitney U testi kullanılmış ve sonuçlar medyan  $\pm$  çeyrekler arası aralık (IQR) ile raporlanmıştır. Mikroglia morfolojisi ile ilgili veriler ise Bonferroni düzeltmeli tek yönlü ANOVA testi ile değerlendirilmiştir.  $P < 0,05$  anlamlılık eşiği olarak kabul edilmiştir. Grafikler, Prism yazılımı (sürüm 8.0) kullanılarak oluşturulmuştur.

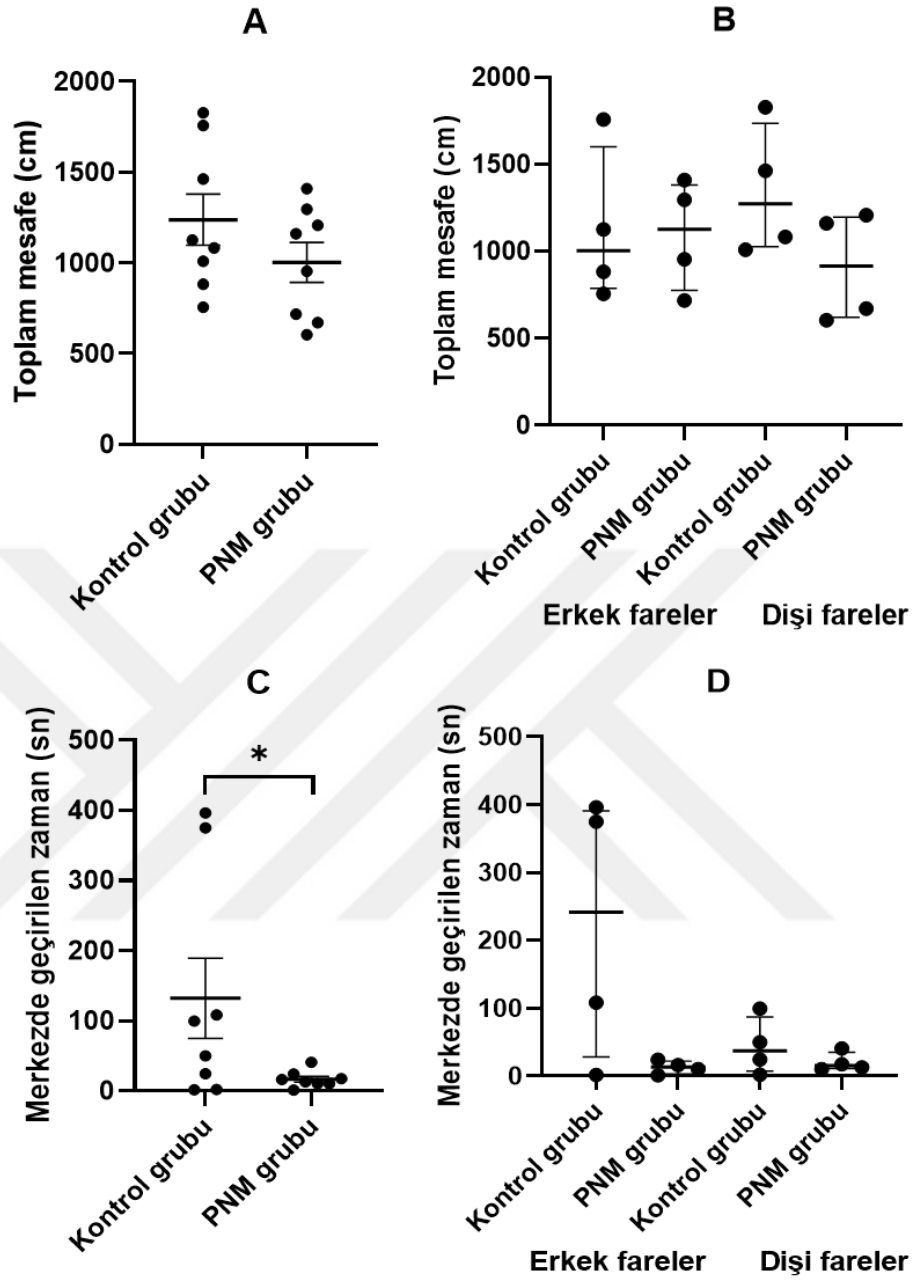
## 4. BULGULAR

### 4.1. Davranışsal Sonuçlar

#### 4.1.1. Lokomotor Aktivite ve Açık Alan Testi

Lokomotor aktivite karşılaştırıldığında, PNM grubu ve kontrol grubu arasında kat ettikleri toplam mesafe benzer bulunmuştur (Şekil 4.1.,  $F(1,15)=1,632$ ,  $p=0,226$ ). Lokomotor aktivite bulguları cinsiyetler arasında da benzerdi ( $F(1,15)=0,007$ ,  $p=0,933$ ). Bu veriler, ergenlik döneminde cinsiyetten bağımsız olarak PNM farelerinde kontrollere benzer LMA gözlemlendiğine dikkat çekmektedir.





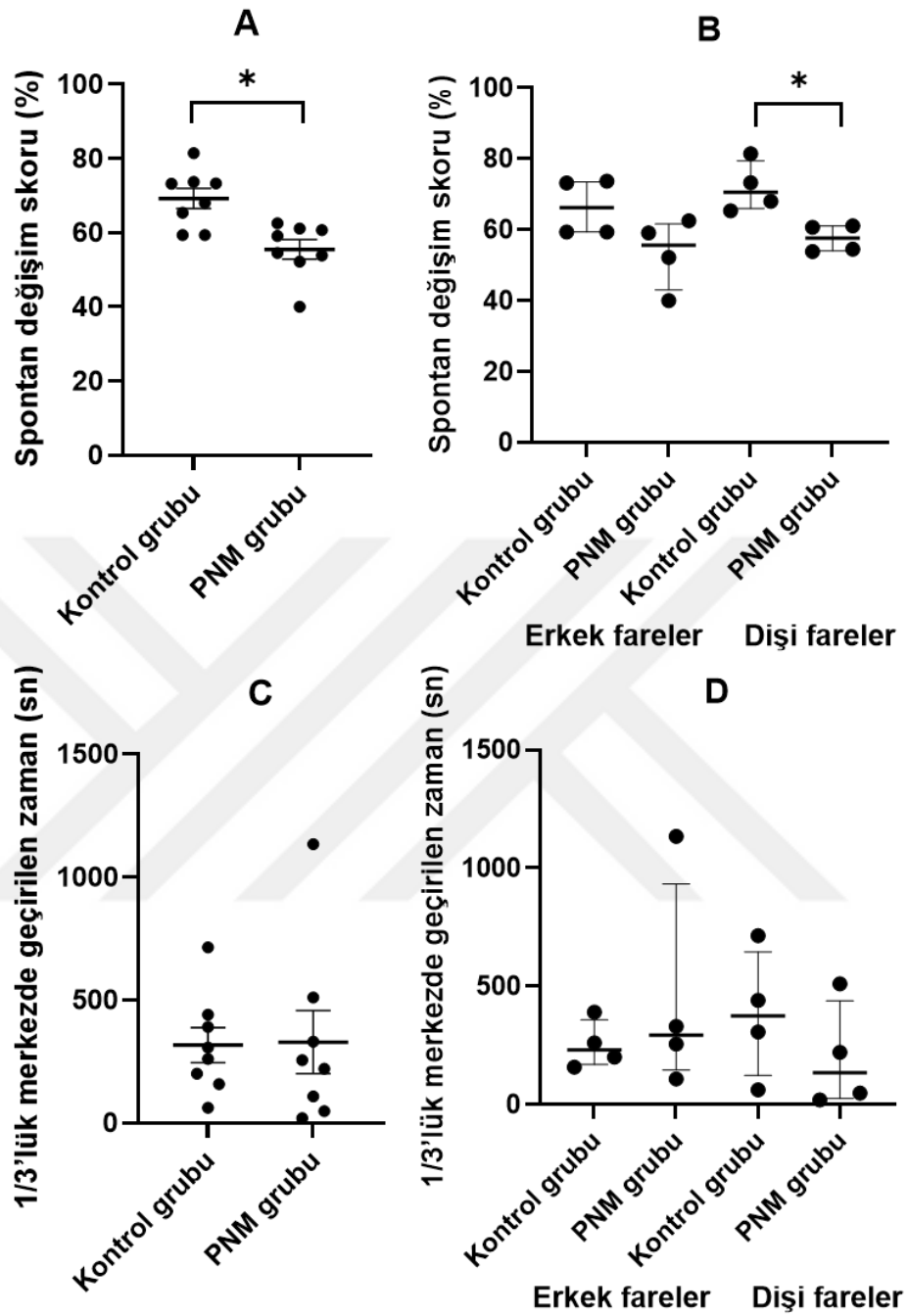
**Şekil 4.1.** Açık alan testi davranış sonuçları: (A) Gruba göre lokomotor aktivite düzeyi (LMA; cm) (Ortalama  $\pm$  SEM olarak gösterilmiştir.), (B) Cinsiyete göre LMA (Medyan  $\pm$  IQR olarak gösterilmiştir.), (C) Gruba göre açık alan testinde merkezde geçirilen süre (sn: saniye) (Ortalama  $\pm$  SEM olarak gösterilmiştir.), (D) Cinsiyete göre merkezde geçirilen süre (Medyan  $\pm$  IQR olarak gösterilmiştir.), (\*)  $p < 0,05$  anlamlılık düzeyini göstermektedir.

Perinatal nikotin maruziyeti ile DEHB'nin modellendiği farelerin kontrol grubuna kıyasla AAT'de merkez alanda daha az zaman geçirdiği saptanmıştır, bu durum anksiyete benzeri davranışların bir göstergesiydi (Şekil 4.1.,  $F(1,15)=5,274$ ,  $p=0,040$ ). Cinsiyetin bu süre üzerine etkisi saptanmamıştır ( $F(1,15)=2,820$ ,  $p=0,119$ ). Bu bulgular, PNM farelerinde anksiyete benzeri davranış düzeylerinin arttığını göstermektedir.

#### **4.1.2. Y-Labirent Testi**

Y-labirent testinde, PNM farelerinin spontan değişim skorları, cinsiyetten bağımsız olarak kontrol farelerine kıyasla anlamlı derecede daha düşük bulunmuştur (Şekil 4.2.,  $F(1,15)=13,092$ ,  $p=0,004$ ). Cinsiyetin, spontan değişim skoru üzerine etkisi saptanmamıştır ( $F(1,15)=1,656$ ,  $p=0,222$ ).

Özellikle, PNM dişi farelerin, kontrol grubundaki dişi farelere kıyasla YLT'de daha az spontan değişim sergilemiştir (Şekil 4.2.,  $z=-2,309$ ,  $p=0,021$ ). Bu bulgular, PNM ile DEHB'nin modellendiği farelerin, dorsal PFK ile ilişkili uzamsal çalışma belleği ve dikkat fonksiyonlarında bozulmalar gösterdiğini doğrulamaktadır.



**Şekil 4.2.** Y-Labirent ve uçurumdan kaçınma reaksiyonu testleri davranış sonuçları: (A) Gruba göre Y-labirent testinde spontan değişim skoru (SDS; %) (Ortalama  $\pm$  SEM olarak gösterilmiştir.), (B) Cinsiyete göre SDS (Medyan  $\pm$  IQR olarak gösterilmiştir.), (C) Gruba göre uçurumdan kaçınma reaksiyonu testinde merkezi 1/3 alanda geçirilen süre (sn: saniye) (Ortalama  $\pm$  SEM olarak gösterilmiştir.), (D) Cinsiyete göre merkezi 1/3 alanda geçirilen süre (medyan  $\pm$  IQR olarak gösterilmiştir.), (\*)  $p < 0,05$  anlamlılık düzeyini göstermektedir.

