

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**FETAL DÖNEMDE DÜŞÜK FREKANSLI (50 HZ)
ELEKTROMANYETİK ALAN MARUZİYETİNİN
YETİŞKİN DÖNEMDEKİ ANKSİYETE DAVRANIŞI VE
ANKSİYETE İLİŞKİLİ GENLER ÜZERİNE OLAN
ETKİSİNİN BELİRLENMESİ**

Hale ÖKSÜZ

**TIBBİ BİYOLOJİ TEZLİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Doç Dr. M. Bertan YILMAZ**

ADANA-2018

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**FETAL DÖNEMDE DÜŞÜK FREKANSLI (50 HZ)
ELEKTROMANYETİK ALAN MARUZİYETİNİN
YETİŞKİN DÖNEMDEKİ ANKSİYETE DAVRANIŞI VE
ANKSİYETE İLİŞKİLİ GENLER ÜZERİNE OLAN
ETKİSİNİN BELİRLENMESİ**

Hale ÖKSÜZ

**TIBBİ BİYOLOJİ TEZLİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Doç Dr. M. Bertan YILMAZ
Doç. Dr. Işıl ÖCAL**

Bu çalışma Çukurova Üniversitesi Araştırma Fonu Tarafından TYL-2017-9881 numaralı proje tarafından desteklenmiştir.

ADANA-2018

KABUL ve ONAY

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Tezli Yüksek Lisans Programı Çerçevesinde yürütülmüş olan

“Fetal Dönemde Düşük Frekanslı (50 Hz) Elektromanyetik Alan Maruziyetinin Yetişkin Dönemdeki Anksiyete Davranışı ve Anksiyete İlişkili Genler Üzerine Olan Etkisinin Belirlenmesi”

adlı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tarihi: 28 / 12 / 18

TEZ SINAV JÜRİSİ


Doç. Dr. M. Bertan YILMAZ
Çukurova Üniversitesi
Başkan


Prof. Dr. Davut ALPTEKİN
Çukurova Üniversitesi
Üye

Dok. Öğr. Üyesi Menderes Yusuf TERZİ
Mustafa Kemal Üniversitesi
Üye



Yukarıdaki Tez, Yönetim Kurulunun 13 /12 /18 tarih ve 41157995.14.05/-174886 sayılı kararı ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Behice DURGUN
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü

ETİK BEYANI

T.C. ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ YÜKSEK LİSANS / DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ETİK BEYANI

Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesini okuduğumu ve anladığımı ve Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde ve ortaya çıkan sonuçlarda herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Tez olarak sunduğum bu çalışmanın özgün olduğunu,

bildirim, aksi bir durumda bu konuda hakkımda yapılacak tüm yasal işlemleri ve aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim. ..28../12../2018

İMZA

Hale ÖKSÜZ

Kayıtlı olunan Program : Tezli Yüksek lisans
Tezin Konusu : Fetal Dönemde Düşük Frekanslı (50 Hz) Elektromanyetik Alan Maruziyetinin Yetişkin Dönemdeki Anksiyete Davranışı ve Anksiyete İlişkili Genler Üzerine Olan Etkisinin Belirlenmesi

Tezin Türü : Yüksek Lisans : Doktora:

Danışmanın Adı-Soyadı : Doç.Dr.M.Bertan YILMAZ
Danışmanın İletişim Bilgileri
Telefon : 322 3386060-3498
E-Posta : mbyilmazcu.edu.tr

Öğrencinin İletişim Bilgileri
Telefon : 5066778363
E-Posta : haleoksuz_90@hotmail.com

Adresi : Gazipaşa mah. 66036 sok.
Ulya apt. k:2 no:7
Seyhan/ADANA

TEŞEKKÜR

Tezimin tüm aşamalarında beni yönlendiren, bana rehberlik eden, yardımcı olan, hiçbir zaman desteğini esirgemeyen ve tüm koşullarda anlayış gösteren kıymetli danışman hocam Sayın Doç.Dr. M. Bertan YILMAZ'a en içten dileklerle saygılarımı sunar, teşekkür ederim.

Bu tez çalışmasının yürütülmesinde yardım ve desteklerini esirgemeyen Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof.Dr. Davut ALPTEKİN'e, yüksek lisans eğitimime katkıda bulunan, değerli zamanlarını benden esirgemeyen anabilim dalımızın değerli öğretim üyeleri Prof.Dr. Ayfer PAZARBAŞI, Prof.Dr. Ümit LÜLEYAP, Prof.Dr. Osman DEMİRHAN, Dr.Öğr.Üye. Perçin PAZARCI, Öğr.Gör.Dr. Sabriye KOCATÜRK SEL'e ve bütün anabilim dalımız çalışanlarına tüm içtenliğimle teşekkür ederim.

Biyofizik Anabilim Dalı'ndan ikinci danışmanım Doç.Dr. Işıl ÖCAL'a ve Fizyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Doç. Dr. Kübra AKILLIOĞLU'na değerli zamanlarını ayırıp, bana rehberlikleri ve her koşulda destekledikleri için tüm içtenliğimle teşekkür ederim.

Tez çalışmamın her aşamasında yardımlarını esirgemeyen sevgili arkadaşlarım; Dr.Arş.Gör. Seda ILGAZ'a ve Arş.Gör. Lutfiye ÖZPAK'a, çalışmamın laboratuvar kısmındaki desteklerinden ötürü Yük. Lis.Öğr. Seray KARAÇAY'a ve Yük. Lis.Öğr. Fatma ÇOBAN'a, Öğr.Gör. Serdar KİLERCİOĞLU, Arş.Gör.M. Tahir HÜSUNET ve Arş.Gör. Mustafa M. ALPARSLAN'a çok teşekkür ederim.

Her zaman arkamda duran, beni her koşulda destekleyen sevgili annem Zühal ÖKSÜZ'e ve babam Metin ÖKSÜZ'e, her durumda olduğu gibi tez çalışmamda da yardımlarını esirgemeyen abim Halil İbrahim ÖKSÜZ'e çok teşekkür ederim.

Bu tez çalışması TYL-2017-9881 numaralı proje ile Ç.Ü. Rektörlüğü Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No:

KABUL ve ONAY	ii
ETİK BEYANI	iii
TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
KISALTMALAR LİSTESİ	x
ÖZET	xii
ABSTRACT	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Elektromanyetik Alan.....	3
2.1.1. Elektromanyetik Alanların Frekansları.....	4
2.1.2. Elektromanyetik Alanların Büyüklüğü ve Birimleri.....	5
2.1.3. Elektromanyetik Alanların Biyolojide Kullanımı.....	6
2.2. Fetal ve Adolesan Dönem Beyin Gelişimi.....	7
2.2.1. Limbik Sistem ve Hipokampus.....	8
2.3. Anksiyete.....	8
2.3.1. Anksiyete Sıklığı.....	10
2.3.2. Anksiyete Tarihi.....	10
2.3.3. Anksiyete Nörobiyolojisi.....	10
2.3.4. Klinikte Anksiyete.....	11
2.3.5. Anksiyete Aday Genleri.....	11
2.3.5.1. 5-hidroksitriptamin reseptör 1A (5-HT1A).....	11
2.3.5.2. BDNF(Beyin Kaynaklı Büyüme Faktörü).....	12
2.3.5.3. Fos geni.....	13
2.3.5.4. Dopamin D1 reseptörü (DRD1A).....	13
2.3.5.5. GRIN1, GRIN2A ve GRIN2D.....	14
2.3.5.6. ADORA1 ve ADORA2A.....	14

3. GEREÇ ve YÖNTEMLER	16
3.1. Etik	16
3.2. Deney Hayvanlarının Bakımları	16
3.2.1. Deney Gruplarının Oluşturulması.....	17
3.2.2. Elektromanyetik Alan Uygulaması.....	18
3.2.3. Yavruların Bakımı	19
3.2.3.1. Yükseltilmiş Artı Labirent Testi.....	19
3.3. Hipokampus Dokularının Alınması	19
3.3.1. Dokudan Rna İzolasyonu.....	20
3.3.2. RNA Konsantrasyonlarının Hesaplanması	21
3.3.3. RNA'dan cDNA Eldesi	21
3.3.4. Real Time PCR	21
3.4. Western Blot Yöntemi.....	23
3.4.1. Dokudan Protein İzolasyonu.....	23
3.4.2. Protein Miktar Tayini.....	23
3.4.3. Jel Hazırlanması, örneklerin jele yüklenmesi ve elektroforez.....	23
3.4.4. Örneklerin Jelden Membrana Aktarılması.....	23
3.4.5. Membranın Bloklanması.....	24
3.4.6. Primer Antikor	24
3.4.7. Sekonder Antikor	24
3.4.8. Görüntüleme	24
3.4.9. Filme Aktarım.....	24
3.5. İstatistiksel Analiz.....	25
4. BULGULAR	26
4.1. Gen Ekspresyon Bulguları	26
4.1.1. C-fos geni.....	26
4.1.2. GRIN2D Geni	27
4.1.3. DRD1A Geni	28
4.1.4. HTR1A Geni.....	29
4.1.5. GRIN1 Geni	30
4.1.6. BDNF Geni	31
4.1.7. ADORA1 Geni	32

4.1.8. GRİN2A Geni.....	33
4.1.9. ADORA2A Geni.....	34
4.2. Western Blot bulguları	35
4.3. Yükseltilmiş Artı Labirent Testi Bulguları	36
5. TARTIŞMA.....	41
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	46
KAYNAKLAR.....	47
ÖZGEÇMİŞ	50



ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil No:</u>		<u>Sayfa No:</u>
Şekil 1.	Elektromanyetik spektrum	5
Şekil 2.	A.Gebe sıçanlar PMA maruziyeti B. Pulslu elektromanyetik alan sistemi C. Faraday Kafesi	18
Şekil 3.	C-fos geninin kontrol gruplarıyla kıyaslamalı sonuçları.	27
Şekil 4.	Grin2d geninin kontrol gruplarıyla kıyaslamalı sonuçları.....	28
Şekil 5.	Drd1a geninin kontrol gruplarıyla kıyaslamalı sonuçları.	29
Şekil 6.	HTR1A geninin kontrol gruplarıyla kıyaslamalı sonuçları.	30
Şekil 7.	GRIN1 geninin kontrol gruplarıyla kıyaslamalı sonuçları.	31
Şekil 8.	BDNF geninin kontrol gruplarıyla kıyaslamalı sonuçları.	32
Şekil 9.	ADORA1 geninin kontrol gruplarıyla kıyaslamalı sonuçları.....	33
Şekil 10.	GRIN2A geninin kontrol gruplarıyla kıyaslamalı sonuçları.	34
Şekil 11.	ADORA2A geninin kontrol gruplarıyla kıyaslamalı sonuçları.	35
Şekil 12.	BDNF Western blot sonuçları.	35
Şekil 13.	Açık kolda geçirilen süreler için yükseltilmiş artı labirent testi değerleri.....	37
Şekil 14.	Merkezde geçirilen süreler için yükseltilmiş artı labirent testi değerleri.....	38
Şekil 15.	Kapalı kolda geçirilen süreler için yükseltilmiş artı labirent testi değerleri.....	38
Şekil 16.	Kapalı kola giriş sıklığı için için yükseltilmiş artı labirent testi değerleri.....	39
Şekil 17.	Ayağa kalkma sıklığı için yükseltilmiş artı labirent testi değerleri	39
Şekil 18.	Merkezde geçirilen süreler için yükseltilmiş artı labirent testi değerleri.....	40
Şekil 19.	Ayağa kalkma sıklığı için yükseltilmiş artı labirent testi değerleri	40

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge No:</u>	<u>Sayfa No:</u>
Çizelge 1. Deney Grupları	17
Çizelge 2. cDNA sentez karışım oranları	21
Çizelge 3. Pcr'daki ısıl döngüler ve süreleri.....	21
Çizelge 4. Real time PCR reaksiyon bileşenleri ve miktarları.....	22
Çizelge 5. Real time PCR için kullanılan gen dizileri	22
Çizelge 6. Yükseltmiş artı labirent t testi sonuçları	36
Çizelge 7. Yükseltmiş artı labirent p değerleri	36



KISALTMALAR LİSTESİ

AACD	: Aromatik aminoasid dekarboksilaz
AC	: Alternatif Akım
ADORA1	: Adenozin reseptör A1
ADORA2A	: Adenozin reseptör A2
AP1	: Aktive edici protein 1
BDNF	: Beyin kaynaklı büyüme faktörü
cAMP	: Siklik Adenozin monofosfat
DC	: Doğru Akım
DEPC	: Di etil prokarbonat
DOPAC	: 3,4 Dihidroksifenilasetik asit
DRD1	: Dopamin reseptör D1
ECG	: Elektrokardiyogram
EEG	: Elektroensefelogram
EMA	: Elektromanyetik alan
GAB	: Genel Anksiyete Bozukluğu
GABA	: Gama amino bütirik asit
GRIN1	: Glutamat iyonotropik reseptörü NMDA tipi alt birim 1
GRIN2A	: Glutamat iyonotropik reseptörü NMDA tipi alt birim 2A
GRIN2D	: Glutamat iyonotropik reseptörü NMDA tip alt birim 2D
HPA	: Hipotalamo hipofiz adrenokortikal aks
IEG	: Acil erken gen
IF	: Ara frekans
LTP	: Uzun vadeli potansiyasyon
MAO-A	: Monoamin oksidaz A
MPFC	: Medial prefrontal korteks
MSS	: Merkezi Sinir Sistemi
NMDA	: N-metil D-aspartat
OKB	: Obsesif Kompulsif Bozukluk
PB	: Panik bozukluğu
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

PMA	: Pulslu Elektromanyetik Alan
PET	: Pozitron emisyon tomografisi
PKC	: Protein Kinaz C
PRF	: Darbeli radyofrekans alanları
RF	: Radyo frekans
SAD	: Sosyal Anksiyete Bozukluğu
TSSB	: Travma Sonrası Stres Bozukluğu
vHPC	: Ventral hipokampus
YAB	: Yaygın Anksiyete Bozukluğu
5-HT	: 5-Hidroksitriptamin, Serotonin
5-HTP	: 5-Hidroksitriptofan
5-HT1A	: 5-Hidroksitriptamin reseptör 1A

ÖZET

Fetal Dönemde Düşük Frekanslı (50 Hz) Elektromanyetik Alan Maruziyetinin Yetişkin Dönemdeki Anksiyete Davranışı ve Anksiyete İlişkili Genler Üzerine Olan Etkisinin İncelenmesi

Çalışmada amacımız gebelik döneminde maruz kalınan pulslu elektromanyetik alanın, yavruların adolesan dönemlerindeki davranışlarına ve hipokampus dokusunda anksiyete ilişkili genlere olan etkilerini moleküler açıdan değerlendirmektir.