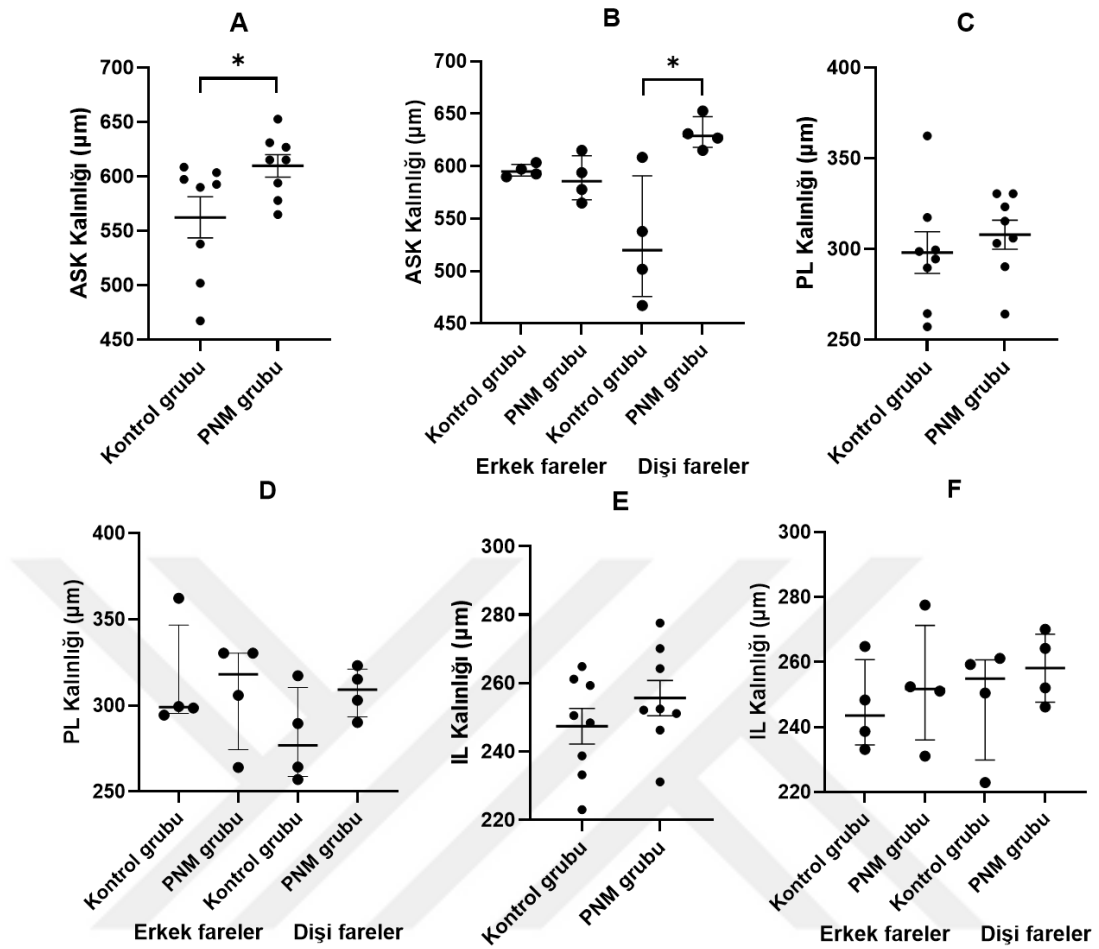
### 4.1.3. Uçurumdan Kaçınma Reaksiyonu Testi

Uçurumdan kaçınma reaksiyonu testinde, platformun 1/3'lük merkezinde geçirilen süre PNM grubu ile kontrol fareleri arasında benzer bulunmuştur (Şekil 4.2.,  $F(1,15)=0,006$ ,  $p=0,939$ ). Cinsiyetin, 1/3'lük merkez alanda geçirilen süre üzerine etkisi saptanmamıştır ( $F(1,15)=0,192$ ,  $p=0,669$ ).

Özetle, PNM farelerinin dikkat ve çalışma belleğinde bozulmalar sergilerken, hiperaktivite veya artmış dürtüsellik göstermemektedir. Tüm bu veriler, perinatal nikotin maruziyetinin DEHB'nin dikkat eksikliği baskın görünümünü modellediğini önermektedir.

### 4.2. Kortikal Kalınlık Sonuçları

Prefrontal korteksin ASK, PL ve IL olmak üzere alt bölgelerinin kortikal kalınlığı değerlendirildiğinde, PNM farelerinin ASK kalınlığı, kontrol farelerine göre daha yüksek bulunmuştur (Şekil 4.3.,  $F(1,15)=8,156$ ,  $p=0,014$ ). Cinsiyetin ASK kalınlığı üzerine etkisi saptanmamıştır ( $F(1,15)=0,504$ ,  $p=0,491$ ), ancak cinsiyet-PNM etkileşimi anlamlı bulunmuştur (cinsiyet-grup etkileşimi:  $F(1,15)=11,091$ ,  $p=0,006$ ). Özellikle, PNM dişi farelerinde kontrol dişi farelere kıyasla ASK kalınlığı daha yüksekti (Şekil 4.3.,  $z=-2,309$ ,  $p=0,021$ ). Ne cinsiyetin ne de grubun (PNM'nin), PL kortikal kalınlığı üzerine etkisi yoktu (Şekil 4.3., sırasıyla  $F(1,15)=1,322$ ,  $p=0,273$ ; ve  $F(1,15)=0,526$ ,  $p=0,482$ ). Benzer şekilde, IL kortikal kalınlığı da ne cinsiyetten ne de gruptan etkilenmedi (Şekil 4.3., sırasıyla  $F(1,15)=0,217$ ,  $p=0,650$ ; ve  $F(1,15)=1,098$ ,  $p=0,315$ ).

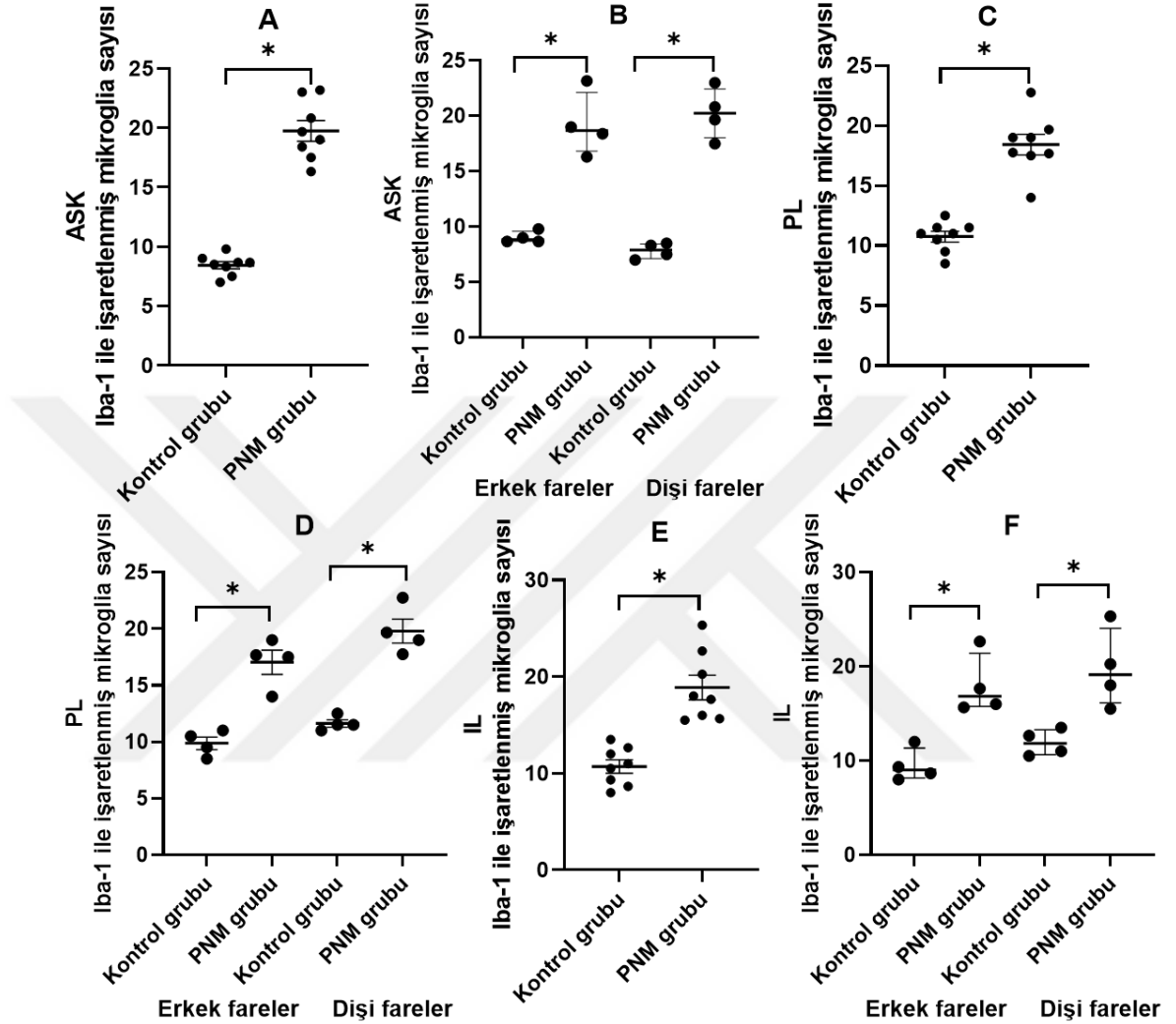


**Şekil 4.3.** Prefrontal korteksin alt bölgelerinin kortikal kalınlık sonuçları: (A) Gruba göre anterior singulat korteksin kalınlığı (ASK;  $\mu\text{m}$ ) (Ortalama  $\pm$  SEM olarak gösterilmiştir.), (B) Cinsiyete göre ASK kalınlığı (Medyan  $\pm$  IQR olarak gösterilmiştir.), (C) Gruba göre prelimbik korteksin kalınlığı (PL;  $\mu\text{m}$ ) (Ortalama  $\pm$  SEM olarak gösterilmiştir.), (D) Cinsiyete göre PL kalınlığı (Medyan  $\pm$  IQR olarak gösterilmiştir.), (E) Gruba göre infralimbik korteksin kalınlığı (IL;  $\mu\text{m}$ ) (Ortalama  $\pm$  SEM olarak gösterilmiştir.), (F) Cinsiyete göre IL kalınlığı (medyan  $\pm$  IQR olarak gösterilmiştir.), (\*)  $p < 0,05$  anlamlılık düzeyini göstermektedir.

### 4.3. İmmüno Floresan Boyama Sonuçları

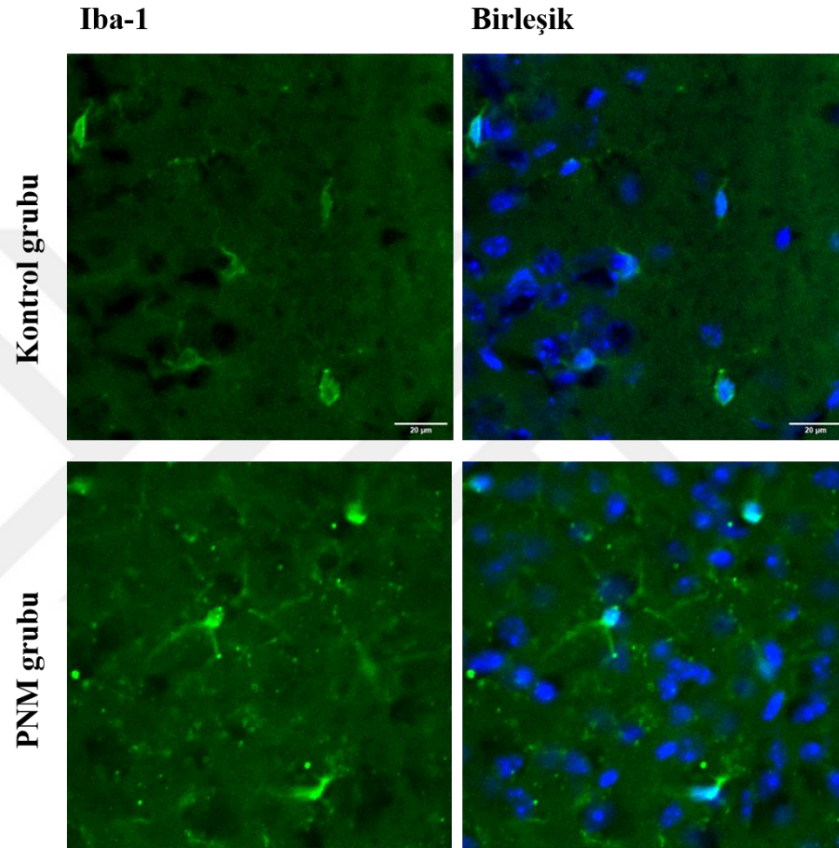
Perinatal nikotin maruziyeti ile DEHB'nin modellendiği farelerin ASK, PL ve IL bölgelerinde, kontrol farelerine kıyasla daha yüksek sayıda Iba-1 ile işaretlenmiş mikroglia bulunmuştur (Şekil 4.4. ve Şekil 4.5., sırasıyla  $F(1,15)=143,257$ ,  $p<0,001$ ;  $F(1,15)=87,824$ ,  $p<0,001$ ; ve  $F(1,15)=32,413$ ,  $p<0,001$ ). Cinsiyetin, ASK ve IL bölgelerindeki Iba-1 ile işaretlenmiş mikroglia sayısı üzerine etkisi saptanmamıştır (Sırasıyla  $F(1,15)=0,009$ ,  $p=0,928$ ; ve  $F(1,15)=2,125$ ,  $p=0,171$ ). Bununla birlikte,

PL’de dişi farelerdeki mikroglia sayısının erkek farelere göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir ( $F(1,15)=7,564$ ,  $p=0,018$ ).



**Şekil 4.4.** Prefrontal korteks alt bölgelerinde ıba-1 ile işaretlenmiş mikroglia sayıları: (A) Gruba göre anterior singulat korteksteki (ASK) mikroglia sayısı (Ortalama  $\pm$  SEM olarak gösterilmiştir.), (B) Cinsiyete göre ASK mikroglia sayısı (Medyan  $\pm$  IQR olarak gösterilmiştir.), (C) Gruba göre prelimbik korteksteki (PL) mikroglia sayısı (Ortalama  $\pm$  SEM olarak gösterilmiştir.), (D) Cinsiyete göre PL mikroglia sayısı (Medyan  $\pm$  IQR olarak gösterilmiştir.), (E) Gruba göre infralimbik korteksteki (IL) mikroglia sayısı (Ortalama  $\pm$  SEM olarak gösterilmiştir.), (F) Cinsiyete göre IL mikroglia sayısı (Medyan  $\pm$  IQR olarak gösterilmiştir.), (\*)  $p < 0,05$  anlamlılık düzeyini göstermektedir.

Deney (PNM ve kontrol) grupları cinsiyet bazında ayrı ayrı karşılaştırıldığında hem erkek hem de dişi PNM farelerinde kontrol erkek ve dişi farelerine kıyasla ASK (Şekil 4.4. ve Şekil 4.5., sırasıyla  $z=-2,323$ ,  $p=0,020$ ; ve  $z=-2,309$ ,  $p=0,021$ ), PL (Şekil 4.4., sırasıyla  $z=-2,309$ ,  $p=0,021$ ; ve  $z=-2,323$ ,  $p=0,020$ ) ve IL (Şekil 4.4., sırasıyla  $z=-2,309$ ,  $p=0,021$ ; ve  $z=-2,309$ ,  $p=0,021$ ) bölgelerinde önemli farklılıklar gözlenmiştir.

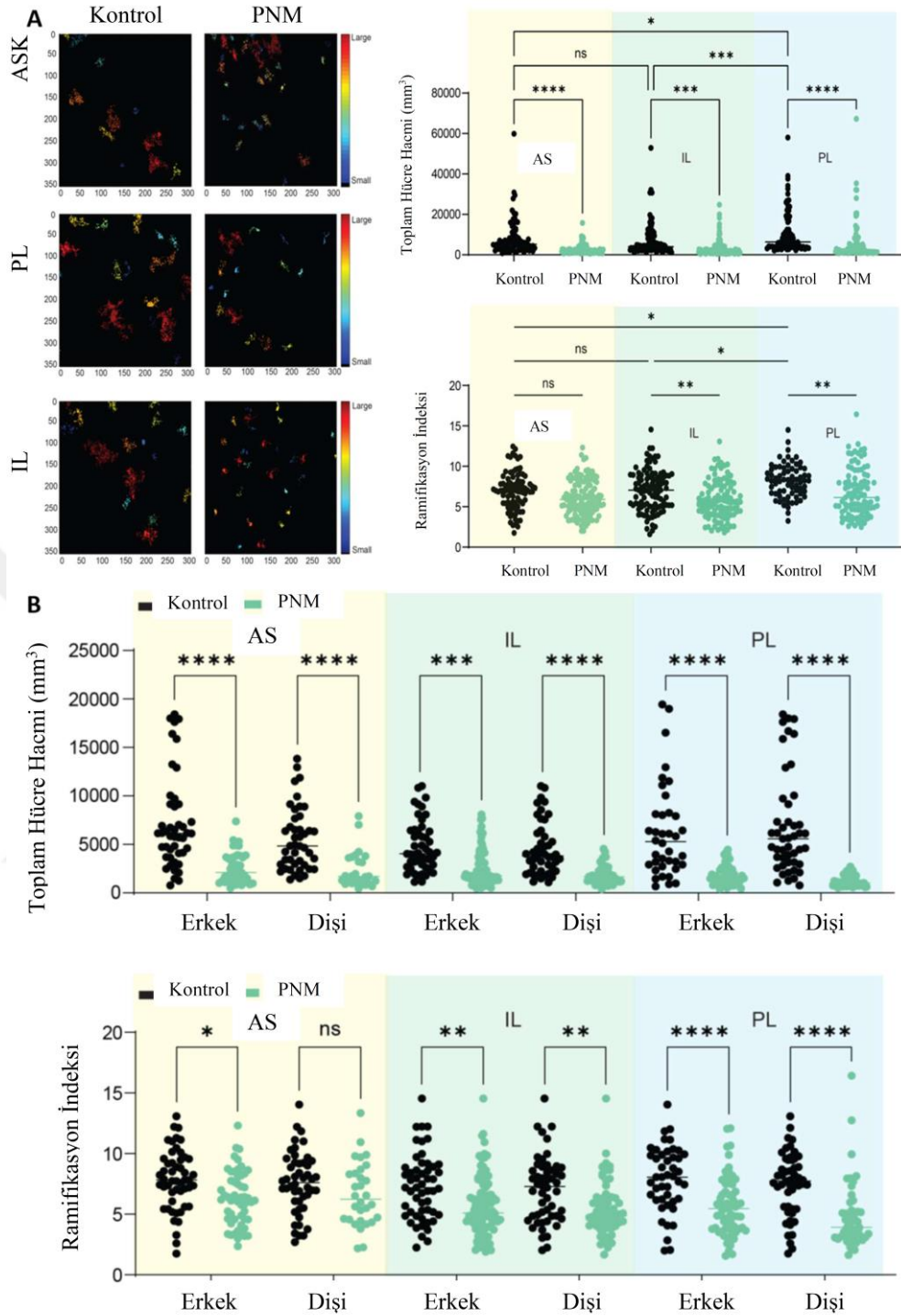


**Şekil 4.5.** Prefrontal kortekste mikrogliaların Iba-1 ile işaretlenmesi: Perinatal nikotin maruziyeti ile DEHB'nin modellendiği fareler ile kontrol farelerinde mikrogliaların Iba-1 ile işaretlenmesini (yeşil) gösteren temsili görüntüler. Mavi sinyal, hücre çekirdeklerinin Hoechst boyaması ile işaretlendiğini göstermektedir.

Mikroglia morfolojisinin analizi, PNM farelerinin tüm PFK alt bölgelerinde toplam mikroglia hacminde önemli bir azalma olduğunu ve bunun da mikroglia aktivasyonunu işaret ettiğini göstermiştir (Şekil 4.6., tüm  $p$ 'ler  $<0,001$ ). Özellikle, PNM farelerinin PL ve IL bölgelerinde anlamlı derecede daha düşük ramifikasyon indeksleri olduğu (sırasıyla  $p=0,004$  ve  $p=0,009$ ), ASK'deki mikroglia dallanmalarının ise kontrol fareleriyle kıyaslanabilir olduğu saptanmıştır

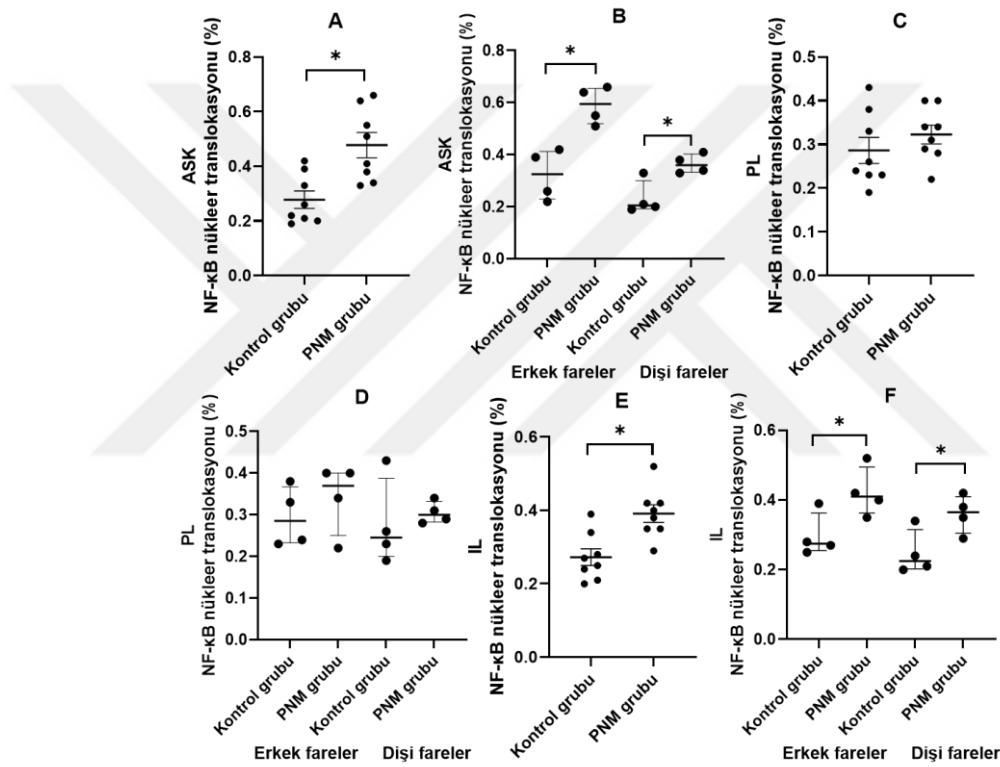
( $p=0,243$ ). Aynı zamanda, her iki cinsiyet içinde PNM ve kontrol gruplarının ASK, PL ve IL bölgelerindeki toplam mikroglia hacmi karşılaştırıldığında benzer anlamlı bulgular elde edilmiştir (Şekil 4.6., tüm  $p$ 'ler $<0,001$ ). Ramifikasyon indeksi açısından ise, dişi cinsiyetinde PNM ve kontrol gruplarının ASK bölgesindeki ramifikasyon indeksi karşılaştırması dışında, her iki cinsiyet içindeki gruplar arası tüm karşılaştırmalar benzer şekilde anlamlıydı (Şekil 4.6., tüm  $p$ 'ler $<0,05$ ). Ayrıca, kontrol grubundaki PL'de yerleşik mikrogliaların ASK ve IL bölgelerine göre anlamlı derecede daha fazla dallanmış olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.6., sırasıyla  $p=0,019$  ve  $p=0,028$ ). Bu durum, mikroglianın hem dinlenme hem de aktivasyon durumlarında bölgesel farklılıklar gösterebileceğini yansıtmaktadır.





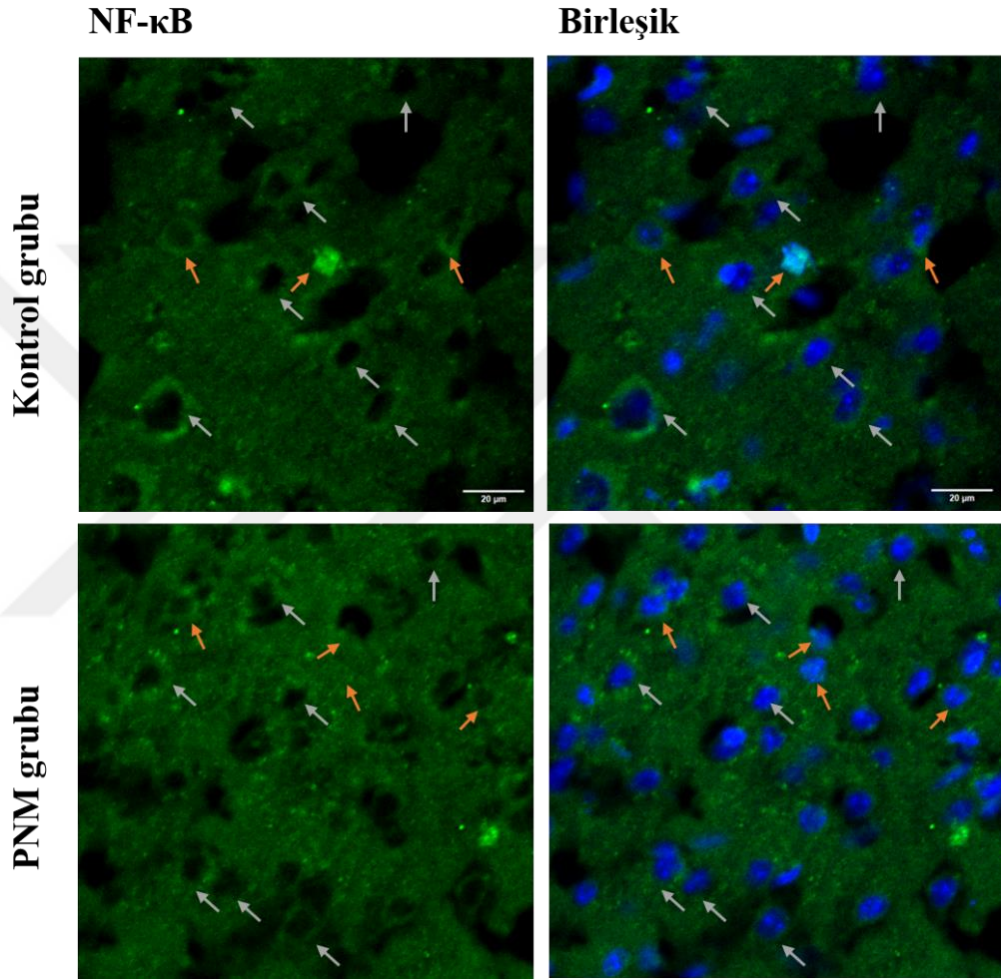
**Şekil 4.6.** Prefrontal korteksin alt bölgelerinde mikroglia morfolojisi: (A) Perinatal nikotin maruziyeti ile DEHB'nin modellendiği fareler ile kontrol farelerinde anterior singulat korteks (ASK), prelimbik korteks (PL) ve infralimbik korteksteki (IL) toplam hücre hacmi ve ramifikasyon (dallanma) indeksi verileri, (B) Cinsiyete göre ASK, PL ve IL bölgelerindeki mikroglia morfolojisi verileri, (\*)  $p < 0,05$ , (\*\*)  $p < 0,01$ , (\*\*\*)  $p < 0,001$  ve (\*\*\*\*) ise  $p < 0,0001$  anlamlılık düzeylerini göstermektedir.