Deneyimiz gebe sıçanlardan ve gebe sıçanlardan doğan yavru gruplardan oluşturulmuştur. Gebe gruplar; birinci, ikinci ve üçüncü gebelik haftası boyunca pulslu elektromanyetik alana maruz kalan gruplar ve her üç grup için kontrol gebe gruplarından oluşturulmuştur. Gebe sıçanlardan doğan yavrulardan oluşturulan gruplar ise gebelik süresi boyunca pulslu elektromanyetik alana maruz kalan gebelerden doğan yavru dişi ve erkek gruplar ve aynı grupların hiçbir maruziyeti olmayan kontrol gruplarını içermektedir. Yavruların anksiyete benzeri davranışlarının değerlendirilmesi için yükseltilmiş artı labirent testi uygulanmıştır. Sonrasında tüm grupların hipokampus dokularından RNA izolasyonları gerçekleştirilip, gen ekspresyonları değerlendirilmiştir. Gen ifadesinde anlamlı bir artış saptanan BDNF geninin ise western blot yöntemi ile protein ifadesi de değerlendirilmiştir.

BDNF gen ifadesi için her iki grupta da gen ekspresyonuna paralel şekilde protein ifadesinde de artış gözlenmiştir.

Pulslu elektromanyetik alana maruz bırakılan gebelerden doğan erkek grupta, yükseltilmiş artı labirent testinde anksiyete benzeri davranışlar gözlemlenmiştir. Moleküler düzeyde ise aynı grupta; 5-HT1A, fos, Dopamin D1 reseptörü, Grin1, Grin2a, Grin2d, Adora1 ve Adora2a genlerinin ifadelerinde baskılanma, yalnızca BDNF gen ifadesinde artış gözlenmiştir.

Çalışmamızın sonuçları; elektromanyetik alan maruziyetinin gebelikte dikkat edilmesi gereken bir unsur olduğunu, elektromanyetik alana maruz kalan annelerin çocuklarının anksiyeteye daha duyarlı olabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: BDNF, pulslu elektromanyetik alan, western blot, yükseltilmiş artı labirent

ABSTRACT

Investigation the Effect of Low Frequency (50 Hz) Electromagnetic Field Exposure in the Fetal Period on Anxiety Behavior and Anxiety Related Genes in the in Adulthood

The aim of this study is to evaluate the effects of pulsed electromagnetic field, which is exposed during pregnancy, on behaviors of offspring during adolescence and on anxiety related genes in hippocampus tissue.

Our experimental group consisted of pregnant rats and their offspring. Pregnant groups consist of rats exposed to pulsed electromagnetic fields at the first, second and third weeks of gestation, and controls of these 3 groups. On the other hand offspring groups consist of male and female rats born from pregnant rats exposed to pulsed electromagnetic field during pregnancy and as control group, male and female rats born from pregnant rats not exposed to electromagnetic field during pregnancy. To evaluate the anxiety-like behaviors of the offspring, elevated plus maze test was performed. Then, RNA isolation was performed from hippocampus tissues of all groups and gene expression was evaluated. The protein expression of the BDNF gene, which has a significant increase in gene expression, was evaluated by western blot method.

Anxiety-like behaviors were observed in the elevated plus maze test in the male offspring group, who were born to female rats exposed to pulsed electromagnetic fields during pregnancy. In the same group; suppression of 5-HT1A, fos, Dopamine D1 receptor, Grin1, Grin2a, Grin2d, Adora1 and Adora2a genes and induction of BDNF gene expression were observed.

According to our results; electromagnetic field exposure is an element that should be considered during pregnancy, and it can be suggested that children, whose mothers exposed to electromagnetic fields may be more sensitive to anxiety.

Keywords: BDNF, pulsed electromagnetic field, western blot, elevated plus maze

1. GİRİŞ

Fetus gelişimini şekillendirmede ve sonraki çocuk sağlığı ile hastalık riski göz önünde bulundurulduğunda intrauterin çevrenin önemli bir rol oynadığını yapılan çalışmalarca gösterilmektedir. Fetal beyinde plastisite yüksektir, bu yüzden utero koşullarda meydana gelen yapı ve işlevlerdeki ince değişiklikler bile uzun süreli etkilere sebep olabilir¹.

Gebelikte çevreye bağlı etkilerden biri de elektromanyetik alan maruziyetidir. Elektromanyetik alanlar insan gözünün göremediği fakat çevremizde her yerde bulunan alanlardır². Yeryüzündeki tüm organizmalar yaşamları süresince doğal elektromanyetik alanlara maruz kalmaktadırlar. Güneş aracılığıyla ulaşan elektromanyetik radyasyon dünyada yaşamı destekleyen tek enerji kaynağı olmuştur. Organizmaların evriminde dahi bulunan elektromanyetik dalgalardan iyonize etkisi olan elektromanyetik dalgalar mutasyon ihtimalini yükselterek, genetik farklılaşmanın artmasına destek olmuştur. Yapılan bir çok bilimsel çalışma, elektromanyetik alanların canlı hücrelere, organ sistemlerine, hücre membranlarına etkisi olduğu gibi enzimler üzerine de etkilerinin olduğunu göstermiştir³.

Elektrik yüklü parçacığın boşlukta ivmeli hareketi dolayısıyla birbirine dik manyetik ve elektrik alan bileşenleri meydana gelir. Elektrik alan bileşeni çevrede elektrik yüklerinin varlığında oluşurken, manyetik alan ise elektrik yüklerinin ivmeli hareketi sonucu meydana gelir. Geniş bir spektrumu bulunan sabit olmayan elektrik, manyetik ve elektromanyetik alanlar, iletişim mekanizmalarından TV ve radyo vericilerine, yüksek gerilim hatlarından radarlara, iş yerlerindeki ve evlerdeki elektrikli cihazlardan trafolara kadar bir çok elektrikli sistemden dağılmaktadır. Elektrik alanlar gerilim tarafından oluşturulur ve gerilimin yükselmesiyle artış gösterirler. Elektrik alanlar elektriği taşıyan materyaller tarafından korunabilir veya zayıflatılabilirler, bunun yanısıra manyetik alanların zayıflatılması oldukça zordur³.

Yapılan çalışmalar elektromanyetik alanların canlı hücreleri, organ sistemlerini, enzimleri, iyonları etkilediğini göstermektedir³. Bilimsel çalışmalarda gebelikte elektromanyetik alana maruziyet, maruziyet düzeyine bağlı olarak farklı etkiler göstermektedir; bazı çalışmalarda da fetal kayıplara, fetüsün ve annenin gelişiminde

olumsuzluklara sebep olduğu düşünölmektedir. Fakat elektromanyetik alanın tedavi amaçlı kullanımı da söz konusudur.

Anksiyete bozukluğu; Amerika Birleşik Devletlerinde en çok görölen mental hastalıktır, 18 yaş ve üzeri 40 milyon yetişkini ya da toplumun %18.1'ini etkilemektedir. Anksiyete bozuklukları; beyin kimyası, kişilik yapısı, yaşamsal koşullar ve genetik faktörleride içeren karmaşık risk faktörlerinden gelişir⁴.

Anksiyete; gerilme hissiyatı, endişeli düşünceler ve artan kan basıncı gibi fiziksel belirtilerle karakterize bir duygudur. Anksiyete bozukluğu olan kişiler; genellikle tekrar eden, huzurluksuz veren düşüncelere veya endişelere sahiptirler. Bireylerde titreme, baş dönmesi, hızlı kalp atışı, terleme gibi fiziksel belirtiler olabilir⁵.

Anksiyete bozukluklarının tümü için genetik risk faktörleri belgelendirilmiştir. Klinik genetik çalışmalar anksiyete bozuklukları için kalıtsal tahminlerin oranını %30-67 aralığında göstermektedir⁶.

Duygusal tepkinin oluşmasından sorumlu olan temel beyin yapılarından biri olan hipokampus, çeşitli eksojen ve endojen stresörlere karşı duyarlıdır ve bu nedenle yapısında ve işlevindeki değişiklikler duygudurum bozukluklarının gelişimi için çok önemlidir⁷.

Biz de bu bağlamda çalışmamızda sıçan hipokampus dokusunu tercih ettik. Çalışmamızda deney hayvanı olarak wistar albino türü 12-14 haftalık dişi sıçanlar kullandık. Çalışmamızın amacı; günlük hayatta maruz kaldığımız elektromanyetik alanların gebelikte fetusa etkisinin ileri dönemde beyin hipokampus dokusunda moleküler düzeyde ve davranışsal etkilerini incelemektir. Çalışmamızda önce anksiyete davranışlarını değerlendirip, sonrasında; fos, Grin2d, Drd1a, 5-HT1A, Grin1, BDNF, Adora1, Grin2a, Adora2a genlerinin mRNA ekspresyonlarını ve BDNF'in protein düzeyinde ifadesini inceledik. Ayrıca pulslu elektromanyetik alan maruziyetinin yavru gruplarda yükseltilmiş artı labirent testi ile davranış üzerine etkilerini araştırdık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Elektromanyetik Alan

Elektromanyetik alanların, dalgalar biçiminde ilerleyen enerjisine elektromanyetik ışınım (radyasyon) denir. Elektromanyetik ışınımın en küçük yapıtaşı fotondur, fotonlar bir kütleye sahip değildir. Fotonlar halinde, uzayda ışık hızında yayılırlar. Elektromanyetik dalga, boyu ve dalga şekli, şiddeti ve frekansı ile tanımlanır. Elektromanyetik ışınımında iki dalga tepesi arasındaki mesafe dalga boyu (λ), bir noktadan bir saniyede ilerleyen dalga sayısı ışınımın frekansı (f), Hertz (Hz) ise ışık hızı;

$$c = \lambda \cdot f$$

formülü ile ifade edilir. Burada ışık hızı, $c = 3 \times 10^8$ m/s'dir. Frekans arttıkça dalga boyu kısalmaya ve yayılan enerji yükselmeye başlar.

Elektromanyetik dalgalar, enine dalgalardır ve yüklerin ivmeli hareketi ile oluşurlar. Elektromanyetik dalgalar manyetik ve elektrik alan bileşenlerinden meydana gelir, bu bileşenler dalganın yayılma doğrultusuna ve birbirine diktir. Elektromanyetik dalgalar boşlukta ışık hızı ile yayılır, enerji iletimi sağlar ve yayıldıkları ortama enerji aktarırlar ancak farklı bir ortamda ilerlediklerinde enerjileri, hızları ve enerji aktarımları buldukları ortamın özelliğine göre değişir. Işık ve mekanik dalgalarda gözlemlenen kırılma, kırınım, yansımaya ve girişimin özellikleri elektromanyetik dalgalarda da geçerlidir, ek olarak elektromanyetik dalgalar hem tanecik, hem dalga özelliği taşır.

Genel olarak, EMF terapötik yöntemleri beş grupta kategorize edilebilir:

- 1-Kalıcı manyetik alan,
- 2-Düşük frekanslı sinüs dalgaları,
- 3-Pulslu elektromanyetik alanlar (PMA),
- 4-Darbeli radyofrekans alanlar (PRF),
- 5-Transkraniyal manyetik / elektrik stimülasyonu.

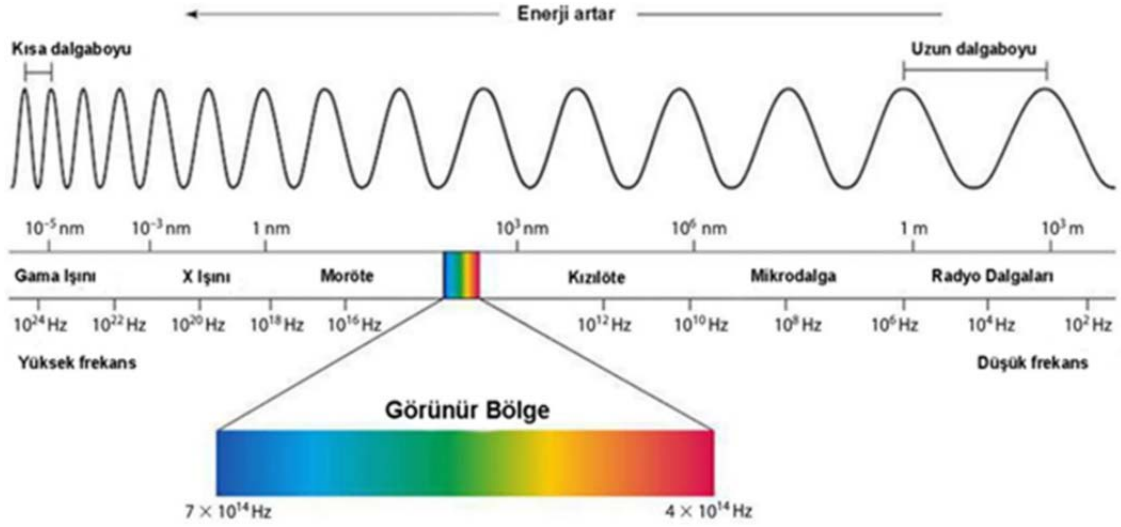
Düşük frekanslı sinüs dalgası elektromanyetik alanları çoğunlukla enerji hatlarında (ABD ve Kanada'da; 60 Hz, Avrupa ve Asya'da; 50 Hz) kullanır. PEMF genellikle çok özel dalga şekilleri ve genliği ile düşük frekanslı alanlardır. Bu nedenle, biyolojik sistemler üzerine manyetik alanların etkileri değerlendirilirken aşağıdaki parametreler göz önünde bulundurulmalıdır:

Uygulanan Elektrik Akımının Cinsi (Doğru Akım (DC), Alternatif Akım (AC)),
Frekans (Düşük Frekans, Yüksek Frekans vb.),
Uygulanan Manyetik Alanın Şekli (Üçgen, Dikdörtgen, Kare vb.),
Manyetik Alanın Şiddeti (Tesla, Gauss, vb.),
Manyetik Alanın Yönü (Dik, Yatay vb.)
Uygulanan Manyetik Alanın Süresi (Akut, Kronik)^{2,3,8}.