Perinatal nikotin maruziyeti ile DEHB'nin modellendiği farelerin ASK ve IL bölgelerinde NF- $\kappa$ B'nin nükleer translokasyonunun (yani aktivasyonun) kontrol grubuna kıyasla arttığı saptanmıştır (Şekil 4.7. ve Şekil 4.8., sırasıyla  $F(1,15)=31,175$ ,  $p<0,001$ ; ve  $F(1,15)=14,062$ ,  $p=0,003$ ), bu durum PL'ye kıyasla anlamlı farklılık göstermektedir ( $F(1,15)=1,002$ ,  $p=0,337$ ). Cinsiyetin ASK'deki çekirdeğe transloke olmuş NF- $\kappa$ B hücre oranı (NF- $\kappa$ B aktivasyonu) üzerine etkisinin anlamlı olduğu ve erkek farelerde çekirdek bölgesinde NF- $\kappa$ B ile işaretlenme oranlarının daha yüksek olduğu belirlenmiştir ( $F(1,15)=19,030$ ,  $p=0,001$ ).



**Şekil 4.7.** Prefrontal korteks alt bölgelerinde NF- $\kappa$ B çekirdek translokasyonu: (A) Gruba göre anterior singulat kortekste (ASK) çekirdek içinde NF- $\kappa$ B ile işaretlenmiş hücrelerin oranı (%) (Ortalama  $\pm$  SEM olarak gösterilmiştir.), (B) Cinsiyete göre ASK'deki NF- $\kappa$ B nükleer translokasyon oranı (%) (Medyan  $\pm$  IQR olarak gösterilmiştir.), (C) Gruba göre prefrontal kortekste (PL) çekirdek içinde NF- $\kappa$ B ile işaretlenmiş hücrelerin oranı (%) (Ortalama  $\pm$  SEM olarak gösterilmiştir.), (D) Cinsiyete göre PL'deki NF- $\kappa$ B nükleer translokasyon oranı (%) (Medyan  $\pm$  IQR olarak gösterilmiştir.), (E) Gruba göre infralimbik kortekste (IL) çekirdek içinde NF- $\kappa$ B ile işaretlenmiş hücrelerin oranı (%) (Ortalama  $\pm$  SEM olarak gösterilmiştir.), (F) Cinsiyete göre IL'deki NF- $\kappa$ B nükleer translokasyon oranı (%) (Medyan  $\pm$  IQR olarak gösterilmiştir.), (\*)  $p < 0,05$  anlamlılık düzeyini göstermektedir.

Deney (PNM ve kontrol) grupları cinsiyet bazında ayrı ayrı karşılaştırıldığında hem erkek hem de dişi PNM farelerinde kontrol erkek ve dişi farelere kıyasla ASK (Şekil 4.7. ve Şekil 4.8., sırasıyla  $z=-2,309$ ,  $p=0,021$ ; ve  $z=-2,309$ ,  $p=0,021$ ) ve IL (Şekil 4.7 ve Şekil 4.8, sırasıyla  $z=-2,021$ ,  $p=0,043$ ; ve  $z=-2,021$ ,  $p=0,043$ ) bölgelerinde önemli farklılıklar gözlenmiştir.



**Şekil 4.8.** Prefrontal kortekste NF- $\kappa$ B çekirdek işaretlemesi: Perinatal nikotin maruziyeti ile DEHB'nin modellendiği fareler ile kontrol farelerinde NF- $\kappa$ B'nin çekirdek işaretlemesini gösteren temsili görüntüler. Turuncu oklar, çekirdek translokasyonunu vurgulamaktadır. Mavi sinyal, hücre çekirdeklerinin Hoechst boyaması ile işaretlendiğini göstermektedir.

## 5. TARTIŞMA

Bu çalışmada PNM modeli kullanılarak farede erken ergenliğe tekabül eden bir dönem olan postnatal 5. haftada DEHB benzeri davranışlarla birlikte PFK'nin alt bölgelerinde kortikal kalınlık ve nöroinflamatuvar değişiklikler değerlendirilmiştir. Perinatal nikotin maruziyeti ile farelerin yalnızca %47,1'inin DEHB benzeri dikkat bozukluğu geliştirdiği gözlemlenmiştir. Bu farelerde lokomotor aktivite ve dürtüsellik kontrol grubundan farklılık göstermez iken, anksiyete benzeri davranışlarda belirgin bir artış gözlenmiştir. Çalışmanın davranış verileri, hem kız hem de erkek çocuklarında DEHB'nin en yaygın görülen tipi olan dikkat eksikliği baskın görünümü ile uyumludur.

Çeşitli kohort ve meta-analiz çalışmalarında annenin gebelik döneminde sigara kullanımının çocukta DEHB gelişme riskini arttırdığı gösterilmiştir (70). Sigara dumanında bu etkiye potansiyel olarak aracılık edebilecek birçok kimyasal bulunmasına rağmen, hayvan çalışmalarında nikotinin sorumlu ajan olduğu tutarlı bir biçimde bildirilmiştir (56, 57, 71). Nikotin, plasentadan geçme ve fetal dokularda birikme özelliğine sahiptir. Teratojeniktir ve fetüste nöronal asetilkolin reseptörlerini aktive ederek progenitor hücreler arasındaki sinyal iletimini potansiyel olarak bozabilir. Bu bozulma, proliferasyon, göç ve maturasyon gibi süreçleri etkileyebilir ve doğum sonrası dönemde DEHB benzeri davranışlara yol açabilir (56, 57, 72). Çalışmamızda, önceki bulgularla tutarlı olarak, perinatal nikotin maruziyeti ile bir DEHB modeli oluşturulmuştur. Ancak, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında lokomotor aktivite ve dürtüsellikte önemli bir fark gözlemlenmemiştir. Literatür incelendiğinde, perinatal nikotin maruziyeti sonrası yavrulardaki lokomotor aktivitenin kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında daha yüksek, daha düşük veya benzer olabileceği anlaşılmıştır. Locomotor aktivite sonuçları cinsiyet, nikotin dozajı ve uygulama zamanı ile testin yapıldığı yaş gibi faktörlerden etkilenmektedir (59, 60, 71, 73-77). Bu çalışmada DEHB modelini oluşturan farelerin eşlik eden önemli anksiyete benzeri davranışları düşünüldüğünde, lokomotor aktiviteyi değerlendiren testte açık alan bileşeninin olması PNM farelerinde hareketliliği kısıtlamış olabilir. Bu nedenle, gelecekteki çalışmalarda hiperaktivitenin farelerin doğal yaşam alanını andıran bir ortamda değerlendirilmesi önerilmektedir (77). Öte yandan, davranış testleri ergenliğe denk gelen bir zaman diliminde uygulanmıştır, DEHB'nin yaşam

boyu süren seyri sırasında okul öncesi dönem sonrasında hiperaktivite ve dürtüsellik belirtilerinin azaldığı, dikkat eksikliği belirtilerinin daha kalıcı olduğu, zaman içerisinde hiperaktivite-dürtüsellik baskın görünümün sıklığının azalarak, dikkat eksikliği baskın görünümün sıklığının arttığı, üç tip arasında bu yönde bir geçiş olabileceği bilinmektedir (19). Lokomotor aktivite ile benzer şekilde, dürtüsellik değerlendirilmek için kullanılan uçurumdan kaçınma reaksiyonu testine anksiyete benzeri davranışların olası katkısı göz ardı edilmemelidir (59). Aynı hayvan modelinin (PNM) kullanıldığı çalışmalarda uçurumdan kaçınma reaksiyonu ile ilgili sonuçlar tutarsız bulunmuş, PNM erkek yavruları daha az uçurumdan kaçınma davranışı gösterirken (dürtüsellik benzeri davranışlar), dişiler arasında farklılık gözlenmemiştir (59). Başka bir çalışmada PNM yavruları bu testte uçurumdan kaçınma pozisyonunda anlamlı derecede daha fazla zaman harcarken, dişi yavrular daha hareketsizmiş, daha az mesafe kat etmiş ve AAT’de merkezde daha az zaman geçirmiş (78). Bu bozukluğa en sık eşlik eden durumlardan biri olan artmış anksiyetenin karıştırıcı etkisinden bağımsız olarak dürtüsellik benzeri davranışları daha doğru bir şekilde değerlendirmek için gelecekteki çalışmaların, git/dur testi (go/no-go testi) gibi davranışı engelleyememe yeteneğini özel olarak ölçen bir paradigmadan faydalanabileceği düşünülmektedir (79).

Davranışsal bulgularla uyumlu olarak, PNM farelerinde ASK’nin kontrol farelerine kıyasla anlamlı derecede daha yüksek kortikal kalınlığı olduğu bulunmuştur. Özellikle, dişi PNM farelerinde ASK kalınlığı dişi kontrollere göre belirgin fazlaydı. Yapısal görüntüleme çalışmaları, DEHB’li çocuklarda özellikle ASK gibi dikkatle ilişkili bölgelerin nispeten yavaş kortikal incelme gösterdiğini ortaya koymuştur (80). Çalışmalar, dorsomedial (DM-PFK; farelerdeki ASK’nin homoloğu) ve ventromedial (VM-PFK; PL ve IL’nin homoloğu) prefrontal bölgelerdeki kortikal incelme hızı ile hiperaktivite ve dürtüsellik belirtilerinin şiddeti arasında negatif bir korelasyon olduğunu da göstermiştir (7, 81). Sinaptik budanma gibi nöral bağlantıların iyileştirilmesini içeren tipik gelişimsel süreçlerin, DEHB’li bireylerde gecikebileceği, bu durumun da beyin yapısı ve işlevindeki gözlemlenen varyasyonlara yol açabileceği düşünülmektedir (48). Bu çalışmanın ASK kalınlığı bulgusu gecikmiş kortikal incelme ile tutarlı olmakla birlikte, DEHB’de bölgeler bazında gözlemlenen artmış kortikal kalınlık görüşünü de yansıtmaktadır (21). Ancak, DEHB ile ilgili araştırmalarda,