2.1.1. Elektromanyetik Alanların Frekansları

Elektromanyetik spektrum süreklidir. Dalgaların frekansı arttıkça enerjileri de yükselir, en düşük enerjili dalga en düşük frekansa sahiptir. Geniş frekans aralıklarına mevcut (0-10²² Hz arasında) elektromanyetik alanlar frekanslarına göre şu şekilde sınıflandırılır; alternatif manyetik alanlar, 0-3000 Hz frekans aralığında değişim gösteren dalgalardır, çok düşük frekanslıdır (ELF); 10⁶-10¹⁰ Hz frekans aralığındaki dalgalar radyo dalgaları (RF), 10¹⁰-10¹² Hz frekansı aralığında bulunan dalgalar mikro; 10¹²-10¹⁵ Hz frekansı aralığında bulunan dalgalar kızılötesi, görünen ışık ve ultraviyole; 10¹⁷ Hz frekansının üzerindeki dalgalar da x-ışını ve gama ışınları olarak adlandırılır³

Radyo Frekans (RF; 10 kHz-300 GHz) aralığında bulunan elektromanyetik dalgalar, baz istasyonları, cep telefonları, radyo ve televizyon yayınlarında kullanılmaktadırlar. Oldukça Düşük Frekans (ELF; 0-300 Hz) aralığı ise trafo, yüksek gerilim hatları, iş yerleri ve evlerde kullanılmaktadır³ (Şekil 1).



Şekil 1. Elektromanyetik spektrum

Sinir ve kaslardaki elektriksel aktiviteler canlıda elektrik akımları oluşturur. Bu akımlar deri üzerinde potansiyel farklar meydana getirirler ve elektrotlarla vücut yüzeyinden ölçülebilirler. Elektrokardiyogram (ECG), kalp tarafından üretilen potansiyel farkların zamanla orantılı çizilmesidir. Elektroensefelogram (EEG), beyin tarafından üretilen potansiyel farkların zamanla orantılı çizilmesidir. Normal havada atmosferin Elektrik alanı 120-150 V/m olurken, şimşekli havalarda 10.000 V/m'ye çıkabilmektedir³.

2.1.2. Elektromanyetik Alanların Büyüklüğü ve Birimleri

Elektrik alan; birim metre başına düşen potansiyel farktır(V; gerilim).Manyetik alan manyetik akı yoğunluğu (B) olarak ölçülür ve birimi “Tesla” dır Yaygın olarak manyetik alan birimi olarak Gauss kavramı kullanılır. 1 Tesla (T) = 10⁴ Gauss (G'dur). Manyetik alan; ortamın manyetik şiddeti (H; A/m) ve ortamın manyetik geçirgenliği (μ) çarpımı ile hesaplanır (B = μH). (Uzayda, canlı dokularında ve havada μ = 4π10⁻⁷ [Henry/m] olarak kabul edilir. Boş alanda akım (amper) taşıyan iletkenin belli bir uzaklıkta (metre) olan manyetik akı yoğunluk vektörünün büyüklüğü aşağıdaki formül ile hesaplanır.

$$B = 2 \times 10^{-7} \frac{I}{r} \text{ (Tesla)} = \frac{2I}{r} \text{ (mili gauss)}$$

Ayrıca $1 \text{ mT}=10^{-3} \text{ T}$ ve $1 \mu\text{T}=10^{-6} \text{ T}$ birimleri de kullanılmaktadır.

Uluslararası Birim Sisteminde (SI) manyetik alan birimi olarak “Gauss” kullanılmaktadır². Yerkürenin DC manyetik alanı ortalama 0,5 Gauss, AC alanı ise 3×10^{-5} Gauss- 10×10^{-5} Gauss arasında değişirken;

Vücudumuzun DC manyetik alanları;

- Kalp kası 3×10^{-7} Gauss
- Abdominal bölge 10^{-6} Gauss
- Akciğerlerde 3×10^{-5} Gauss

AC manyetik alanları ise;

- Beyin dalgaları dinlenimde 10^{-8} G
 - Uyarılmış durumda 10^{-9} G
 - Gözün manyetik alanı 10^{-7} G
 - Kalp kası manyetik alanı 2×10^{-6} G
 - İskelet kası manyetik alanı ise (1-100 Hz) 10^{-7} G şiddetindedir.

Bu değerlerden vücut manyetik alanının 10^{-6} - 10^{-9} G arasında değişkenlik gösterdiği görülmektedir. Dünyanın manyetik alan şiddeti 0.5 Gauss ile kıyaslandığında uyumlu olduğu gözlemlenmektedir. Elektromanyetik alanların görülür şekilde olmaması ve etkilerinin sonradan ortaya çıkması göz ardı edilmektedir. Fakat gelişen teknolojinin ve endüstrileşme gelişimi ile birlikte sağlıklı ve gebe bireylerin elektromanyetik alanlara maruz kalmaları kaçınılmazdır. Bu nedenle, genetik ve çevresel faktörlerle popülasyonda oldukça yaygın ve gün geçtikçe artan anksiyete üzerine maruz kalınan manyetik alanın etkilerini araştırmak üzere çalışmamızı yönlendirdik^{2,3}.

2.1.3. Elektromanyetik Alanların Biyolojide Kullanımı

Elektromanyetik alanların biyolojik etkilerini araştırabilmek için kullanılan manyetik alan kaynağının kararlı, doğru ve tekrarlanabilen sonuçlar elde etmek için düzenli (uniform) elektromanyetik alan üretilebilmesi gereklidir. Belirlenmiş bir alan içerisinde düzgün elektromanyetik alan meydana getiren, gerekli durumlarda oluşan

elektromanyetik alanın frekansı ve şiddeti ayarlanabilen selenoid ve helmholtz bobinlerinden oluşan sistemler örnektir. Helmholtz bobinlerinden oluşan manyetik alan kaynağı biyolojik çalışmalarda genellikle kullanılmaktadır³.

2.2. Fetal ve Adolesan Dönem Beyin Gelişimi

Gelişen beyinde plastisite yüksektir ve ana beyin yapılarının farklılaşmasının büyük çoğunluğunun doğum öncesi yaşam sırasında gerçeklediği için fetal programlama etkisine duyarlıdır. Beynin uzun süren gelişim süreci (embriyonik yaşamdan doğuma ve ergenlik) göz önüne alındığında, embriyonik ve fetal yaşam boyunca beyin yapısında ve işlevinde meydana gelebilecek küçük değişiklikler giderek artarak, zamanla beyin anatomisini ve bağlanabilirliği, ruhsal özellikle fizyolojik sağlığını etkiler. Doğum öncesi ortamın bu etkileri, postnatal ortamın erken dönemlerinde daha da değişiklik gösterebilir ve çocuğun cinsiyetin bir fonksiyonu olarak farklılık gösterebilir. Artan kanıtlar fetus gelişimini şekillendirmede ve sonraki çocuk sağlığı ve hastalık riski göz önünde bulundurulduğunda intrauterin çevrenin önemli bir rol oynadığını göstermektedir. Fetal beyinde plastisite yüksektir, bu yüzden utero koşullarda üretilen yapı ve işlevlerdeki ince değişiklikler bile uzun süreli etkilere sebep olabilir¹.

Adolesan dönem beyin olgunlaşması için kritik bir dönemdir. Bu sırada gelişen rahatsızlıkların merkezi sinir sisteminin yapısal, işlevsel ve davranış çıktılarına nasıl etkilediğini çözmek uzun süren etkileri daha iyi anlamak için önemlidir. Hipokampal nörogenez gelişim sırasında ortaya çıkar ve yaşam boyunca devam eder. Yetişkinlikte, bu yeni hücrelerin hipokampusa entegrasyonu duygusal davranış, bilişsel işlev ve sinirsel plastisite açısından önemlidir. Adolesan dönemde, hipokampusun olgunlaşması ve yüksek hipokampal nörogenez seviyeleri gözlenir ve nörogenezde bu dönemdeki değişiklikler önemlidir⁹.

Hipokampus özellikle adolesan dönemde değişmektedir, artan sayıda granül hücre ve adolesan döneminde kemirgenlerde hipokampal tabakaların genel olarak artan hacmi gösterilmiştir⁹.

Adolesan dönem, hipokampus da dahil olmak üzere birçok beyin yapısının hatırı sayılır bir şekilde yeniden örgütlenmesi ve büyümesinin olduğu yaşamın benzersiz bir dönemini temsil eder. Bu sürede hipokampal nörogenez ile strese bağlı Hipotalamo hipofiz adrenokortikal aks (HPA) ve inflamatuvar yanıtta bir artış vardır. Bu nedenle,

yaşamın bu dönemindeki stres, hipokampüste yetişkinlikte de sürebilen farklı ve uzun süreli zararlı değişikliklerin oluşumuna neden olabilir⁹.

2.2.1. Limbik Sistem ve Hipokampus

Limbik sistemin ana etkileşimli yapıları arasında prefrontal korteks, singulat korteks, amigdaloid nükleer kompleks, limbik talamus, hipokampal oluşum, nükleus akumbens (limbik striatum), ön hipotalamus, ventral tegmental bölge, orta beyin raphe çekirdeği ile ön beyin için çıkıntı yapan limbik orta beyin sisteminin serotonerjik bileşenleri bulunur¹⁰.

Limbik sistem gibi evrimsel olarak daha eski beyin sistemleri, duygusal işlemenin temel yönlerine aracılık etmektedir. Filogenetik olarak daha yeni beyin sistemlerinde karmaşık davranışları düzenlemek için ilgili ve motivasyonel bilgi sağlamaktadır¹⁰. Limbik fonksiyonun bozukluğu ve HPA düzenlenmesindeki sorunlar, duygudurum bozukluklarının temel özellikleridir¹¹.

Hareketlerin davranışlara çevirilmesinde kritik görevi olan limbik sistem, hipokampus üzerinden pekçok sinyal alır. Hipokampus, lateral ventrikülde aşağı yüzey boyunca yer alan gri cevher tabakasından oluşur¹². Duygusal tepkinin oluşmasından sorumlu temel beyin yapılarından biridir⁷. Beyindeki pekçok alan ile subkortikal bölgeler vasıtasıyla etkileşim halindedir¹². Epizodik bellek için, zaman ve mekanda çok modlu duygusal bilginin birleştiricisi olarak merkezi bir rol oynar. Böylece, epizodik anıların bağlamsal ortamını ve özgünlüğünü belirler¹³.

Hipokampus, korku ve kaygı ile ilgili davranışların modülasyonunda da rol oynar¹⁷. Hipokampus, septum ile büyük ölçüde birbirine bağlıdır ve kaygıya ilişkili bölgeler locus coeruleus, raphe çekirdek, hipotalamus, amigdala ve medial frontal korteks ile ana bağlantılara sahiptir. Dorsal hipokampusun mekansal görevlerin öğrenilmesinde ve hafızaya alınmasında hayati bir rol oynadığı bilinirken, ventral hipokampus daha çok korku ve endişenin modülasyonunda rol oynar¹⁴.

2.3. Anksiyete

Anksiyete; gerilme hissiyatı, endişeli düşünceler ve artan kan basıncı gibi fiziksel belirtilerle karakterize bir duygudur. Anksiyete bozukluğu olan bireyler; genellikle tekrar eden, huzurluksuz veren düşüncelere veya endişelere sahiptirler; bu

kişilerde titreme, başdönmesi, hızlı kalp atışı, terleme gibi fiziksel belirtiler gözlemlenebilir⁵.

Kaygı; belirsizliğin, korku ve korku duygusunun yıkıcı etkileriyle karakterizedir. Diğer bir deyişle kaygı, gelecekteki bir tehdidin öngörülmesi olarak tanımlanır. Anksiyete, kişinin uzun süreli olumsuz durumlara veya uzak tehditlere hazırlanmalarına yardımcı olan uyarlamalı bir hayat kurtarıcı yanıt olabilir. Bununla birlikte, patolojik kaygı, aşırı ya da gelişimsel olarak uygun sürelerin ötesine geçmektedir¹⁵.

Anksiyete bozuklukları kroniktir, hem bireyler hem de toplum üzerine muazzam maliyetler getirir¹⁶. Anksiyete bozuklukları; beyin kimyası, kişilik yapısı, yaşamsal koşullar ve genetik faktörleride içeren karmaşık risk faktörlerinden gelişir⁴.

Agorafobi veya Agorafobisiz panik bozukluğu (PB), yaygın anksiyete bozukluğu (YAB) ve sosyal anksiyete bozukluğu (SAD) en sık görülen ruhsal bozukluklar olup, sağlık bakım maliyetleri, istihdam durumu ve sosyal işlevsellik ile ilişkilidir¹³. Özellikle, nüfusun yaklaşık %40'ının yaşamları boyunca bir anksiyete bozukluğundan etkilendiği ve nüfusun %14–18'inin her yıl anksiyete bozukluğu yaşadığı tahmin edilmektedir. Bu nedenle, kaygı yaşayan insanların ihtiyaçlarını karşılamak büyük önem taşımaktadır¹⁷.

Kaygı (Anksiyete) Bozuklukları Dsm5-Mental Bozuklukların Tanısal ve İstatistiksel El Kitabında;

- Seçici Konuşmazlık (Mutizm),
- Özgül Fobi,
- Panik Bozukluğu,
- Başka Bir Sağlık Durumuna Bağlı Kaygı Bozukluğu,
- Panik Atağı Belirleyicisi,
- Toplumsal Kaygı Bozukluğu,
- Yaygın Kaygı Bozukluğu,
- Ayrılma Kaygısı Bozukluğu,
- Tanımlanmamış Kaygı Bozukluğu,
- Agorafobi,
- Tanımlanmış Diğer Bir Kaygı Bozukluğu ve
- Maddenin/İlacın Yol Açtığı Kaygı Bozukluğu olarak sınıflandırılmıştır¹⁸.

2.3.1. Anksiyete Sıklığı

National Comorbidity Survey–Replication'ın çalışmasına göre; her üç kadından biri hayatında bir kere anksiyete bozukluğundan etkilenmektedir¹⁹.

Geniş popülasyon temelli anketlerdeki bilgilere göre; nüfusun %33.7'den fazlası, hayatı boyunca bir anksiyete bozukluğundan etkilenmektedir. Kesişen kültürel karşılaştırmalarda, yayılım oranları büyük ölçüde değişkendir. Bu heterojenitenin kültürel etkilerden çok metodolojideki farklılardan kaynaklanması olasıdır¹⁹.

Amerika Birleşik Devletlerinde en çok görülen mental hastalık anksiyete bozukluğudur; 18 yaş ve üzeri 40 milyon yetişkini yada toplumun %18.1'ini etkilemektedir⁴.

Bu bozukluklar batı ülkelerinde yaygındır ve Çin gibi Asya ülkelerinde daha az görülmektedir. 30 Avrupa ülkesini kapsayan 3 yıllık multimetod çalışmasına göre, toplam nüfusun %14'ü anksiyete bozukluklarından muzdariptir¹⁶. Anksiyete bozuklukları kronik seyir takip eder, fakat; ileri yaşta yayılım oranlarında doğal azalma vardır. Anksiyete bozuklukları, diğer mental bozukluklarla ve diğer anksiyete bozuklukları ile yüksek komorbidite gösterir¹⁹.

2.3.2. Anksiyete Tarihi

Eski Yunan ve Latin araştırmacılar, patolojik kaygı vakalarını yayınlayarak onları tıbbi bozukluklar olarak tanımladılar. 19. yüzyıl ortalarında anksiyete bozuklukları vakası tıbbi yazılarda rapor edilmiştir¹⁶. Freud, DSM-I ve DSM- II'de çeşitli kaygı bozuklukları için kullanılan terimler geliştirmiştir. DSM-III panik bozukluk, Genel Anksiyete Bozukluğu (GAD) ve Travma Sonrası Stres Bozukluğu (TSSB) gibi yeni terimler getirmiştir. DSM-5'in ana katkısı anksiyete bozukluklarının ortak özelliklerin paylaşılmasına dayanan üç spektraya [anksiyete, Obsesif Kompulsif Bozukluk ve travma ve stresle ilişkili bozukluklar] ayırması ve gelişimsel olarak bağlantılı bozuklukların aynı bölümde gruplandırılmasıdır²⁰.

2.3.3. Anksiyete Nörobiyolojisi

Nörobiyolojik düzeyde anksiyete bozuklukları, insan beyninin dış dünyadan algıladığı potansiyel olarak tehdit edici uyarıların akışını işlemeye hizmet eden yüksek derecede birbirine bağlı devreler arasındaki bozulmadan kaynaklanır. Bu devreler

arasında herhangi bir yerdeki karışıklık, tüm sistemde bir dengesizliğe yol açarak, sinirsel duyu bilgilerinin tehdit edici olarak yanlış yorumlanmasına ve anksiyete bozukluklarında gözlenen uygunsuz duygusal ve davranışsal tepkilere yol açabilir¹⁶.

Kısaca anksiyete, çeşitli beyin bölgeleri arasındaki hasarlı etkileşimlere bağlıdır: Medial prefrontal korteks (mPFC) ve ventral hipokampus (vHPC), amigdala ve stria terminalisin (BNST) temel nükleusu ile koordine bir şekilde hareket eder ve hem kemirgenlerde hem de insanlarda anksiyeteyi kontrol eden birbirine bağlı yapıların dağılmış ağını oluşturur¹⁶.

2.3.4. Klinikte Anksiyete

Sık görülen tıbbi şikayetler, çarpıntı, titreme, hazımsızlık, uyuşukluk/karınalanma, sinirlilik, nefes darlığı, diyforez ve korku gibi bir kaygı bozukluğunun belirtileri olabilir. Bu belirtilerin anksiyete bozukluğundan kaynaklandığını düşünmek için, klinisyenin kardiyovasküler, pulmoner ve nörolojik hastalıklar dahil olmak üzere belirli tıbbi durumları elimine etmesi önemlidir¹⁵. Belirli bir olaya tipik bir cevapta, yoğunluk ve süre beklenilenin ötesine uzandığında kaygı bir bozukluk haline gelir. Anksiyete bozukluklarının çoğu için minimum süre 6 aydır ve şiddet, gerçek tehdit düzeyine orantısız olarak kabul edilir. Anksiyete, depresyon, travma sonrası stres bozukluğu ve obsesif kompulsif bozukluk gibi diğer psikiyatrik hastalıklarda tanınan bir belirti olabilir. Kadınlar erkeklerin yaklaşık iki katı oranında patolojik kaygı yaşarlar¹⁵.

2.3.5. Anksiyete Aday Genleri

Çalışmamızda anksiyetede aday olduğu düşünülen; fos, Grin2d, Drd1a, Htr1a, Grin1, BDNF, Adora1, Grin2a, Adora2a genlerini çalışmayı amaçladık.

2.3.5.1. 5-hidroksitriptamin reseptör 1A (5-HT1A)

5-hidroksitriptamin (5-HT, serotonin) birçok hastalık durumunun etiyolojisinde ve özellikle depresyon, anksiyete, şizofreni, yeme bozuklukları, OKB ve PB gibi ruhsal hastalıklarda rol oynamaktadır²¹.

5-HT triptofan aminoasitinden sentezlenmektedir. Sentezdeki ilk aşama, triptofanın, triptofan hidroksilaz enzimi tarafından 5-hidroksitriptofan (5-HTP) 'ye dönüştürülmesidir. Aromatik aminoasit dekarboksilaz (AACD), daha sonra 5-HTP'yi 5-

HT'ye dönüştürür. 5-HT salınımı ekzositoz ile Ca^{+2} 'ya bağımlı gerçekleşir. 5-HT salınımından sonra, sinapta 5-HT'nin etkileri, serotonerjik nöronların plazma membranı üzerinde bulunan 5-HT taşıyıcıları tarafından sona erdirilir, bunlar 5-HT'yi serotonerjik nöronlara geri alır. 5-HT katabolizması monamin oksidaz A (MAO-A) ile gerçekleşir²².

5-HT'yi sentezleyen nöronlar, en belirginleri raphe nükleus olan beyin sapının orta çizgisi boyunca birçok çekirdekte kümelenir. Bu nöronların aksonları, merkezi sinir sisteminin hemen hemen tüm bölgelerini innerve eder ve böylece uyku / uyanıklık döngüsü, besin alımı, cinsel davranış, duygusal durum ve bilişsel süreçler, özellikle öğrenme ve hafıza, gibi çok çeşitli davranışları etkiler²². 5-HT sistemi ile ilgili çalışmalar, çeşitli 5-HT reseptörlerinin (5-HT1 ila 5-HT7) tanımlanması, sınıflandırılması ve klonlanmasında yarar sağlamıştır²³. Konum algılanmasında merkezi bir role sahip olan hipokampus, özellikle 1A reseptörü (5-HT1A) alt tipinin yüksek konsantrasyonda serotonin reseptör bağlanma bölgeleri ile karakterize edilir²².

5-HT1A reseptör alt tipi, farede 13. kromozomunun insanda ise 5. kromozomu (5q11.2-q13) distal kısmında bulunan intron içermeyen, 422 amino asitlik bir protein kodlayan genden meydana gelmektedir²¹.

Reseptör, proteinin N terminal bölgesinde yer alan N glikozilasyon bölgeleri ile protein kinaz C (PKC) tarafından fosforillenme için gereken ikinci ve üçüncü hücre içi döngülerinde bulunan konsensüs bölgeleri ile tipik bir G-protein eşlenikli bir reseptör yapısına sahiptir²¹.

5-HT1A reseptörünü kodlayan genin promotöründeki A C(-1019)G polimorfizmi, sürekli anksiyete, depresyon ve kronik antidepresan tedaviye yanıt dahil olmak üzere çeşitli duygudurumla ilişkili değişkenlerle ilişkilidir²⁴.

2.3.5.2. BDNF(Beyin Kaynaklı Büyüme Faktörü)

BDNF sinir sistemi gelişimi ve plastisitesinde çok sayıda görevi olan nörotrofin ailesinden salgılanan bir proteindir.

Çeşitli çevresel uyaranlara maruz kaldığında, ilgili aktifleşmiş beyin bölgelerinde BDNF mRNA'nın indüklenmiş ekspresyonu, BDNF transkripsiyon indüksiyonunun, nöral fonksiyonun çevresel modülasyonu için yaygın bir mekanizma olabileceğini düşündürmektedir. BDNF seviyelerini veya BDNF sekresyonunu kısmen azaltan mutasyonların beyin gelişimi ve plastisitesi üzerinde önemli etkileri vardır.

Memeli Bdnf geni, gelişme sırasında, beyin bölgeleri ve farklı hücre tiplerinde farklı olarak kullanılan en az sekiz alternatif promotora sahip dokuz ekzondan oluşur²⁵.

2.3.5.3. Fos geni

C-fos geni, transkripsiyon faktörü Aktive edici protein 1(AP-1)'i oluşturmak için Jun ailesinin transkripsiyon faktörleri ile dimerize olan Fos proteinini kodlar²⁶. Herhangi bir teknikte olduğu gibi, ilgili nöro-devre sistemini tanımlamak için Fos'in bir etkinlik markeri olarak kullanılmasının fayda ve kısıtlamalarını anlamak gerekir. Bu sebeple, bu yaklaşımın avantaj ve dezavantajları tartışılmaktadır. Acil erken gen c-fos ve onun protein ürünü Fos, yaklaşık 30 yıldır aktivite belirteçleri olarak kullanılmıştır ve c-fos, ilk tanımlayıcı acil erken genlerden (IEG) biridir²⁷.

Fos proteininin başlıca işlevi, lösin fermuar motifi aracılığıyla, geç genlerin transdüksiyonuyla ilişkili olan Jun protein ailesinin üyeleri ile indüklenebilir bir transkripsiyon faktörü AP1 oluşmasıyla sonuçlanır. Fos, merkezi sinir sistemindeki çoğu hücre tipinde eksprese edilir.

Bazal koşullar altında, c-fos mRNA ve proteini, beyin bölgelerinin çoğunda, çok düşük seviyelerde ifade edilir. Bununla birlikte, c-fos ve Fos, periferik mekanik ve elektriksel uyarım, ağrı, iltihaplanma, stres, nöroendokrin ve nöropeptid sinyaller, nöronal depolarizasyon, nörotrofik faktörler, nörotransmitterler ve hücre içi Ca⁺² düzeylerindeki artışlar dahil olmak üzere çeşitli uyaranlara yanıt olarak hızla uyarılır²⁷.

C-fos geni, geniş bir uyarıcı yelpazesi tarafından uyarılır ve yaygın olarak nöral aktivite için güvenilir bir belirteç olarak kullanılmaktadır²⁸.

2.3.5.4. Dopamin D1 reseptörü (DRD1A)

Dopamin, monoamin oksidaz aracılığı ile sinaps terminalinde ve mitokondride, 3,4-dihidroksifenilasetikasite (DOPAC) metabolize edilir. Dopamin ve metabolitlerinin seviyesi, DOPAC/ dopamin oranı (dopamin döngüsü) ve MAO-A / B aktivitesi de dahil olmak üzere, anksiyete benzeri davranışlarla ilişkilidir¹⁴.

Birçok beyin bölgesi ve farklı nörotransmitterler anksiyetenin gelişimiyle ilişkilidir. Doğal anksiyojenik çevresel uyaranlara davranışsal tepkilerle ilişkili en önemli nörotransmitterlerden biri, kaygı ve korku açısından kritik bir rol oynayan dopamindir¹⁴.

Dopaminerjik nöronlar, dikkat, yönetici hafıza, arzu, hedonik(hazsal) aktiviteler, doğal ödülleri ve hücre sinyali gibi biyolojik aktiviteler dahil olmak üzere çeşitli beyin faaliyetlerinde yer alan dopamin serbest bırakan nöronlardır. Bu etkilerin çoğuna diğer hücre sinyal yollarında görevli dopamin D1 ve D2 benzeri reseptörler aracılık eder²⁹.

Drd1 prefrontal korteks ve striatumda sinaptik plastisite modülasyonunda rol oynar. Drd1 ayrıca, cAMP yanıt elementi (CRE'ler) üzerine etki ederek, siklik adenosin monofosfat (cAMP) ve cAMP yanıt elemanı modülatörü (CREM) yoluyla birkaç genin (örneğin beyin kaynaklı büyüme faktörü geni, BDNF) ekspresyonunu düzenler²⁹.

2.3.5.5. GRIN1, GRIN2A ve GRIN2D

Glutaminerjik Sistem: N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptörleri, bir iyonotropik NMDA-1 (Grin1) alt birimini ve dört Grin2 alt biriminden birini (A, B, C veya D) içerir. NMDA reseptörü, dopamin, norepinefrin (noradrenalin), asetilkolin ve GABA'nın düzenlenmesine katılır. Farmakolojik çalışmalar ve şizofreni benzeri semptomları gösteren hayvan modellerinde yapılan çalışmalarda NMDA reseptörleri Grin1 ve Grin2'nin ekspresyonunda yetersizliğe sahip olan farelerde şizofreni benzeri semptomlar (azalan sosyal aktivite ve artmış basmakalıp davranışlar) gözlenmektedir²⁹.

2.3.5.6. ADORA1 ve ADORA2A

Bir nükleozid olan adenozinin; hipokampus ve bazal gangliada, sinaptik ve sinaptik olmayan geçişlerde, nöral uyarılabilirlikte önemli rolü olmasının yanında, sinaptik plastisitede, hücre ölümünde, uyku ve bilişsel işlevler dahil geniş ölçüde etkili nöromodülatör etkisi olduğu düşünülmektedir. ATP'nin intraselüler ve ekstraselüler parçalanması ile üretilen adenozin, nöronal (glial hücre) ve nöronal olmayan hücrelerden salınması ile adenozin seviyesi artar, bu artış adenozin reseptörlerinin indüklenmelerine sebep olur. Farklı nörotransmitterler bu artıştan farklı şekillerde etkilenirler. Adenozin seviyelerinin artışı ile Adora1 aktif hale gelirken, glutamat, asetilkolin, noradrenalin, 5-HT ve dopaminin de dahil olduğu nörotransmitterlerin çoğunun salınımı inhibe edilir. Adora2a reseptörlerinin uyarılması, glutamat ve asetilkolin salınımını kolaylaştırır ve Gama amino bütirik asit (GABA)'in salınımını engeller³⁰.

GABA erjik sistem çeşitli anksiyete bozukluklarının patogenezinde rol oynamaktadır¹⁶. Adora1 ve Adora2a, presinaptik sinir terminallerinde eksprese edilir ve bu reseptörlerin aktivasyonu, beyindeki glutamat, GABA, dopamin ve asetilkolin dahil olmak üzere hemen hemen tüm nörotransmitterlerin salımını kontrol eder³¹.