genellikle yaygın beyin bölgelerinde daha ince kortikal kalınlıklar gösterilmiş olmakla birlikte literatürde metodolojik farklılıklar ve muhtemelen bunlardan kaynaklı tutarsız sonuçlar mevcuttur (82). Ergenlik döneminde, farelerin PFK yapı ve işlevinde önemli bir yeniden organizasyon gerçekleştirdiği gösterilmiş, çoğu bilişsel işlevle ilişkili olan prefrontal gelişimin doğrusal olmayan bir seyir izlediği vurgulanmıştır (51). Çalışmalar arasındaki tutarsızlık, PFK maturasyonunun diğer beyin bölgelerine kıyasla zamanlama farklılıklarından kaynaklanıyor olabilir. Diğer alt bölgelerin (PL ve IL'nin) kortikal kalınlıkları ASK'nin aksine benzerdi. Kortikal kalınlıktaki bu varyasyonlar aslında gecikmiş maturasyonla ilgili temel sorunları, dolayısıyla da budanma süreçlerini düşündürmektedir. Genellikle daha erken olgunlaşması (maturasyonu) beklenen motivasyonel kontrol ve ödülle ilişkili karar verme gibi sıcak yürütücü işlevlerdeki eksiklikler, ventral PFK bağlantılı devrelerdeki değişikliklerle açıklanmaktadır (83). Kontrol grubu ile benzer kalınlıktaki PL ve IL bölgeleri her iki grupta da benzer maturasyon süreçlerini tamamlamış ve dolayısıyla hiperaktivite ve dürtüsellik benzeri davranışlarda gruplar arasında fark gözlemlenmemiş olabilir (65). Ayrıca, DEHB'li bireylerde ağırlıklı olarak dorsal PFK bağlantılı devrelerdeki aktivasyon değişiklikleri, motor inhibisyon ve sürdürülebilir dikkat gibi daha geç olgunlaşan (maturasyonunu geç tamamlayan) soğuk yürütücü işlevlerdeki eksikliklerle ilişkilendirilmektedir (84). Böylece, PNM farelerindeki artmış ASK kalınlığı ve dikkatle ilgili bozukluk, gecikmiş kortikal maturasyon (gecikmiş incelleme ve budanma) ile ilişkili olabilir. Bu çalışmada kortikal kalınlıklar ASK, PL ve IL bölgelerini içeren daha ön bölgelerden alınan koronal kesitlerden hesaplanmıştır. Bunun aksine, Zhu ve ark. (2012) doğum sonrası 42. günde sakrifiye edilen PNM grubu farelerde singulat korteks hacminde ve singulat korteks uzunluğunda (radyal kalınlık) anlamlı bir azalma tespit etmiştir. Ancak, singulat korteksin tüm rostrokaudal uzantısını temsil eden koronal kesitlerde genişliğinde (yani kalınlığında) azalma gözlenmemiştir (77). Bu bölgedeki azalmış radyal kalınlığın hücre sayıları, dendritik dallar veya akson terminallerindeki azalmayı yansıttığı ileri sürülse de metodolojik farklılıklardan da kaynaklanıyor olabilir. Şöyle ki, PNM fare modeli kullanılan diğer hayvan çalışmalarında nikotinin dendritik diken yoğunluğunda kalıcı değişikliklere neden olduğu bildirilmiştir (85-87). Gelişimsel nikotin maruziyetinin çeşitli kortikal alanlardaki nöron morfolojisini değiştirdiği (genellikle gri maddede değişiklikler) ve

difüzyon tensör görüntülemesi ile ölçülen fraksiyonel anizotropide önemli bir artışa yol açtığı bulunmuştur. Bu değişiklikler, dendritik diken yoğunluğu, dendritik arborizasyon ve karmaşıklıkta artışlar şeklinde olup gecikmiş maturasyon ve budanma süreçlerinin dolaylı bir kanıtı olarak yorumlanabilir (85). Bununla birlikte, son yıllarda yapılan büyük ölçekli görüntüleme çalışmaları, DEHB ile ilişkilendirilen yapısal değişikliklerin daha önce rapor edilenlerden belirgin şekilde daha az olduğunu vurgulamaktadır (88). Ergen Beyni Bilişsel Gelişimi (ABCD: Adolescent Brain Cognitive Development) çalışmasında DEHB’de daha önce bildirilen kortikal kalınlık değişikliklerinde anlamlı farklılıklar bulunamamıştır (89).

Kortikal kalınlıkla ilişkili moleküler mekanizmalar hâlâ gizemini korumaktadır; bu nedenle, nörogelişimin doğumdan erişkinliğe kadar bölge bazında incelendiği mikroglia aracılı sinaptik budanma gibi süreçlere odaklanan çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Mikrogliaların dendritik ağaç ve dolayısıyla kortikal hacim üzerine etkileri bilindiğinden, mikroglia sayısı ve aktivasyonundaki değişiklikler araştırılmıştır. Kontrollere kıyasla PNM farelerinin tüm PFK alt bölgelerinde mikroglia sayıları artmış, mikrogliaların toplam hücre hacimleri azalmış ve ASK dışındaki alt bölgelerde dallanmaları (ramifikasyon indeksleri) azalmış olarak bulunmuş, dolayısıyla artmış mikroglial aktivasyon şeklinde yorumlanmıştır. Özellikle, PNM farelerinde dikkat bozukluğuna katkıda bulunabilecek ASK’deki bu değişiklikler kortikal kalınlıkta ve NF- $\kappa$ B aktivasyonunda artışlarla birliktelik göstermektedir. Kontrollere kıyasla NF- $\kappa$ B aktivasyonundaki artış, PNM farelerinde ASK ile birlikte IL’de de gözlenmiştir. Özellikle, IL’deki NF- $\kappa$ B aktivasyonu ile birlikte PL ve IL’deki mikroglial aktivasyon bulguları, kontrollere kıyasla anksiyete benzeri davranışlardaki dikkate değer artışla ilişkilendirilebilir. Erkeklerden farklı olarak, PNM dişi fareleri dişi kontrollere kıyasla belirgin dikkat bozukluğu ve artmış ASK kalınlığı sergilemiştir.

Bu çalışmanın bulgularına benzer şekilde, spontan hipertansif sıçanların (SHS) beyinlerinde mikroglial aktivasyonla birlikte proinflamatuvar sitokinlerin arttığı bulunmuş, 6 haftalık SHS’lerin PFK’sinde Iba-1 işaretlenmesi yüksek düzeyde saptanmıştır (90, 91). Bu çalışmaların sonuçları, DEHB patofizyolojisinde nöroinflamatuvar sinyalizasyonun rolünü, kan-beyin bariyeri yapısının ve geçirgenliğinin bozulmasını ve otofaji dengesinin normal fizyolojik bir yanıtın

patolojiye kaymasını desteklemektedir. Ayrıca, DEHB tedavisinde yaygın olarak kullanılan bir uyarıcı olan metilfenidat, medial PFK'deki mikroglia sayısını (Iba-1 ile ifade edilen) ve bilişsel bozulmayı azaltmıştır (92). Metilfenidat tedavisi SHS'lerde mikroglial hücrelerin morfolojisini aktif durumdan dinlenim durumuna değiştirmiş, mikrogliaların dallanmalarının sayısını ve uzunluğunu arttırmıştır (93). Pozitron emisyon tomografisi kullanılarak, DEHB'li bireylerin PFK'sinde artmış mikroglial aktivasyon gözlemlenmiştir. Bu bulgu, işleme hızı ve dikkat eksikliği gibi DEHB belirtilerinin şiddeti ile de ilişkili bulunmuştur (94). Bu çalışma aynı zamanda NF-κB aktivasyonunun, özellikle dorsal PFK'de, mikroglial aktivasyon ile birlikte arttığını göstermiştir. Hücre kültürü çalışmaları, alarminlerin mikroglial hücrelerin göçünü, proliferasyonunu ve fagositoz kapasitesini düzenlediğini bildirmiştir. Alarminler TLR4/NF-κB yollarını aktive ederek, mikroglial hücrelerde NF-κB'nin çekirdeğe translokasyonuna yol açar ve hücre iskeletini düzenleyerek fagositozu artırır (95, 96). Bu bulgular, Uzay ve ark. (2024) tarafından önerilen NF-κB aracılı mikroglia proliferasyonu ve aktivasyonu yollarıyla tutarlıdır (97). Mikroglial morfolojideki değişiklikler mikroglial proliferasyona eşlik etmekte ve mikroglial aktivasyonu göstermektedir. Benzer şekilde, prekonsepsiyon, gebelik ve laktasyon sırasında nikotine maruz kalma, hipokampal nörogenezi etkilemekte, mikroglial aktiviteyi arttırmakta ve ergenlik döneminde yavrularda anksiyete benzeri davranışlara yol açmaktadır (78). Ergenlik döneminde geçici olarak prefrontal bölgede mikroglia eksikliği/yetersizliği, PFK'nin özellikle dorsal alt bölgelerindeki piramidal nöronlarda sinaptik yoğunlukta azalma ile birlikte bilişsel yeteneklerde bozulmaya neden olmaktadır (49). Mikroglial değişiklikler, mikroglia aracılı sinaps budanması yoluyla sinaps oluşumunu ve maturasyonunu etkileyebilir ve potansiyel olarak sinaptik bağlantılarda kusurlar ile birlikte bilişsel bozulmalara neden olabilir (48). Bu çalışmada dorsal PFK'deki nöroinflamatuvar değişikliklerin dikkatle ilişkili bozuklukla bağlantılı olabileceğine dair tutarlı kanıtlar sunulmuştur.

Embriyonik gelişim sırasında mikrogliaların kolonizasyonu büyük ölçüde kan damarları ve dolaşıma bağlıdır. Mikrogliaların gelişimi, kan damarlarına konum ve uzaklıklarından etkilenir, beslenmesi daha iyi olan bölgelerde daha karmaşık dallanmalar gelişir (98). Perinatal nikotin maruziyeti, fetal beyindeki kılcak kan akımını azaltarak mikrogliaların dallanmış formuna uygun maturasyonunu

geciktirebilir ve yavrularda mikroglial kusurlara yol açabilir (78, 98, 99). Normal gelişim sırasında, medial prefrontal korteksin aktivitesi ve bilişsel performans, ergenlik döneminde artış gösteren bir desen izler (49). Sinaptik yoğunluğun ve dendritik dallanmanın yeniden şekillenmesi gibi mikroglia aracılı yapısal değişiklikler gerçekleşir (50). Bunların yanı sıra işlevsel olarak da yeniden organizasyon gözlenir (51). Bu dönemde PFK'de aktif mikroglialar daha yuvarlak ve daha az dallanmış bir morfolojiye sahiptir. Fagositoz aktivitesi artmıştır ve nöronal devrelerin gelişimi ve üst düzey bilişsel becerilerin kazanılması için kritik öneme sahiptir. Ancak, bu aşamada mikroglial aktivitede kusurlar olursa prefrontal morfoloji ve bağlantılı devrelerin aktivitesi değişebilir, dendritik diken yoğunluğunda değişikliklerle birlikte yetişkinliğe kadar devam eden bilişsel bozulmalara neden olabilir (49, 51). Ergenlik döneminde yaşa bağlı mikroglia aracılı budanma, bölgeye özgü yapısal ve işlevsel maturasyon sağlar, bunun sonucunda PFK ile ilişkili bilişsel yetiler gelişir (48). Benzer bir hiyerarşinin PFK'nin alt bölgeleri arasında da var olması muhtemeldir (100). Kontrol grubunda, PL'de yerleşik mikrogliaların ASK ve IL'deki mikroglialara kıyasla anlamlı derecede daha fazla dallanma gösterdiği saptanmıştır. Bu mikroglialar dinlenme durumunda olup PL'nin diğer alt bölgelerden daha erken olgunlaşmış olabileceğini düşündürmektedir. İlginç bir şekilde, muhtemelen en son olgunlaşan alt bölge olan ASK'de, mikrogliaların kontrollere kıyasla daha dallanmış olması ve dolayısıyla mikroglial aktivasyonun daha az olması nedeniyle artmış kortikal kalınlık ve dikkat bozukluğu gözlemlenmiş olabilir. Bu bulgular PNM farelerinin dorsal PFK'sinde gecikmiş maturasyonu desteklemektedir. Sinaptik budanmanın ergenlik döneminde dişilerde erkeklerden daha erken gerçekleştiği tahmin edilmekte, gözlemlenen farklılıkların gruplar arasında dişilerde daha belirgin olduğu izlenmektedir (48).