Biz de çalışmamızda günlük hayatta maruz kaldığımız elektromanyetik alanların gebelikte fetusa olan etkisinin, ileri ki dönemde beyin hipokampus dokusuna ve davranışa olan etkilerini incelemeyi amaçladık. Çalışmamızda deney hayvanı olarak wistar albino sıçanlar kullanarak, anksiyete davranışlarını değerlendirip, sonrasında; c-fos, Grin2d, Drd1a, 5-HT1A, Grin1, BDNF, Adora1, Grin2a, Adora2a genlerinin ekspresyonlarını ve BDNF'nin protein düzeyinde ifadesini inceledik. Pulsu elektromanyetik alan maruziyetleri sonrası yavru gruplarda yükseltilmiş artı labirent testi uyguladık.

3. GEREÇ ve YÖNTEMLER

3.1. Etik

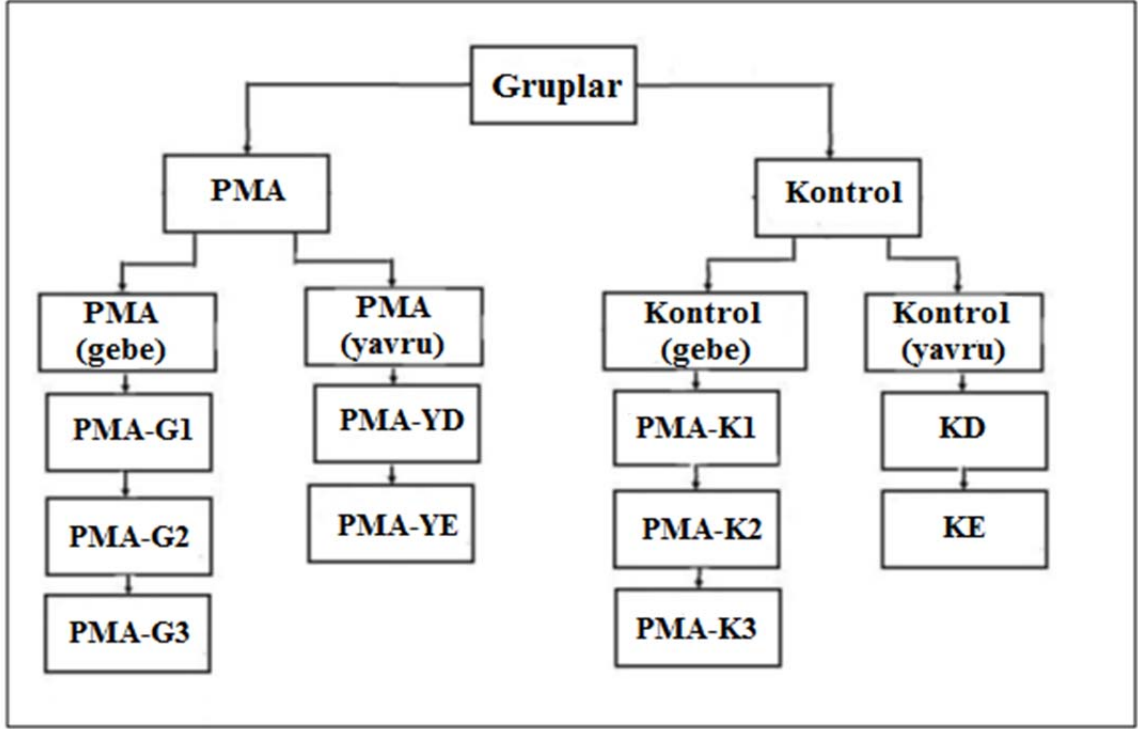
Çalışmamızda kullandığımız 12-14 haftalık dişi ve erkek Wistar albino sıçanlar için Çukurova Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 24.08.2017 tarihli 7. toplantısı ve ikinci karar numarası ile etik kurul belgesi alındı.

3.2. Deney Hayvanlarının Bakımları

Çalışmada 12-14 haftalık dişi ve erkek Wistar albino sıçanlar Çukurova Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezinden (DETAUM) alındı. Sıçanlar önce adaptasyon dönemi için bir hafta laboratuvarda bırakıldı. Sıçanlar, sıcaklığı 22-23°C nemi %40-50 ve aydınlatması 12 saat gece/gündüz olan laboratuvarda deney süresi boyunca yaşatıldı. Odanın havalandırılması ve kafeslerin temizlikleri günlük olarak yapıldı.

Dişi Sıçanlarda Gebelik Olgusunun Oluşturulması: Dişi sıçanlarda gebelik olgusunun oluşturulabilmesi için harem usulü her kafese üç dişi bir erkek sıçan bırakıldı. Daha sonra dişi sıçanların vajinalarında vajinal kopulatuvar plak olup olmadığına bakıldı ve vajinal kopulatuvar plak gözleendiğinde sıçanların gebe olduğu ve gebeliğin 0. günü olarak kabul edildi.

Çizelge 1. Deney Grupları



3.2.1. Deney Gruplarının Oluşturulması

Çizelge 1’de gösterildiği gibi, deney grupları pulslu elektromanyetik alana maruz kalan gruplar (PMA) ve PMA’ya maruz kalmayan kontrol grupları olmak üzere aşağıda açıklamaları verilen 10 gruba ayrıldılar.

PMA grupları kendi içerisinde;

1. Gebeliklerinin ilk haftası boyunca hergün PMA’ya maruz kalan grup (PMA-G1) [n:7],
2. Gebeliklerinin iki haftası boyunca hergün PMA’ya maruz kalan grup (PMA-G2) [n:7],
3. Gebeliklerinin üç haftası boyunca hergün PMA’ya maruz kalan grup (PMA-G3) [n:7] olmak üzere gebe grupları,

Yavru grupları ise;

4. Gebelikteki (prenatal) üç hafta boyunca PMA’ya maruz kalıp doğan dişi grup (PMA-YD) [n:10],

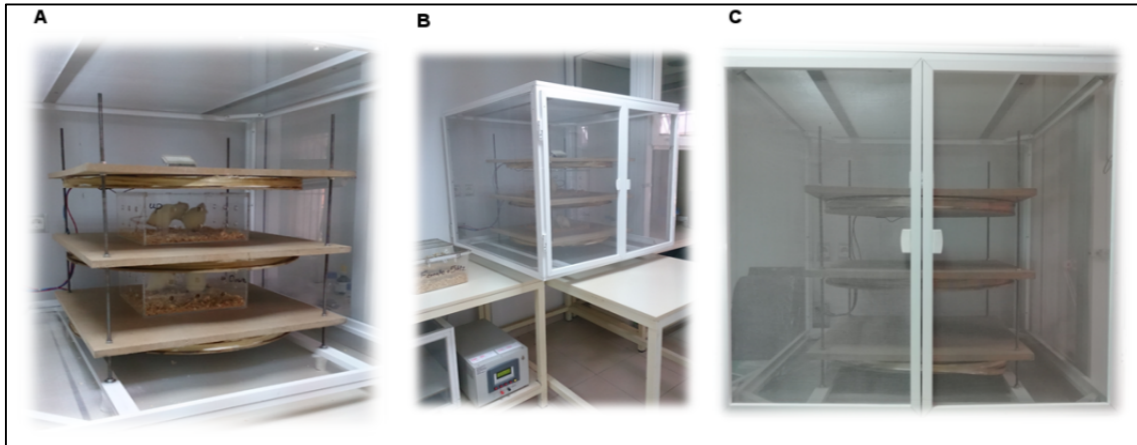
5. Gebelikteki (prenatal) üç hafta boyunca PMA'ya maruz kalıp doğan erkek grup (PMA-YE) [n:10] olarak,

Kontrol Grupları ise;

6. Gebeliklerinin ilk haftası boyunca hiçbir uygulamaya maruz kalmayan grup (PMA-K1) [n:5],
7. Gebeliklerinin iki haftası boyunca hiçbir uygulamaya maruz kalmayan grup (PMA-K2) [n:5],
8. Gebeliklerinin üç haftası boyunca hiçbir uygulamaya maruz kalmayan grup (PMA-K3) [n:5],
9. Gebelikte hiçbir maruziyeti olmayan anneden doğan kontrol erkek grubu (KE) [n:5],
10. Gebelikte hiçbir maruziyeti olmayan anneden doğan kontrol dişi grubu (KD) [n:5] olarak deney grupları ayrıldı.

3.2.2. Elektromanyetik Alan Uygulaması

Gebe sıçanlar gebelik dönemi boyunca helthmotz bobininden yapılmış dikey yönlü, 1.5 mT şiddetinde, 50 Hz frekanslı pulslu elektromanyetik alana her gün günde 2 saat pleksiglastan yapılmış kafeslerde (10:00-12:00 veya 13:00-15:00) maruz bırakıldılar. Gebelik dönemi boyunca ad libitum ve çeşme suyu ile beslendiler (Şekil 2).



Şekil 2. A. Gebe sıçanlar PMA maruziyeti B. Pulslu elektromanyetik alan sistemi C. Faraday Kafesi

3.2.3. Yavruların Bakımı

Doğum sonrası hem manyetik alan uygulamasına maruz kalan, hem de hiçbir uygulamaya maruz kalmayan kontrol gruplarından doğan yavrular laktasyon dönemi boyunca (21 gün) anne bakımında kaldılar, sonrasında yavrular dişi ve erkek olarak farklı kafeslere yerleştirildiler. Yavrulara hiçbir deneysel uygulama yapılmadı. Her kafeste 5-6 yavru hayvan olacak şekilde ayarlandı. Sıçanlar sıcaklığı 22-25°C, nemi % 40-60 ve sirkadian ritme uygun olarak (12saat gece/gündüz) klimatize edilen laboratuvar şartlarında ad libitum ve çeşme suyu ile beslenmeye bırakıldılar. 8-10 hafta gelişimleri takip edildi ve hergün kafeslerin temizlikleri yapıldı.

3.2.3.1. Yükseltilmiş Artı Labirent Testi

Pulsu Elektromanyetik alana gebelik süresi boyunca maruz kalan gebe gruptan doğan dişi ve erkek gruplar (PMA-YD, PMA-YE) ve kontrol grupları (KE, KD) adolesan dönemde yükseltilmiş artı labirent testine tabi tutuldular. Her denek için 5 dk süre ile kayıt alındı.

Açık kolda geçirilen süre, Merkezde geçirilen süre, Kapalı kolda geçirilen süre, Açık kola giriş sıklığı, Kapalı kola giriş sıklığı, Baş kaldırma sıklığı, Ayağa kalkma sıklığı, Total giriş-çıkış sıklıkları kaydedildi.

3.3. Hipokampus Dokularının Alınması

PMA-G1 grubundaki gebe sıçanların bir haftalık PMA maruziyetleri sonrası yükseltilmiş artı labirent testleri yapıldı sonrasında hipokampus dokuları alındı.

PMA-K1 grubundaki gebeliklerinin ilk haftası boyunca hiçbir uygulamaya maruz kalmayan sıçanların yükseltilmiş artı labirent testleri yapıldı sonrasında hipokampus dokuları alındı.

PMA-G2 grubundaki gebe sıçanların iki haftalık PMA maruziyetleri sonrası yükseltilmiş artı labirent testleri yapıldı ve hipokampus dokuları alındı.

PMA-K2 grubundaki gebeliklerinin ilk haftası boyunca hiçbir uygulamaya maruz kalmayan sıçanların yükseltilmiş artı labirent testleri yapıldı sonrasında hipokampus dokuları alındı.

PMA-G3 grubundaki gebe sıçanların ise üç haftalık PMA maruziyetleri sonrası yükseltilmiş artı labirent testleri yapıldı ve hipokampus dokuları alındı.

PMA-K3 grubundaki gebeliklerinin üç haftası boyunca hiçbir uygulamaya maruz kalmayan sıçanların yükseltilmiş artı labirent testleri yapıldı sonrasında hipokampüs dokuları alındı.

PMA-YD grubundaki dişi sıçanların 8-10 haftalık oldukları dönemde yükseltilmiş artı labirent testleri yapıldı ve hipokampüs dokuları alındı.

PMA-YE grubundaki erkek sıçanların 8-10 haftalık oldukları dönemde yükseltilmiş artı labirent testleri yapıldı ve hipokampüs dokuları alındı.

KD grubundaki dişi sıçanların 8-10 haftalık oldukları dönemde yükseltilmiş artı labirent testleri yapıldı ve hipokampüs dokuları alındı.

KE grubundaki erkek sıçanların 8-10 haftalık oldukları dönemde yükseltilmiş artı labirent testleri yapıldı ve hipokampüs dokuları alındı.

Alınan dokular öncelikle sıvı azot içerisinde, sonrasında -80 derecelik dondurucuda saklandı.

3.3.1. Dokudan Rna İzolasyonu

Hipokampüs dokuları (100 mg) buz üzerinde parçalandı ve üzerine Trizol reaktifi 1000µl eklendi.

- 14000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası süpernatant alındı ve süpernatantların üzerine 200µl kloroform eklendi, 10 dakika buz üzerinde bekletildiler ve sonrasında 15 dakika 14000 rpm'de santrifüj edildiler.
- Üstteki RNA sıvısı alındı ve 1:1 oranında izopropanol eklendi.
- Vorteks sonrası 10 dakika buz üzerinde bekletilip sonrasında 15 dakika 14000 rpm'de santrifüj edildiler.
- RNA pelletinin üzerindeki süpernatant atıldı.
- RNA pelletinin üzerine %75'lik Etanol-DEPC (Diethyl prokarbonatlı su) karışımı 1000µl olarak eklendi, 5 dk santrifüj edildi.
- Pelletin üzerine uygun miktarda DEPC'li su eklendi.
- Buz üzerinde 15 dakika sonra pipetajlandı ve çalışmanın sonraki aşamalarında kullanılmak üzere -80°C'de saklandı.

3.3.2. RNA Konsantrasyonlarının Hesaplanması

Dokudan elde edilen RNA'ların konsantrasyonları spektrofotometre cihazında $\mu\text{g/ml}$ düzeyinde ölçüldü ve örnekler ölçüm sonuçlarına göre hazırlandı.

3.3.3. RNA'dan cDNA Eldesi

cDNA sentezi, High capacity cDNA kiti aracılığıyla gerçekleştirildi.