Bu çalışmada ASK ve IL'de artmış NF- $\kappa$ B aktivasyonu gözlenmiştir. Transkripsiyon faktörü NF- $\kappa$ B, sitokinler, kemokinler ve adezyon molekülleri gibi çeşitli proinflamatuvar genlerin ifadesi ve salınımı ile birlikte mikroglial fagositozunu arttırarak nöroinflamatuvar sinyalizasyon, nöroproteksiyon ve apoptozu düzenler (101). Nörogelişimsel bozukluklardan otizm spektrum bozukluğu (OSB) patofizyolojisini inceleyen insan çalışmalarında, periferik kan örneklerinde ve postmortem beyin dokularında NF- $\kappa$ B aktivasyonu ile ilgili yolakları içeren inflamatuvar sinyalizasyon

gösterilmiştir. Benzer şekilde, OSB modelleri kullanan hayvan çalışmalarında da beyin dokularında nöroinflamasyon bulguları tutarlı olarak sunulmuştur (102). Doğrudan NF-κB düzeyleri yerine, DEHB'li çocuk ve ergenlerin periferik kan örneklerinde NF-κB yolakları ile ilişkili sitokinler ve kemokinlerin düzeyleri geniş çapta araştırılmıştır. Bu çalışmalarda ilgili inflamatuvar belirteçlerde düşük düzeyde artışlar tespit edilmiştir (103). Ayrıca, bir prospektif çalışma, gebelik sırasında annelerin periferik kan örneklerindeki NF-κB yolaklarıyla ilişkili sitokinlerin seviyelerinin, 4-6 yaş aralığındaki çocuklarda DEHB belirtilerini öngördüğünü göstermiştir (104). Tüm bu kanıtlar ışığında, gebelikte stres, obezite ve annenin sigara kullanımı gibi prenatal risk faktörlerinin, maternal inflamasyonu tetikleyebileceği ve çocuklarda nöroinflamatuvar değişikliklere yol açarak DEHB gibi nörogelişimsel bozukluklara neden olabileceği söylenebilir. Ancak, bu bulguları desteklemek için, çevresel risk faktörlerine karşı genetik duyarlılığı ve bunlarla ilişkili epigenetik mekanizmaları araştıran daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

Bu çalışmanın bulguları değerlendirilirken bazı kısıtlılıklar göz önünde bulundurulmalıdır. Davranışsal ve moleküler değişiklikleri araştırmak için kullanılan kapsamlı fare modeli, perinatal nikotin maruziyeti yoluyla çevresel risk faktörlerine yönelik koruyucu müdahaleler geliştirmek için değerli içgörüler sunsa da, DEHB'nin yüksek kalıtılabilirliği bu çevresel temelli modelden elde edilen bulguların genelleştirilebilirliğini sınırlamaktadır. Davranış testlerinden Y-labirent, açık alan ve uçurumdan kaçınma reaksiyonu testleri, PFK işlevleri ile ilgili değerlendirmeler için yeterli kanıtlar sunsa da, DEHB'nin klinik heterojenitesi nedeniyle ek davranışsal testlerin dahil edilmesi dikkat ve dürtü kontrolü üzerine PFK'ye özgü daha spesifik değerlendirmeler sağlayabilir. Kortikal maturasyonun değerlendirilmesinde alt bölgeye özgü kortikal kalınlık ölçümleri, PFK gelişiminin doğrusal olmayan şekilde ilerlediği ergenlik döneminde dikkatle yorumlanmalıdır. Ayrıca, juvenil dönemde prefrontal korteksin alt bölgelerinde mikroglyal aktivasyon ve ilgili nöroinflamatuvar sinyal yolakları araştırılarak bölgeye özgü değişiklikler aydınlatılmaya çalışılsa da, bunların kortikal maturasyonla ilişkisi halen net değildir. Dikkate değer bir sınırlılık da kullanılan hayvan sayısının görece az olmasıdır, buna rağmen erkek ve dişi fareler arasındaki cinsiyet farklılıklarına odaklanılmış olması, gelecekteki araştırma çabaları için bir temel oluşturabilir.

Sonuç olarak, bu çalışmada PNM farelerinde dikkatle ilişkili bozukluğa temel oluşturan ASK'de artmış NF- $\kappa$ B aktivasyonu ile birlikte artmış kortikal kalınlık, mikroglia sayısı ve aktivasyonu gösterilmiştir. Nöroinflamatuvar sinyalizasyonun DEHB patofizyolojisindeki rolünü açıklayan bu bulgular, bozukluğun patofizyolojik mekanizmalarına özel tedavi stratejilerinin geliştirilmesi için öncü çabaların yolunu açacaktır. Ayrıca, PNM dişi ve erkek farelerinin DEHB benzeri davranışlar, PFK'de kortikal kalınlık ve nöroinflamatuvar sinyalizasyon konusunda küçük farklılıklar gösterebileceği gözlemlenmiştir. Bu çalışma görece küçük örneklem büyüklüğü nedeniyle, cinsiyetler arasında farklılıklar olabileceğine dair pilot veriler sunmakta, daha büyük örneklerde bu konunun ele alınmasının gerekliliğini vurgulamaktadır.



## 6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

### 6.1. Sonuçlar

#### 6.1.1. Davranışsal Sonuçlar

PNM ile deney grubunun neredeyse yarısında DEHB'nin dikkat eksikliği baskın görünümüyle uyumlu DEHB modeli oluşturulmuştur.

PNM fareleri, kontrol farelerine kıyasla YLT'de daha düşük spontan değişim skorları göstermiştir. Bu durum, dikkat ve çalışma belleği bozukluğunu işaret etmektedir.

PNM ve kontrol grupları arasında AAT'de LMA (hiperaktivite benzeri davranışlar) ve UKRT'de uçurumdan kaçınma tepkisi (dürtüsellik benzeri davranışlar) açısından fark saptanmamıştır.

PNM fareleri, AAT'de kontrol grubuna kıyasla merkezde daha az zaman geçirmiştir, bu da anksiyete benzeri davranışların arttığını göstermektedir.

#### 6.1.2. Kortikal Kalınlık Sonuçları

PNM farelerinde ASK kalınlığı kontrol grubuna göre artmıştır, PL ve IL kalınlıklarında ise anlamlı bir fark gözlenmemiştir.

#### 6.1.3. Mikroglial Aktivasyon ve NF-κB Sonuçları

PNM farelerinde ASK, PL ve IL bölgelerinde mikroglia sayısı ve aktivitesi artmıştır.

PNM farelerinde ASK, PL ve IL'de toplam mikroglia hacminde ve ASK dışındaki bölgelerde mikroglia ramifikasyon (dallanma) indekslerinde belirgin azalmalar tespit edilmiş, artmış mikroglial aktivasyon gözlenmiştir.

PNM farelerinde ASK ve IL'de artmış NF-κB aktivasyonu gözlemlenmiştir.

#### 6.1.4. Cinsiyet Farklılıklarına İlişkin Sonuçlar

Kontrol grubuna kıyasla PNM grubundaki dikkat bozukluğu ve artmış ASK kalınlığı bulguları dişilerde daha belirgindi.

PNM grubunun ASK'sinde yerleşik mikrogliaların kontrol grubuna benzer dallanmış olması dişilerde belirgindi.

Diğer bulgular her iki cinsiyette benzer gözlenmiştir.

### **6.1.5. Genel Sonuçlar**

PNM farelerinde dikkat bozukluğu ile birlikte dorsal PFK'de artmış kortikal kalınlık, NF- $\kappa$ B sinyali ve artmış mikroglial aktivasyon ile ilişkili nöroinflamatuvar değişiklikler saptanmıştır.

PNM farelerinde eşlik eden anksiyete davranışı ile birlikte ventral PFK'de artmış NF- $\kappa$ B sinyali ve artmış mikroglial aktivasyon ile ilişkili nöroinflamatuvar değişiklikler saptanmıştır.

Bu bulgular, PNM'nin DEHB'nin tiplerinden dikkat eksikliği baskın görünümü ile ilişkili olduğunu düşündürmektedir.

## **6.2. Öneriler**

### **6.2.1. Gelecek Çalışmalar İçin Öneriler**

DEHB'nin yüksek kalıtımı bilindiğinden çevresel faktörlere genetik duyarlılık araştırılabilir.

DEHB'nin klinik olarak heterojen olması nedeniyle farklı tiplerini de incelemek için ek davranışsal testler eklenebilir.

Jüvenil dönemde PFK'nin alt bölgelerine özgü farklılıklar değerlendirilirken normal nörogelişimsel süreçlerin yaşa bağlı seyri dikkate alınarak deney prosedürünün zamanlaması planlanabilir.

Daha büyük örneklem grupları ile çalışılarak cinsiyet farklılıkları daha kapsamlı değerlendirilebilir.

Kortikal maturasyonu moleküler düzeyde değerlendirebilmek için daha ileri araştırma teknikleri kullanılmalıdır.

### **6.2.2. Klinik Uygulamalar İçin Öneriler**

DEHB patofizyolojisinde nöroinflamasyonun rolünü doğrulayan bu bulgular, anti-inflamatuvar tedavi yaklaşımlarının araştırılmasını desteklemektedir.

Özellikle erken yaşlarda mikroglial aktivasyon ve kortikal gelişimi düzenleyebilecek terapötik yaklaşımlar değerlendirilmelidir.

### **6.2.3. Toplum Sağlığı İçin Öneriler**

Gebelikte sigara ve nikotin maruziyetinin potansiyel zararları konusunda farkındalık kampanyaları düzenlenmelidir.

Perinatal dönemde sigara kullanımını önleyici politikalar desteklenmelidir.



## 7. KAYNAKLAR

1. Ayano G, Demelash S, Gizachew Y, Tsegay L, Alati R. The global prevalence of attention deficit hyperactivity disorder in children and adolescents: An umbrella review of meta-analyses. *Journal of Affective Disorders*. 2023;339:860-6.
2. Carucci S, Narducci C, Bazzoni M, Balia C, Donno F, Gagliano A, et al. Clinical characteristics, neuroimaging findings, and neuropsychological functioning in attention-deficit hyperactivity disorder: Sex differences. *Journal of Neuroscience Research*. 2023;101(5):704-17.
3. İnci Kenar AN, Herken H. Erişkinde Dikkat Eksikliği ve Hiperaktivite Bozukluğu. *Türkiye Klinikleri Child Psychiatry-Special Topics*. 2015;1(1):39-45.
4. Yu M, Gao X, Niu X, Zhang M, Yang Z, Han S, et al. Meta-analysis of structural and functional alterations of brain in patients with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Frontiers in Psychiatry*. 2023;13:1070142.
5. Cortese S. The neurobiology and genetics of attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD): what every clinician should know. *European Journal of Paediatric Neurology*. 2012;16(5):422-33.
6. Shaw P, Eckstrand K, Sharp W, Blumenthal J, Lerch J, Greenstein D, et al. Attention-deficit/hyperactivity disorder is characterized by a delay in cortical maturation. *Proceedings of The National Academy of Sciences*. 2007;104(49):19649-54.
7. Shaw P, Gilliam M, Liverpool M, Weddle C, Malek M, Sharp W, et al. Cortical development in typically developing children with symptoms of hyperactivity and impulsivity: support for a dimensional view of attention deficit hyperactivity disorder. *American Journal of Psychiatry*. 2011;168(2):143-51.
8. Cortese S, Kelly C, Chabernaud C, Proal E, Di Martino A, Milham MP, et al. Toward systems neuroscience of ADHD: a meta-analysis of 55 fMRI studies. *American Journal of Psychiatry*. 2012;169(10):1038-55.
9. Mehta TR, Monegro A, Nene Y, Fayyaz M, Bollu PC. Neurobiology of ADHD: a review. *Current Developmental Disorders Reports*. 2019;6:235-40.
10. Dunn GA, Nigg JT, Sullivan EL. Neuroinflammation as a risk factor for attention deficit hyperactivity disorder. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 2019;182:22-34.
11. Anand D, Colpo GD, Zeni G, Zeni CP, Teixeira AL. Attention-deficit/hyperactivity disorder and inflammation: what does current knowledge tell us? A systematic review. *Frontiers in Psychiatry*. 2017;8:228.
12. Chan YL, Oliver BG, Chen H. What lessons have we learnt about the impact of maternal cigarette smoking from animal models? *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 2020;47(2):337-44.