Çizelge 2. cDNA sentez karışım oranları

Bileşenler	Hacimleri
10X RT buffer	2 μl
dNTP	0,8 μl
Random primer	2 μl
Enzim	1 μl
Deiyonize su	4,2 μl
RNA	10 μl
Toplam	20 μl

Reaksiyon termal döngü cihazında;

Çizelge 3. Pcr'daki ısıl döngüler ve süreleri

x1	x2	x1	
25°C	37°C	85°C	4° C
10 dk	60 dk	5 dk	∞

3.3.4. Real Time PCR

cDNA örnekleri ve kullanılan Sybr green floresan işaretli primerler kullanılarak 96 kuyucuklu plate içerisine her gen ve örnek için yükleme yapıldı.

Çizelge 4. Real time PCR reaksiyon bileşenleri ve miktarları

Bileşenler	Hacimler
SyBr Green Mix	12,5 µl
Primer forward	1,25 µl
Primer reverse	1,25 µl
cDNA	2 µl
Deiyonize su	8 µl
Toplam Reaksiyon	25 µl

C-fos, Grin2a ve Grin2d dizileri primer3 programı kullanılarak tasarlandı.

Çizelge 5. Real time PCR için kullanılan gen dizileri

SyBr Green Gen Expression assay	Diziler
Aktin primer forward	5'-TATGCCAACACAGTGCTGTCTGG-3'
Aktin primer reverse ³²	5'-TACTCCTGCTTGCTGATCCACAT-3'
Drd1a primer forward	5'-CATTCTGAACCTCTGCGTGATC-3'
Drd1a primer reverse ³²	5'-GTTGTCATCCTCGGTGTCCTC-3'
BDNF primer forward	5'-GATGAGGACCAGAAGGTTTCG-3'
BDNF primer reverse ³²	5'-GATTGGGTAGTTCGGCATTG-3'
5-HT1A primer forward	5'-CTGTTGCTCATGCTGGTTCTC-3'
5-HT1A primer reverse ³²	5'-CAGAGGAAGGTGCTCTTTGG-3'
Adora1 primer forward	5'-GCTCTGCTCGCCATTGCT-3'
Adora1 primer reverse ³³	5'-GCACCCAGACGAAGAAGTTGA-3'
Adora2a primer forward	5'-CACGCAGAGTTCCATCTTTAGC-3'
Adora2a primer reverse ³³	5'-TTCGTGGAGTTCCCGTCTTT-3'
C-fos primer forward	5'-AAAGTAGAGCAGCTATCTCCTG-3'
C-fos primer reverse	5'-CGTACTTGTCAGCTCCCTCC-3'
Grin1 primer forward	5'-TTCAAGAGGGTGCTGATGTC-3'
Grin1 primer reverse ³⁴	5'-CCATTGTAGATGCCCACTTG-3'
Grin2a primer forward	5'-TACACACCCTGCACCAATTC-3'
Grin2a primer reverse	5'-CCTTGTTTCAGCACGATCACC-3'
Grin2d primer forward	5'-GGGAGAGTCTGCACAGGTAC-3'
Grin2d primer reverse	5'-AGATGACCACCAGTGAAGGG-3'

3.4. Western Blot Yöntemi

3.4.1. Dokudan Protein İzolasyonu

PMA-YD, KD, PMA-YE ve KE gruplarındaki sıçanların hipokampus dokularından protein izolasyonları T-per reaktifi (Thermo Scientific) aracılığıyla gerçekleştirildi. Örneklerin üzerine her 0,1 gr örnek için 2 ml T-per reaktifi eklendi ve doku parçalayıcı cihazında düşük devirde dokuların parçalanması sağlandı. 10000 g de 5 dk santrifüj edildi ve süpernatant olan protein kısım elde edildi, yeni bir tüpe aktarıldı.

3.4.2. Protein Miktar Tayini

PMA-YD, KD, PMA-YE ve KE gruplarındaki sıçanların protein miktar tayini Thermo Scientific, Pierce BCA Protein Assay Kit aracılığı ile yapıldı. 9 farklı konsantrasyon aralığında (2000, 1500, 1000, 750, 500, 250, 125, 25, 0 µg/mL) standartlar hazırlandı. Standartlar ve bilinmeyen örnekler 96 kuyucuklu plate içerisine yüklendi. Her plate kuyucuğuna kitde bulunan (Reagent A ve Reagent B) 50:1 oranında karışım hazırlanarak eklendi. 37°C'de 30 dakika inkübasyon sonrasında 562 nm'de okumaları yapıldı.

3.4.3. Jel Hazırlanması, örneklerin jele yüklenmesi ve elektroforez

Biorad jel dökme solüsyonları kullanıldı, APS ve TEMED eklendi. Jel iki katman olarak (sabitleme jeli %4'lük, yürütme jeli %10'luk) döküldü. Dikey jel ilk olarak yürütme jeli, sonrasında ise sabitleme jeli olacak şekilde hazırlandı. Miktar tayini yapılan proteinler 75 mikrogram olarak ayarlandı ve (4x) laemli buffer-betaamarkaptoetanol karışımı ile birlikte 95°C'de 5 dakika inkübe edildiler. Sonrasında jele, marker ve örnekler yüklendi. Yürütme dikey jel elektroforez yöntemi ile 80 voltta yaklaşık 1 saatte gerçekleşti.

3.4.4. Örneklerin Jelden Membrana Aktarılması

Jelde yürüyen protein örnekleri transfer kaseti aracılığıyla semi-dry yöntem ile jelden PVDF membrana aktarıldı. Islatılmış transfer paketleri arasına membran, membranın üzerine jel ve üzerine tekrar ıslatılmış tranfer paketleri eklenerek 1,3 A, 25 V, 7 dk olacak şekilde akım geçişi trans blot turbo(bio-rad) cihazı ile sağlandı.

3.4.5. Membranın Bloklanması

Membranın üzeri Tris-buffer saline ve Tween 20 içeren solüsyonla hazırlanan %5 süt tozu ile 1 saat çalkalayıcıda bloklandı.

3.4.6. Primer Antikor

Bloklama sonrasında yıkama solüsyonu ile birkaç kez yıkama yapıldı ve primer antikor olarak kullanılan BDNF 1:500 ve kontrol olarak kullanılan Aktin 1:1000 oranında hazırlandı. KD ve PMA-YD dişi örnekleri aynı jele; KE ve PMA-YE erkek örnekleri aynı jele olacak şekilde yüklendiler. Jellere yüklenen protein miktarları tüm örnekler için standardize edildiği şekilde her iki antikor için de aynı miktarlarda yüklenerek gerçekleştirildi. Her grup için hem BDNF hem de Aktin antikorları ayrı ayrı yürütmeler yapılarak çalışıldı. Hazırlanan her primer antikor membranın üzerini kaplayacak miktarda hazırlandı ve 1 gece çalkalayıcıda (+4°C) muameleye bırakıldı.

Bir gecelik inkübasyon sonrası primer antikorlar membrandan uzaklaştırıldı.

Sonrasında birkaç kez yıkama solüsyonu ile yıkama gerçekleştirildi.

3.4.7. Sekonder Antikor

Bir gece primer antikor ile inkübasyon sonrası birkaç kez yıkama yapıldı ve sekonder antikor olarak HRP bağlı anti-rabbit IgG kullanıldı. 1:10000 oranında, membranı kaplayacak miktarda hazırlandı. 1 saat çalkalayıcıda muamele edildi.

Bir saatlik muamele sonrasında membrandan sekonder antikor uzaklaştırıldı.

Sonrasında birkaç kez yıkama solüsyonu ile yıkama gerçekleştirildi.

3.4.8. Görüntüleme

Sonrasında görüntüleme solüsyonu olarak Thermo ECL görüntüleme solüsyonu kullanıldı, 10 dakika muamele edildi.

3.4.9. Filme Aktarım

60, 120, 180 ve 240 sn olarak filme 4 farklı membran baskısı alındı.

Filme aktarım karanlık odada geliştirici ve sabitleyici solüsyonlar ile gerçekleştirildi ve filme görüntü alındı.

3.5. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizde SPSS 20 bilgisayar programı kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık $p<0,05$ olarak kabul edildi. Davranış testi, ikili karşılaştırmalarda Student-t testi kullanıldı. Veriler $ORT \pm SE$ olarak ifade edildi. PCR ve western blot çalışma sonuçları deskriptif olarak ifade edildi.



4. BULGULAR

4.1. Gen Ekspresyon Bulguları

Her örnek için ilk anlamlı artışın gözlemlendiği Ct (cycle threshold) değerleri hesaplandı. Her örneğin hem hedef genler için hem de referans gen olan beta aktin için Ct değerleri alındı. Sonrasında fold change değerleri aşağıdaki formül üzerinden hesaplandı.

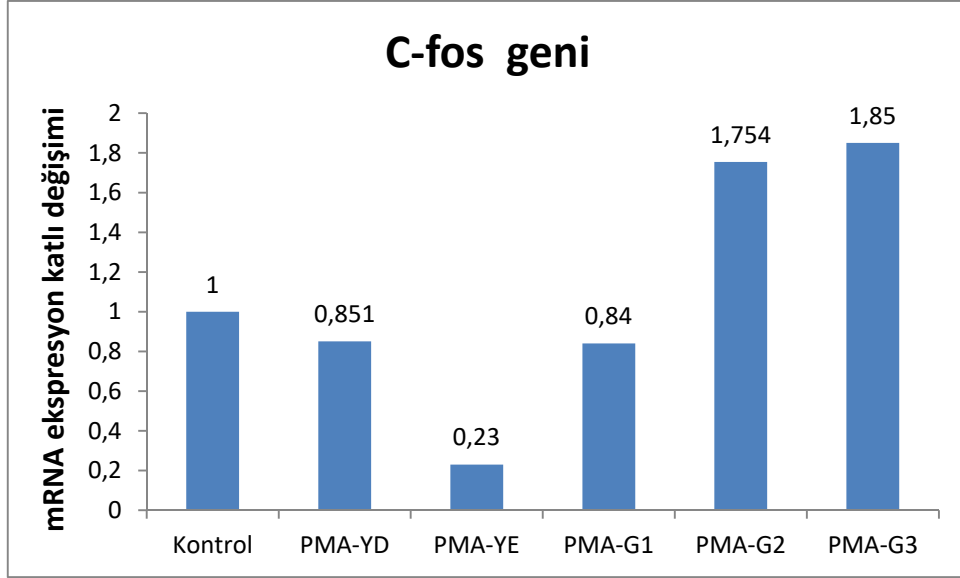
$\Delta Ct = Ct_{\text{hedef gen}} - Ct_{\text{referans gen}}$

$\Delta \Delta Ct = \Delta Ct_{\text{muamele edilen}} - \Delta Ct_{\text{kontrol}}$

$\text{Ekspresyon oranı} = 2^{-\Delta \Delta Ct}$

4.1.1. C-fos geni

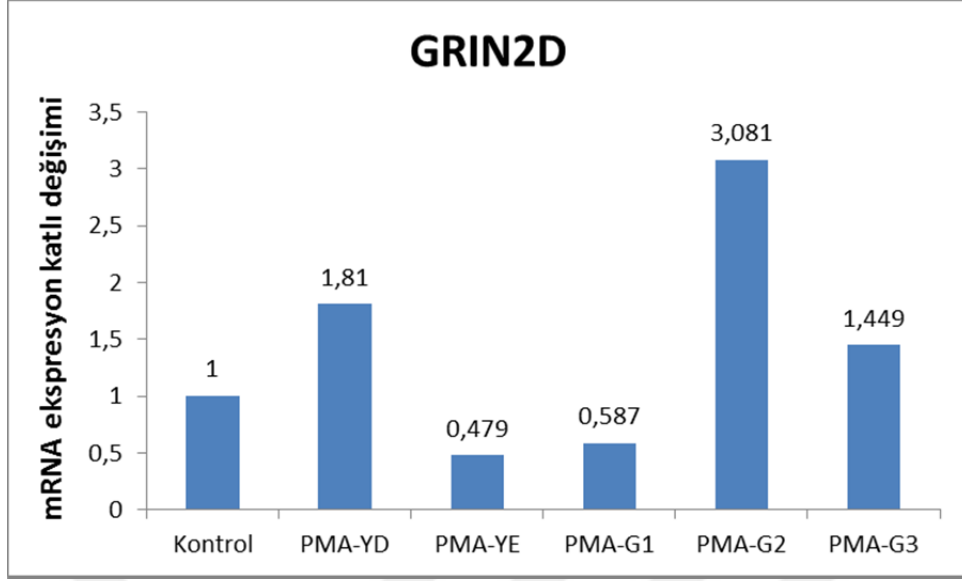
Kontrol grubuna kıyasla gebelik boyunca pulslu elektromanyetik alan maruziyetinden doğan dişi grupta yaklaşık 1,2 kat; erkek grupta ise yaklaşık 4,5 kat fos geni ifadesinde baskılanma gözlemlendi. Kontrol grubuna kıyasla, pulslu elektromanyetik alan uygulanan gebe birinci haftalık grupta c-fos geni için yaklaşık 1,2 kat baskılanma gözlenirken, iki ve üç haftalık pulslu manyetik alan uygulanan gebe gruplarında gen ifadesinde indüklenme gözlemlendi; iki haftalık gebe grupta 1,754 kat, üç haftalık gebe grupta ise 1,85 kat indüklenme gözlemlendi (Şekil 3).