13. Ugarte G, Piña R, Contreras D, Godoy F, Rubio D, Rozas C, et al. Attention Deficit-Hyperactivity Disorder (ADHD): From Abnormal Behavior to Impairment in Synaptic Plasticity. *Biology*. 2023;12(9):1241.
14. Contreras D, Piña R, Carvallo C, Godoy F, Ugarte G, Zeise M, et al. Methylphenidate restores behavioral and neuroplasticity impairments in the prenatal nicotine exposure mouse model of ADHD: evidence for involvement of AMPA receptor subunit composition and synaptic spine morphology in the Hippocampus. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23(13):7099.
15. Cowan M, Petri Jr WA. Microglia: immune regulators of neurodevelopment. *Frontiers in Immunology*. 2018;9:2576.
16. Mordelt A, de Witte LD. Microglia-mediated synaptic pruning as a key deficit in neurodevelopmental disorders: Hype or hope? *Current Opinion in Neurobiology*. 2023;79:102674.
17. Stahl SM. *Stahl's essential psychopharmacology: neuroscientific basis and practical applications*: Cambridge university press; 2021.
18. Weyandt LL, Iwaszuk W, Fulton K, Ollerton M, Beatty N, Fouts H, et al. The internal restlessness scale: performance of college students with and without ADHD. *Journal of Learning Disabilities*. 2003;36(4):382-9.
19. Dulcan MK. *Dulcan's textbook of child and adolescent psychiatry*: American Psychiatric Pub; 2021.
20. Krone B, Newcorn JH. Comorbidity of ADHD and anxiety disorders. *Attention-deficit Hyperactivity Disorder in Adults and Children*. 2015;98.
21. Levman J, Forgeron C, Shiohama T, MacDonald P, Stewart N, Lim A, et al. Cortical thickness abnormalities in attention deficit hyperactivity disorder revealed by structural magnetic resonance imaging: Newborns to young adults. *International Journal of Developmental Neuroscience*. 2022;82(7):584-95.
22. Sarabin E, Harkness K, Murias K. The relationship between cortical thickness and executive function measures in children with and without ADHD. *Journal of Attention Disorders*. 2023:10870547231174036.
23. Almeida Montes LG, Prado Alcántara H, Martínez García RB, De La Torre LB, Avila Acosta D, Duarte MG. Brain cortical thickness in ADHD: age, sex, and clinical correlations. *Journal of Attention Disorders*. 2013;17(8):641-54.
24. Sciberras E, Mulraney M, Silva D, Coghill D. Prenatal risk factors and the etiology of ADHD—review of existing evidence. *Current Psychiatry Reports*. 2017;19:1-8.
25. Hess JL, Akutagawa-Martins GC, Patak JD, Glatt SJ, Faraone SV. Why is there selective subcortical vulnerability in ADHD? Clues from postmortem brain gene expression data. *Molecular Psychiatry*. 2018;23(8):1787-93.
26. Donfrancesco R, Nativio P, Di Benedetto A, Villa MP, Andriola E, Melegari MG, et al. Anti-Yo antibodies in children with ADHD: first results about serum cytokines. *Journal of Attention Disorders*. 2020;24(11):1497-502.

27. Oades RD, Dauvermann MR, Schimmelmann BG, Schwarz MJ, Myint A-M. Attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD) and glial integrity: S100B, cytokines and kynurenine metabolism-effects of medication. *Behavioral and Brain Functions*. 2010;6:1-14.
28. Oades RD, Myint A-M, Dauvermann MR, Schimmelmann BG, Schwarz MJ. Attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD) and glial integrity: an exploration of associations of cytokines and kynurenine metabolites with symptoms and attention. *Behavioral and Brain Functions*. 2010;6:1-19.
29. Oades RD. An exploration of the associations of pregnancy and perinatal features with cytokines and tryptophan/kynurenine metabolism in children with attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD). *ADHD Attention Deficit and Hyperactivity Disorders*. 2011;3:301-18.
30. O'Shea TM, Joseph RM, Kuban KC, Allred EN, Ware J, Coster T, et al. Elevated blood levels of inflammation-related proteins are associated with an attention problem at age 24 mo in extremely preterm infants. *Pediatric Research*. 2014;75(6):781-7.
31. Hariri M, Djazayeri A, Djalali M, Saedisomeolia A, Rahimi A, Abdollahian E. Effect of n-3 supplementation on hyperactivity, oxidative stress and inflammatory mediators in children with attention-deficit-hyperactivity disorder. *Malaysian Journal of Nutrition*. 2012;18(3).
32. Mittleman BB, Castellanos FX, Jacobsen LK, Rapoport JL, Swedo SE, Shearer GM. Cerebrospinal fluid cytokines in pediatric neuropsychiatric disease. *Journal of Immunology (Baltimore, Md: 1950)*. 1997;159(6):2994-9.
33. McCusker RH, Kelley KW. Immune–neural connections: how the immune system's response to infectious agents influences behavior. *Journal of Experimental Biology*. 2013;216(1):84-98.
34. Becher B, Spath S, Goverman J. Cytokine networks in neuroinflammation. *Nature Reviews Immunology*. 2017;17(1):49-59.
35. Meltzer A, Van de Water J. The role of the immune system in autism spectrum disorder. *Neuropsychopharmacology*. 2017;42(1):284-98.
36. Karatas H, Erdener SE, Gursoy-Ozdemir Y, Lule S, Eren-Koçak E, Sen ZD, et al. Spreading depression triggers headache by activating neuronal Panx1 channels. *Science*. 2013;339(6123):1092-5.
37. McAfoose J, Baune B. Evidence for a cytokine model of cognitive function. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 2009;33(3):355-66.
38. Aarsland TIM, Landaas ET, Hegvik T-A, Ulvik A, Halmøy A, Ueland PM, et al. Serum concentrations of kynurenines in adult patients with attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD): a case–control study. *Behavioral and Brain Functions*. 2015;11:1-12.
39. Buske-Kirschbaum A, Schmitt J, Plessow F, Romanos M, Weidinger S, Roessner V. Psychoendocrine and psychoneuroimmunological mechanisms in the comorbidity of atopic eczema and attention deficit/hyperactivity disorder. *Psychoneuroendocrinology*. 2013;38(1):12-23.

40. Leffa DT, Bellaver B, de Oliveira C, de Macedo IC, de Freitas JS, Grevet EH, et al. Increased oxidative parameters and decreased cytokine levels in an animal model of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Neurochemical Research*. 2017;42:3084-92.
41. Kozłowska A, Wojtacha P, Równiak M, Kolenkiewicz M, Huang ACW. ADHD pathogenesis in the immune, endocrine and nervous systems of juvenile and maturing SHR and WKY rats. *Psychopharmacology*. 2019;236:2937-58.
42. Sontag TA, Tucha O, Walitza S, Lange KW. Animal models of attention deficit/hyperactivity disorder (ADHD): a critical review. *ADHD Attention Deficit and Hyperactivity Disorders*. 2010;2:1-20.
43. Whitehorn D, Atwater D, Low W, Gellis J, Hendley E. Independence of blood pressure and locomotor hyperactivity in normotensive and genetically hypertensive rat. *Behavioral and Neural Biology*. 1983;37(2):357-61.
44. Bianchi ME. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *Journal of Leucocyte Biology*. 2007;81(1):1-5.
45. Sama DM, Norris CM. Calcium dysregulation and neuroinflammation: discrete and integrated mechanisms for age-related synaptic dysfunction. *Ageing Research Reviews*. 2013;12(4):982-95.
46. Kéry R, Chen AP, Kirschen GW. Genetic targeting of astrocytes to combat neurodegenerative disease. *Neural Regeneration Research*. 2020;15(2):199-211.
47. Kipnis J, Gadani S, Derecki NC. Pro-cognitive properties of T cells. *Nature Reviews Immunology*. 2012;12(9):663-9.
48. von Arx AS, Dawson K, Lin H-Y, Mattei D, Notter T, Meyer U, et al. Prefrontal microglia deficiency during adolescence disrupts adult cognitive functions and synaptic structures: A follow-up study in female mice. *Brain, Behavior, and Immunity*. 2023;111:230-46.
49. Schalbetter SM, von Arx AS, Cruz-Ochoa N, Dawson K, Ivanov A, Mueller FS, et al. Adolescence is a sensitive period for prefrontal microglia to act on cognitive development. *Science Advances*. 2022;8(9):eabi6672.
50. Wang Y, Hu Z, Liu H, Gu Y, Ye M, Lu Q, et al. Adolescent microglia stimulation produces long-lasting protection against chronic stress-induced behavioral abnormalities in adult male mice. *Brain, Behavior, and Immunity*. 2022;105:44-66.
51. Pöplau JA, Schwarze T, Dorofeikova M, Pochinok I, Günther A, Marquardt A, et al. Reorganization of adolescent prefrontal cortex circuitry is required for mouse cognitive maturation. *Neuron*. 2024;112(3):421-40. e7.
52. Donev R, Thome J. Inflammation: good or bad for ADHD? *ADHD Attention Deficit and Hyperactivity Disorders*. 2010;2:257-66.
53. Russell VA. Overview of animal models of attention deficit hyperactivity disorder (ADHD). *Current Protocols in Neuroscience*. 2011;54(1):9.35. 1-9.. 25.
54. Aoyama Y, Toriumi K, Mouri A, Hattori T, Ueda E, Shimato A, et al. Prenatal nicotine exposure impairs the proliferation of neuronal progenitors, leading to

- fewer glutamatergic neurons in the medial prefrontal cortex. *Neuropsychopharmacology*. 2016;41(2):578-89.
55. Alkam T, Nabeshima T. Prenatal nicotine exposure and impact on the behaviors of offspring. *Neuroscience of Nicotine: Elsevier*; 2019. p. 191-7.
  56. Polli FS, Ipsen TH, Caballero-Puntiverio M, Østerbøg TB, Aznar S, Andreasen JT, et al. Cellular and molecular changes in hippocampal glutamate signaling and alterations in learning, attention, and impulsivity following prenatal nicotine exposure. *Molecular Neurobiology*. 2020;57:2002-20.
  57. Polli FS, Scharff MB, Ipsen TH, Aznar S, Kohlmeier KA, Andreasen JT. Prenatal nicotine exposure in mice induces sex-dependent anxiety-like behavior, cognitive deficits, hyperactivity, and changes in the expression of glutamate receptor associated-genes in the prefrontal cortex. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 2020;195:172951.
  58. Schneider T, Ilott N, Brolese G, Bizarro L, Asherson PJ, Stolerman IP. Prenatal exposure to nicotine impairs performance of the 5-choice serial reaction time task in adult rats. *Neuropsychopharmacology*. 2011;36(5):1114-25.
  59. Zhu J, Fan F, McCarthy DM, Zhang L, Cannon EN, Spencer TJ, et al. A prenatal nicotine exposure mouse model of methylphenidate responsive ADHD-associated cognitive phenotypes. *International Journal of Developmental Neuroscience*. 2017;58:26-34.
  60. Zhang L, Spencer TJ, Biederman J, Bhide PG. Attention and working memory deficits in a perinatal nicotine exposure mouse model. *PloS One*. 2018;13(5):e0198064.
  61. Vaglenova J, Birru S, Pandiella NM, Breese CR. An assessment of the long-term developmental and behavioral teratogenicity of prenatal nicotine exposure. *Behavioural Brain Research*. 2004;150(1-2):159-70.
  62. Shacka J, Fennell O, Robinson S. Prenatal nicotine sex-dependently alters agonist-induced locomotion and stereotypy. *Neurotoxicology and Teratology*. 1997;19(6):467-76.
  63. Romero RD, Chen W-JA. Gender-related response in open-field activity following developmental nicotine exposure in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 2004;78(4):675-81.
  64. Chan YL, Saad S, Pollock C, Oliver B, Al-Odat I, Zaky AA, et al. Impact of maternal cigarette smoke exposure on brain inflammation and oxidative stress in male mice offspring. *Scientific Reports*. 2016;6(1):25881.
  65. Caye A, Swanson J, Thapar A, Sibley M, Arseneault L, Hechtman L, et al. Life span studies of ADHD—conceptual challenges and predictors of persistence and outcome. *Current Psychiatry Reports*. 2016;18:1-11.
  66. Bouchatta O, Manouze H, Ba-M'Hamed S, Landry M, Bennis M. Neonatal 6-OHDA lesion model in mouse induces cognitive dysfunctions of attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) during young age. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*. 2020;14:27.

67. Yamashita M, Sakakibara Y, Hall FS, Numachi Y, Yoshida S, Kobayashi H, et al. Impaired cliff avoidance reaction in dopamine transporter knockout mice. *Psychopharmacology*. 2013;227:741-9.
68. Paxinos G, Franklin KB. Paxinos and Franklin's the mouse brain in stereotaxic coordinates: Academic press; 2019.
69. York EM, LeDue JM, Bernier L-P, MacVicar BA. 3DMorph automatic analysis of microglial morphology in three dimensions from ex vivo and in vivo imaging. *Eneuro*. 2018;5(6).
70. Huang L, Wang Y, Zhang L, Zheng Z, Zhu T, Qu Y, et al. Maternal smoking and attention-deficit/hyperactivity disorder in offspring: a meta-analysis. *Pediatrics*. 2018;141(1).
71. Balsevich G, Poon A, Goldowitz D, Wilking JA. The effects of pre-and post-natal nicotine exposure and genetic background on the striatum and behavioral phenotypes in the mouse. *Behavioural Brain Research*. 2014;266:7-18.
72. Polli FS, Kohlmeier KA. Prenatal nicotine exposure in rodents: why are there so many variations in behavioral outcomes? *Nicotine and Tobacco Research*. 2020;22(10):1694-710.
73. Alkam T, Kim H-C, Mamiya T, Yamada K, Hiramatsu M, Nabeshima T. Evaluation of cognitive behaviors in young offspring of C57BL/6J mice after gestational nicotine exposure during different time-windows. *Psychopharmacology*. 2013;230:451-63.
74. Buck JM, Sanders KN, Wageman CR, Knopik VS, Stitzel JA, O'Neill HC. Developmental nicotine exposure precipitates multigenerational maternal transmission of nicotine preference and ADHD-like behavioral, rhythmometric, neuropharmacological, and epigenetic anomalies in adolescent mice. *Neuropharmacology*. 2019;149:66-82.
75. Heath CJ, Horst NK, Picciotto MR. Oral nicotine consumption does not affect maternal care or early development in mice but results in modest hyperactivity in adolescence. *Physiology & Behavior*. 2010;101(5):764-9.
76. Pauly JR, Sparks JA, Hauser KF, Pauly TH. In utero nicotine exposure causes persistent, gender-dependant changes in locomotor activity and sensitivity to nicotine in C57Bl/6 mice. *International Journal of Developmental Neuroscience*. 2004;22(5-6):329-37.
77. Zhu J, Zhang X, Xu Y, Spencer TJ, Biederman J, Bhide PG. Prenatal nicotine exposure mouse model showing hyperactivity, reduced cingulate cortex volume, reduced dopamine turnover, and responsiveness to oral methylphenidate treatment. *Journal of Neuroscience*. 2012;32(27):9410-8.
78. Liu F, Tao X, Pang G, Wu D, Hu Y, Xue S, et al. Maternal nicotine exposure during gestation and lactation period affects behavior and hippocampal neurogenesis in mouse offspring. *Frontiers in Pharmacology*. 2020;10:1569.
79. Loos M, Staal J, Schoffelmeer AN, Smit AB, Spijker S, Pattij T. Inhibitory control and response latency differences between C57BL/6J and DBA/2J mice

- in a Go/No-Go and 5-choice serial reaction time task and strain-specific responsivity to amphetamine. *Behavioural Brain Research*. 2010;214(2):216-24.
80. Rommelse N, Buitelaar JK, Hartman CA. Structural brain imaging correlates of ASD and ADHD across the lifespan: a hypothesis-generating review on developmental ASD–ADHD subtypes. *Journal of Neural Transmission*. 2017;124:259-71.
  81. Le Merre P, Ährlund-Richter S, Carlén M. The mouse prefrontal cortex: Unity in diversity. *Neuron*. 2021;109(12):1925-44.
  82. Shaw P, Szekely E, Banaschewski T, Coghill D, Zuddas A. Insights from neuroanatomical imaging into ADHD throughout the lifespan. *Oxford Textbook of Attention Deficit Hyperactivity Disorder*. 2018:73-81.
  83. Rubia K. ADHD brain function. *Oxford Textbook of Attention Deficit Hyperactivity Disorder*. 2018:62-93.
  84. Rubia K. “Cool” inferior frontostriatal dysfunction in attention-deficit/hyperactivity disorder versus “hot” ventromedial orbitofrontal-limbic dysfunction in conduct disorder: a review. *Biological Psychiatry*. 2011;69(12):e69-e87.
  85. Jung Y, Hsieh LS, Lee AM, Zhou Z, Coman D, Heath CJ, et al. An epigenetic mechanism mediates developmental nicotine effects on neuronal structure and behavior. *Nature Neuroscience*. 2016;19(7):905-14.
  86. Muhammad A, Mychasiuk R, Nakahashi A, Hossain SR, Gibb R, Kolb B. Prenatal nicotine exposure alters neuroanatomical organization of the developing brain. *Synapse*. 2012;66(11):950-4.
  87. Mychasiuk R, Muhammad A, Gibb R, Kolb B. Long-term alterations to dendritic morphology and spine density associated with prenatal exposure to nicotine. *Brain Research*. 2013;1499:53-60.
  88. Samea F, Soluki S, Nejati V, Zarei M, Cortese S, Eickhoff SB, et al. Brain alterations in children/adolescents with ADHD revisited: A neuroimaging meta-analysis of 96 structural and functional studies. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 2019;100:1-8.
  89. Casey BJ, Cannonier T, Conley MI, Cohen AO, Barch DM, Heitzeg MM, et al. The adolescent brain cognitive development (ABCD) study: imaging acquisition across 21 sites. *Developmental Cognitive Neuroscience*. 2018;32:43-54.
  90. Fang Z, Shen G, Amin N, Lou C, Wang C, Fang M. Effects of Neuroinflammation and Autophagy on the Structure of the Blood–Brain Barrier in ADHD Model. *Neuroscience*. 2023;530:17-25.
  91. K. Tayebati S, Tomassoni D, Amenta F. Neuroinflammatory markers in spontaneously hypertensive rat brain: an immunohistochemical study. *CNS & Neurological Disorders-Drug Targets-CNS & Neurological Disorders*. 2016;15(8):995-1000.
  92. Ramon-Duaso C, Gener T, Consegal M, Fernández-Avilés C, Gallego JJ, Castarlenas L, et al. Methylphenidate attenuates the cognitive and mood

- alterations observed in Mbnl2 knockout mice and reduces microglia overexpression. *Cerebral Cortex*. 2019;29(7):2978-97.
93. Coelho-Santos V, Cardoso FL, Leitão RA, Fontes-Ribeiro CA, Silva AP. Impact of developmental exposure to methylphenidate on rat brain's immune privilege and behavior: Control versus ADHD model. *Brain, Behavior, and Immunity*. 2018;68:169-82.
  94. Yokokura M, Takebasashi K, Takao A, Nakaizumi K, Yoshikawa E, Futatsubashi M, et al. In vivo imaging of dopamine D1 receptor and activated microglia in attention-deficit/hyperactivity disorder: a positron emission tomography study. *Molecular Psychiatry*. 2021;26(9):4958-67.
  95. Bai Q, Sun D, Zeng Y, Zhu J, Zhang C, Zhang X, et al. Effect of proinflammatory S100A9 protein on migration and proliferation of microglial cells. *Journal of Molecular Neuroscience*. 2023;73(11):983-95.
  96. Zhang X, Sun D, Zhou X, Zhang C, Yin Q, Chen L, et al. Proinflammatory S100A9 stimulates TLR4/NF- $\kappa$ B signaling pathways causing enhanced phagocytic capacity of microglial cells. *Immunology Letters*. 2023;255:54-61.
  97. Uzay B, Bahadır-Varol A, Hökelekli FÖ, Yılmaz M, Esen EC, Başar K, et al. FGF2 gene's antisense protein, NUDT6, plays a depressogenic role by promoting inflammation and suppressing neurogenesis without altering FGF2 signalling. *The Journal of Physiology*. 2024;602(7):1427-42.
  98. Harry GJ. Microglia during development and aging. *Pharmacology & Therapeutics*. 2013;139(3):313-26.
  99. Nakayama A, Yoshida M, Kagawa N, Nagao T. The neonicotinoids acetamiprid and imidacloprid impair neurogenesis and alter the microglial profile in the hippocampal dentate gyrus of mouse neonates. *Journal of Applied Toxicology*. 2019;39(6):877-87.
  100. Teissier A, Pierani A, editors. Wiring of higher-order cortical areas: Spatiotemporal development of cortical hierarchy. *Seminars in Cell & Developmental Biology*; 2021: Elsevier.
  101. Shabab T, Khanabdali R, Moghadamtousi SZ, Kadir HA, Mohan G. Neuroinflammation pathways: a general review. *International Journal of Neuroscience*. 2017;127(7):624-33.
  102. Liao X, Li Y. Nuclear factor kappa B in autism spectrum disorder: a systematic review. *Pharmacological Research*. 2020;159:104918.
  103. Misiak B, Wojta-Kempa M, Samochowiec J, Schiweck C, Aichholzer M, Reif A, et al. Peripheral blood inflammatory markers in patients with attention deficit/hyperactivity disorder (ADHD): A systematic review and meta-analysis. *Progress in Neuro-psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 2022;118:110581.
  104. Gustafsson HC, Sullivan EL, Battison EA, Holton KF, Graham AM, Karalunas SL, et al. Evaluation of maternal inflammation as a marker of future offspring ADHD symptoms: A prospective investigation. *Brain, Behavior, and Immunity*. 2020;89:350.

## 8. EKLER

### EK-1: Hayvan Deneyleri Etik Kurul Kararı



T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

Sayı : 52338575-28

#### HAYVAN DENEYLERİ ETİK KURUL KARARI

|                                 |  |
|---------------------------------|--|
| TOPLANTI TARİHİ                 | : 23.09.2020 (ÇARŞAMBA)  |
| TOPLANTI SAYISI                 | : 2020/08  |
| DOSYA KAYIT NUMARASI            | : 2020/38  |
| KARAR NUMARASI                  | : 2020/08- 06  |
| ONAY BİTİŞ TARİHİ               | : 23.09.2025   |
| ARAŞTIRMA YÜRÜTÜCÜSÜ            | : Prof. Dr. Emine Eren KOÇAK   |
| HAYVAN DENEYLERİNDE             | : Dr. Sabide Duygu UYGUN(Doktora Tezi), Aslıhan                              |
| GÖREVLİ ARAŞTIRMACILAR          | : Bahadır VAROL  |
| DİĞER YARDIMCI                  | : -  |
| ARAŞTIRMACILAR                  |  |
| ONAYLANAN HAYVAN TÜRÜ ve SAYISI | : 144 Adet C57BL/6 Fare (25-30gr. Erişkin, 18-22gr. Yavru, 21-27gr. Erişkin) |

Üniversitemiz Nörolojik Bilimler ve Psikiyatri Enstitüsü öğretim üyelerinden Prof. Dr. Emine Eren KOÇAK'ın araştırma yürütücüsü olduğu 2020/38 kayıt numaralı "*Nöroinflamasyonun Dikkat Eksikliği Hiperaktivite Bozukluğu Patofizyolojisindeki Rolünün İncelenmesi*" isimli çalışma Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi'ne göre uygun bulunarak oy birliği ile onaylanmasına karar verilmiştir.

Araştırma yürütücüsü en geç, onay bitiş tarih Kurulumuza teslim etmekle yükümlüdür.

1




Prof. Dr. Sema ÇALIŞ  
Etik Kurul Başkanı

## EK-2: Tez Çalışması Orijinallik Raporu

### 14% Genel Benzerlik

Her veri tabanı için çıkarılan kaynaklar da dâhil tüm eşleşmelerin kombine toplamı.

#### Ön Sıradaki Kaynaklar

- 13%  İnternet kaynakları
- 9%  Yayınlar
- 7%  Gönderilen çalışmalar (Öğrenci Makaleleri)

#### Bütünlük Bayrakları

##### İnceleme için 0 Bütünlük Bayrağı

Herhangi bir şüpheli metin manipülasyonu belirlenmedi.

Sistemimizin algoritmaları bir belgede, onu normal bir gönderiden ayırabilecek her türlü tutarsızlığı derinlemesine inceler. Tuhaf bir şey fark edersek incelemeniz için bayrak ekleriz.

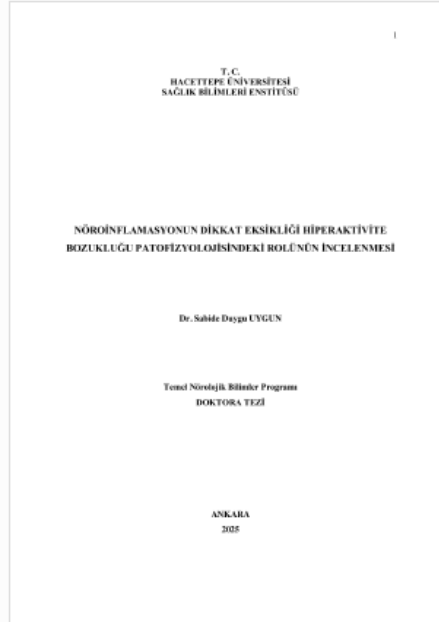
Bir Bayrak mutlaka bir sorun olduğunu göstermez. Ancak daha fazla inceleme için dikkatinizi vermenizi öneririz.

**EK-3: Dijital Makbuz****Dijital Makbuz**

Bu makbuz ödevinizin Turnitin'e ulaştığını bildirmektedir. Gönderiminize dair bilgiler şöyledir:

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen: Sabide Duygu UYGUN  
Ödev başlığı: NÖROİNFLAMASYONUN DİKKAT EKSİKLİĞİ HİPERAKTİVİTE B...  
Gönderi Başlığı: NÖROİNFLAMASYONUN DİKKAT EKSİKLİĞİ HİPERAKTİVİTE B...  
Dosya adı: NÖROİNFLAMASYONUN\_DİKKAT\_EKSİKLİĞİ\_HİPERAKTİVİTE\_...  
Dosya boyutu: 11.47M  
Sayfa sayısı: 65  
Kelime sayısı: 10,352  
Karakter sayısı: 74,824  
Gönderim Tarihi: 24-Oca-2025 09:56ÖÖ (UTC+0300)  
Gönderim Numarası: 2570408481



## 9. ÖZGEÇMİŞ