Şekil 3. C-fos geninin kontrol gruplarıyla kıyaslamalı sonuçları. Tüm gruplar kendi kontrol grupları ile 1'e normalize edilmiştir. Gebelikteki (prenatal) üç hafta boyunca PMA'ya maruz kalıp doğan dişi grup (PMA-YD); Gebelikteki (prenatal) üç hafta boyunca PMA'ya maruz kalıp doğan erkek grup (PMA-YE); Gebeliklerinin ilk haftası boyunca hergün PMA'ya maruz kalan grup (PMA-G1), Gebeliklerinin iki haftası boyunca hergün PMA'ya maruz kalan grup (PMA-G2), Gebeliklerinin üç haftası boyunca hergün PMA'ya maruz kalan grup (PMA-G3)

4.1.2. GRIN2D Geni

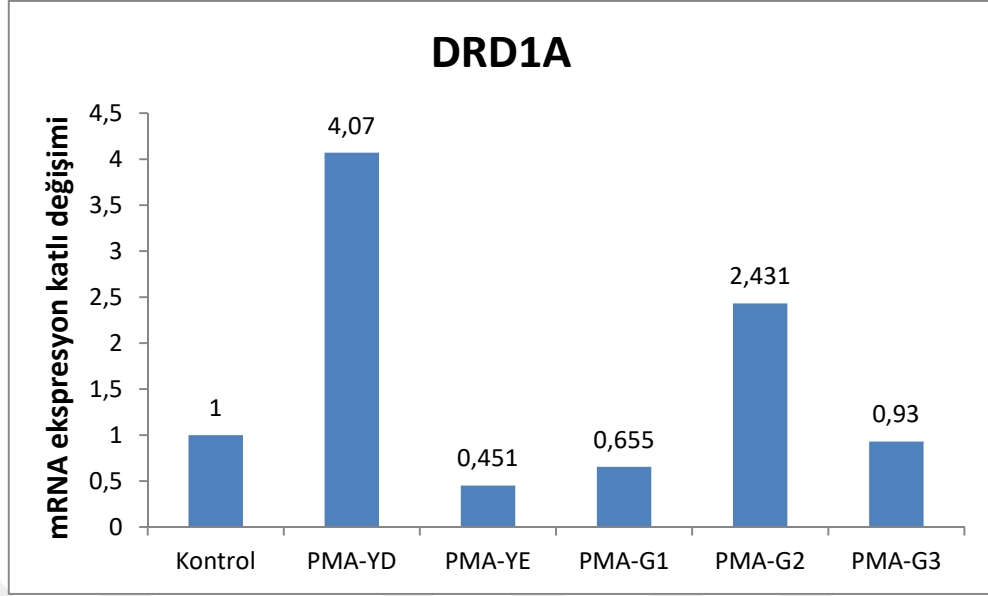
Kontrol grubuna kıyasla gebelik boyunca pulslu elektromanyetik alan maruziyetinden doğan dişi grupta Grin2d gen ifadesinde 1,81 kat indüklenme gözlemlenirken, erkek grupta ise yaklaşık 2 kat gen ifadesinde baskılanma gözlemlendi. Kontrol grubuna kıyasla, pulslu elektromanyetik alan uygulanan gebe bir haftalık grupta Grin2d gen ifadesi yaklaşık 1,7 kat baskılanırken, iki haftalık grupta 3,081 kat indüklenme, üç haftalık grupta ise 1,449 kat gen ifadesinde indüklenme gözlemlenmiştir (Şekil 4).



şekil 4. Grin2d geninin kontrol gruplarıyla kıyaslamalı sonuçları. Tüm gruplar kendi kontrol grupları ile 1'e normalize edilmiştir. Gebelikteki (prenatal) üç hafta boyunca PMA'ya maruz kalıp doğan dişi grup (PMA-YD); Gebelikteki (prenatal) üç hafta boyunca PMA'ya maruz kalıp doğan erkek grup (PMA-YE); Gebeliklerinin ilk haftası boyunca hergün PMA'ya maruz kalan grup (PMA-G1), Gebeliklerinin iki haftası boyunca hergün PMA'ya maruz kalan grup (PMA-G2), Gebeliklerinin üç haftası boyunca hergün PMA'ya maruz kalan grup (PMA-G3)

4.1.3. DRD1A Geni

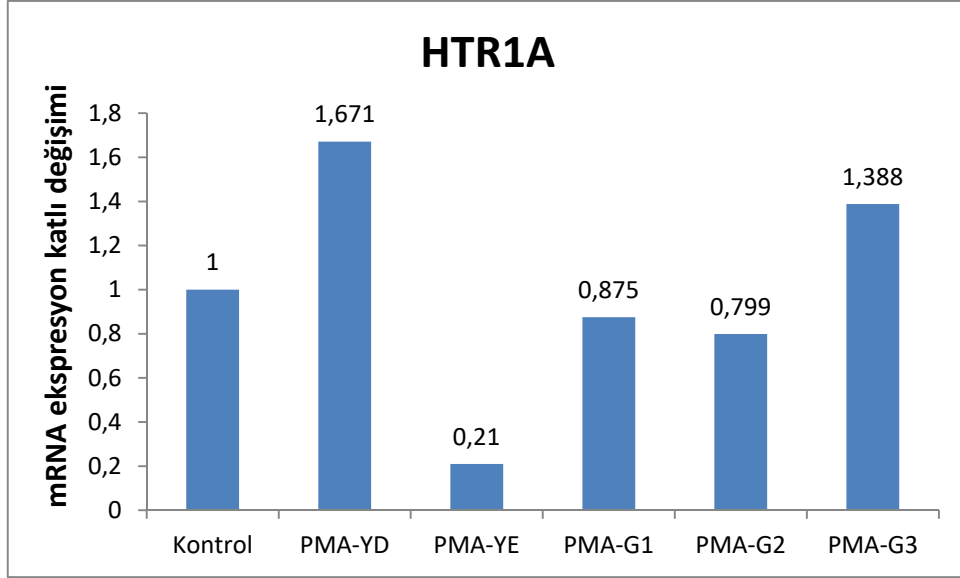
Kontrol grubuna kıyasla gebelik boyunca pulslu elektromanyetik alan maruziyetinden doğan dişi grupta 4,07 kat Drd1a gen ifadesinde indüklenme gözlemlenirken, bu artışın aksine erkek grupta yaklaşık 2,2 kat gen ifadesinde baskılanma gözlemlenmiştir. Kontrol grubuna kıyasla, pulslu elektromanyetik alan uygulanan gebe bir haftalık grupta gen ifadesinde 1,5 kat baskılanma gözlemlenirken üç haftalık grupta gen ifadesinde anlamlı bir değişiklik gözlemlenmemiş; iki haftalık grupta ise gen ifadesinde 2,431 kat indüklenme gözlemlenmiştir (şekil 5).



Şekil 5. Drd1a geninin kontrol gruplarıyla kıyaslamalı sonuçları. Tüm gruplar kendi kontrol grupları ile 1'e normalize edilmiştir. Gebelikteki (prenatal) üç hafta boyunca PMA'ya maruz kalıp doğan dişi grup (PMA-YD); Gebelikteki (prenatal) üç hafta boyunca PMA'ya maruz kalıp doğan erkek grup (PMA-YE); Gebeliklerinin ilk haftası boyunca hergün PMA'ya maruz kalan grup (PMA-G1), Gebeliklerinin iki haftası boyunca hergün PMA'ya maruz kalan grup (PMA-G2), Gebeliklerinin üç haftası boyunca hergün PMA'ya maruz kalan grup (PMA-G3)

4.1.4. HTR1A Geni

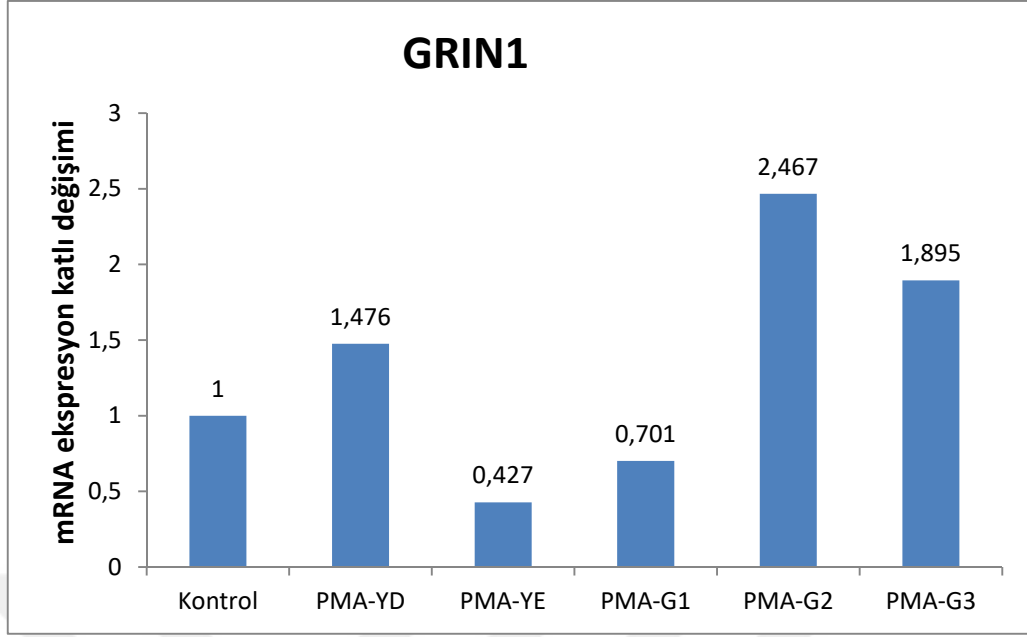
Kontrol grubuna kıyasla gebelik boyunca pulslu elektromanyetik alan maruziyetinden doğan dişi grupta gen ifadesinde 1,671 kat indüklenme, zıt bir şekilde erkek grupta ise yaklaşık 5 kat gen ifadesinde baskılanma gözlemlenmiştir. Kontrol grubuna kıyasla, pulslu elektromanyetik alan uygulanan gebe bir haftalık ve iki haftalık grubun her ikisinde de çok yakın düzeylerde yaklaşık 1,2 kat gen ifadelerinde baskılanma; üç haftalık grupta ise 1,388 kat indüklenme gözlemlenmiştir (Şekil 6).



şekil 6. HTR1A geninin kontrol gruplarıyla kıyaslamalı sonuçları. Tüm gruplar kendi kontrol grupları ile 1'e normalize edilmiştir. Gebelikteki (prenatal) üç hafta boyunca PMA'ya maruz kalıp doğan dişi grup (PMA-YD); Gebelikteki (prenatal) üç hafta boyunca PMA'ya maruz kalıp doğan erkek grup (PMA-YE); Gebeliklerinin ilk haftası boyunca hergün PMA'ya maruz kalan grup (PMA-G1), Gebeliklerinin iki haftası boyunca hergün PMA'ya maruz kalan grup (PMA-G2), Gebeliklerinin üç haftası boyunca hergün PMA'ya maruz kalan grup (PMA-G3)

4.1.5. GRIN1 Geni

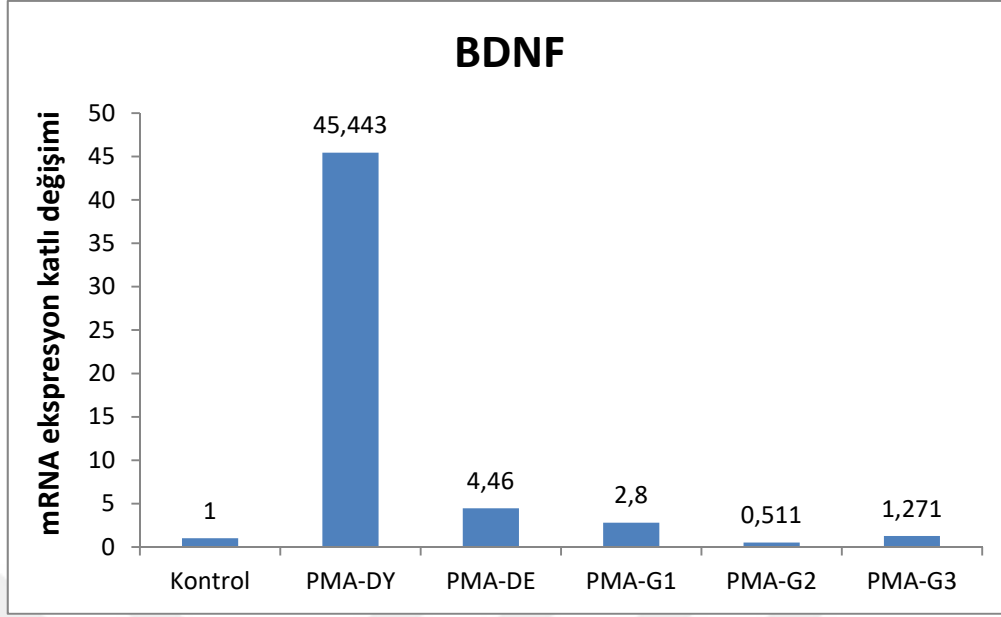
Kontrol grubuna kıyasla gebelik boyunca pulslu elektromanyetik alan maruziyetinden doğan dişi grupta gen ifadesi 1,476 kat indüklenme; erkek grupta yaklaşık 2,3 kat gen ifadesinde baskılanma gözlemlenmiştir. Kontrol grubuna kıyasla, pulslu elektromanyetik alan uygulanan gebe bir haftalık grupta yaklaşık 1,4 kat gen ifadesi baskılanırken; iki ve üç haftalık gruplarda sırasıyla 2,467 ve 1,895 kat gen ifadesinde indüklenme gözlemlenmiştir (şekil 7).



şekil 7. GRIN1 geninin kontrol gruplarıyla kıyaslamalı sonuçları. Tüm gruplar kendi kontrol grupları ile 1'e normalize edilmiştir. Gebelikteki (prenatal) üç hafta boyunca PMA'ya maruz kalıp doğan dişi grup (PMA-YD); Gebelikteki (prenatal) üç hafta boyunca PMA'ya maruz kalıp doğan erkek grup (PMA-YE); Gebeliklerinin ilk haftası boyunca hergün PMA'ya maruz kalan grup (PMA-G1), Gebeliklerinin iki haftası boyunca hergün PMA'ya maruz kalan grup (PMA-G2), Gebeliklerinin üç haftası boyunca hergün PMA'ya maruz kalan grup (PMA-G3)

4.1.6. BDNF Geni

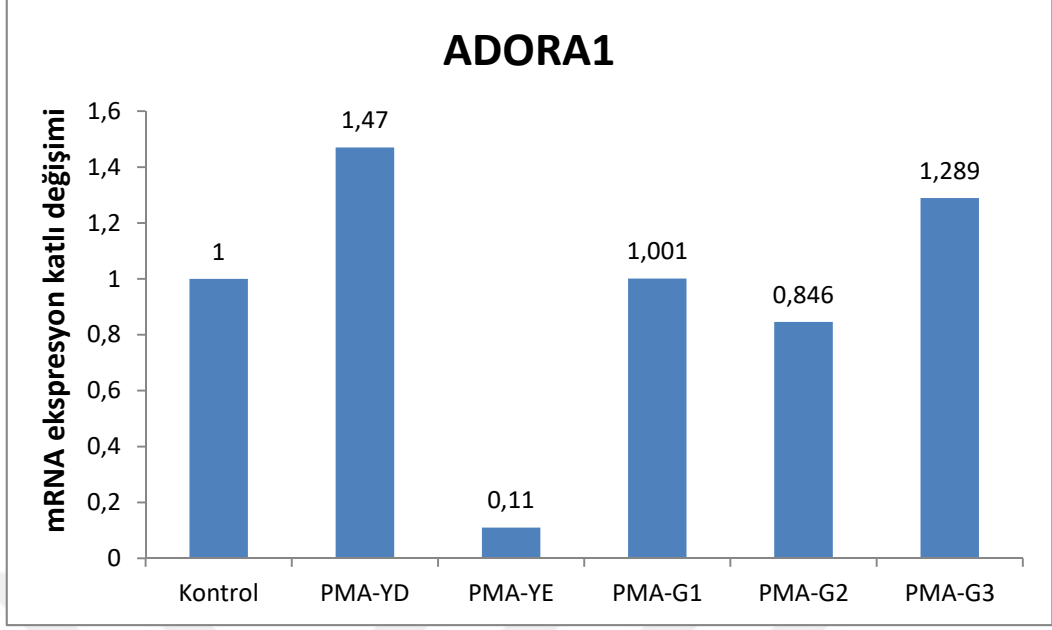
Kontrol grubuna kıyasla gebelik boyunca pulslu elektromanyetik alan maruziyetinden doğan dişi grupta gen ifadesi 45,443 kat indüklenmiş; erkek grupta ise gen ifadesi 4,46 kat indüklenmiştir. Kontrol grubuna kıyasla, pulslu elektromanyetik alan uygulanan gebe bir ve üç haftalık gruplarda sırasıyla 2,8 ve 1,271 kat gen ifadelerinde indüklenme; iki haftalık grupta ise yaklaşık 2 kat gen ifadesinde baskılanma gözlemlenmiştir (şekil 8).



şekil 8. BDNF geninin kontrol gruplarıyla kıyaslamalı sonuçları. Gebelikteki (prenatal) üç hafta boyunca PMA'ya maruz kalıp doğan dişi grup (PMA-YD); Gebelikteki (prenatal) üç hafta boyunca PMA'ya maruz kalıp doğan erkek grup (PMA-YE); Gebeliklerinin ilk haftası boyunca hergün PMA'ya maruz kalan grup (PMA-G1), Gebeliklerinin iki haftası boyunca hergün PMA'ya maruz kalan grup (PMA-G2), Gebeliklerinin üç haftası boyunca hergün PMA'ya maruz kalan grup (PMA-G3)

4.1.7. ADORA1 Geni

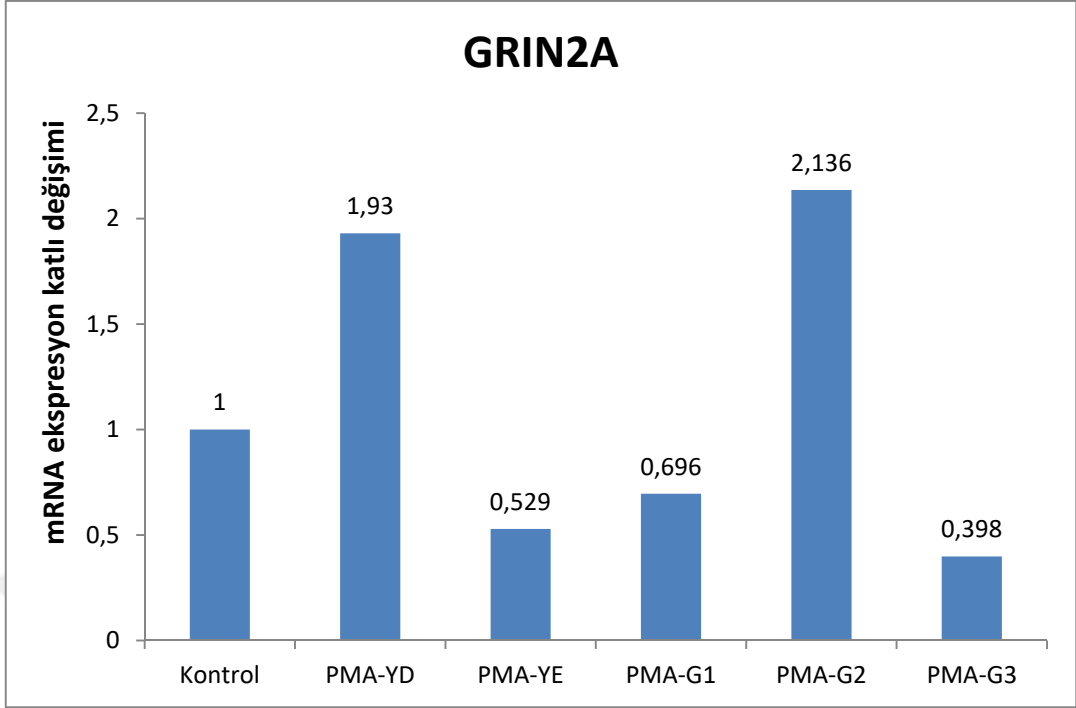
Kontrol grubuna kıyasla gebelik boyunca pulslu elektromanyetik alan maruziyetinden doğan dişi grupta gen ifadesi 1,47 kat indüklenmiş, aksi bir şekilde erkek grupta ise yaklaşık 10 kat gen ifadesinde baskılanma gözlemlenmiştir. Kontrol grubuna kıyasla, pulslu elektromanyetik alan uygulanan gebe bir haftalık grupta neredeyse gen ifadesinde hiçbir fark gözlemlenmezken, iki haftalık grupta yaklaşık 1,2 kat gen ifadesinde baskılanma, üç haftalık grupta ise 1,289 kat gen ifadesinde indüklenme gözlemlenmiştir (şekil 9).



şekil 9. ADORA1 geninin kontrol gruplarıyla kıyaslamalı sonuçları. Tüm gruplar kendi kontrol grupları ile 1'e normalize edilmiştir. Gebelikteki (prenatal) üç hafta boyunca PMA'ya maruz kalıp doğan dişi grup (PMA-YD); Gebelikteki (prenatal) üç hafta boyunca PMA'ya maruz kalıp doğan erkek grup (PMA-YE); Gebeliklerinin ilk haftası boyunca hergün PMA'ya maruz kalan grup (PMA-G1), Gebeliklerinin iki haftası boyunca hergün PMA'ya maruz kalan grup (PMA-G2), Gebeliklerinin üç haftası boyunca hergün PMA'ya maruz kalan grup (PMA-G3)

4.1.8. GRİN2A Geni

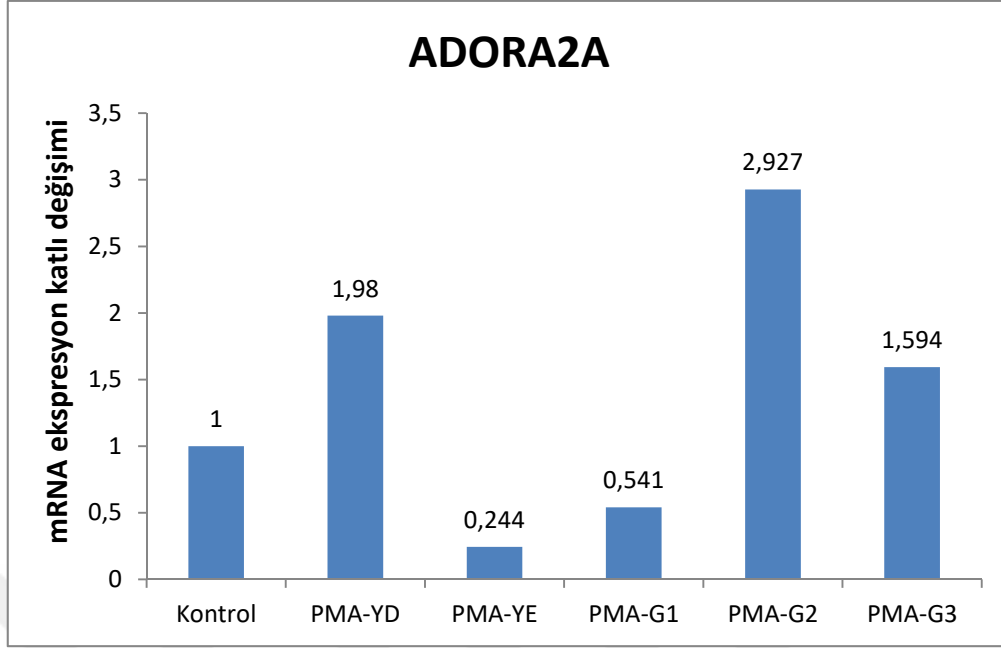
Kontrol grubuna kıyasla gebelik boyunca pulslu elektromanyetik alan maruziyetinden doğan dişi grupta gen ifadesinde 1,93 kat indüklenme gözlemlenirken, erkek grup ise yaklaşık 2 kat gen ifadesinde baskılanma gözlemlenmiştir. Kontrol grubuna kıyasla, pulslu elektromanyetik alan uygulanan gebe bir haftalık ve üç haftalık gruplarda sırasıyla yaklaşık 1,5 ve 2,5 kat gen ifadesinde baskılanma gözlemlenirken, iki haftalık grupta 2,136 kat gen ifadesinde indüklenme gözlemlenmiştir (şekil 10).



şekil 10. GRIN2A geninin kontrol gruplarıyla kıyaslamalı sonuçları. Tüm gruplar kendi kontrol grupları ile 1'e normalize edilmiştir. Gebelikteki (prenatal) üç hafta boyunca PMA'ya maruz kalıp doğan dişi grup (PMA-YD); Gebelikteki (prenatal) üç hafta boyunca PMA'ya maruz kalıp doğan erkek grup (PMA-YE); Gebeliklerinin ilk haftası boyunca hergün PMA'ya maruz kalan grup (PMA-G1), Gebeliklerinin iki haftası boyunca hergün PMA'ya maruz kalan grup (PMA-G2), Gebeliklerinin üç haftası boyunca hergün PMA'ya maruz kalan grup (PMA-G3)

4.1.9. ADORA2A Geni

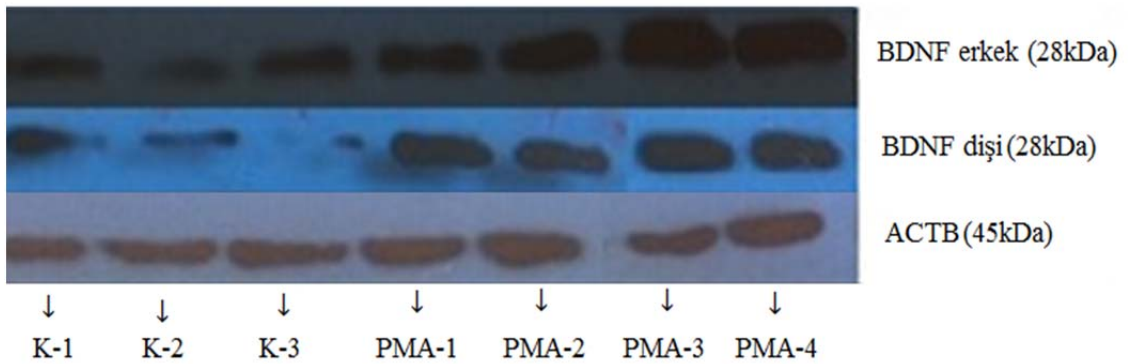
Kontrol grubuna kıyasla gebelik boyunca pulslu elektromanyetik alan maruziyetinden doğan dişi grupta gen ifadesinde 1,98 kat indüklenme gözlemlenirken, erkek grupta ise gen ifadesinde yaklaşık 4 kat baskılanma gözlemlenmiştir. Kontrol grubuna kıyasla, pulslu elektromanyetik alan uygulanan gebe bir haftalık grupta gen ifadesinde yaklaşık 1,8 kat baskılanma gözlemlenirken; iki ve üç haftalık gruplarda sırasıyla 2,927 ve 1,594 kat gen ifadelerinde indüklenme gözlemlenmiştir (şekil 11).



şekil 11. ADORA2A geninin kontrol gruplarıyla kıyaslamalı sonuçları. Tüm gruplar kendi kontrol grupları ile 1'e normalize edilmiştir. Gebelikteki (prenatal) üç hafta boyunca PMA'ya maruz kalıp doğan dişi grup (PMA-YD); Gebelikteki (prenatal) üç hafta boyunca PMA'ya maruz kalıp doğan erkek grup (PMA-YE); Gebeliklerinin ilk haftası boyunca hergün PMA'ya maruz kalan grup (PMA-G1), Gebeliklerinin iki haftası boyunca hergün PMA'ya maruz kalan grup (PMA-G2), Gebeliklerinin üç haftası boyunca hergün PMA'ya maruz kalan grup (PMA-G3)

4.2. Western Blot bulguları

BDNF western blot sonuçları (şekil 11) ; Kontrol gruplarına kıyasla PMA-YE ve PMA-YE gruplarında protein ifade düzeylerinde artış gözlemlenmiştir.



şekil 12. BDNF Western blot sonuçları. K-1, K-2 ve K-3 örnekleri [Gebelikte hiçbir maruziyeti olmayan anneden doğan kontrol erkek grubu (KE) ve Gebelikte hiçbir maruziyeti olmayan anneden doğan kontrol dişi grubu (KD)]; PMA-1, PMA-2, PMA-3 ve PMA-4 [Gebelikteki üç hafta boyunca PMA'ya maruz kalıp doğan dişi grup (PMA-YD) ve Gebelikteki (prenatal) üç hafta boyunca PMA'ya maruz kalıp doğan erkek grup (PMA-YE) olarak kullanıldı.

4.3. Yükseltilmiş Artı Labirent Testi Bulguları

Yükseltilmiş artı labirent davranış testi;

T-testi değerlendirme sonuçları,

Çizelge 6. Yükseltilmiş artı labirent t testi sonuçları

ERKEK	p Değerleri
Açık kolda geçirilen süre	0,013
Merkezde geçirilen süre	0,241
Kapalı kolda geçirilen süre	0,04
Açık kola giriş sıklığı	0,424
Kapalı kola giriş sıklığı	0,002
Baş kaldırma sıklığı	0,669
Ayağa kalkma sıklığı	0,40
Total giriş-çıkış sıklığı	0,003

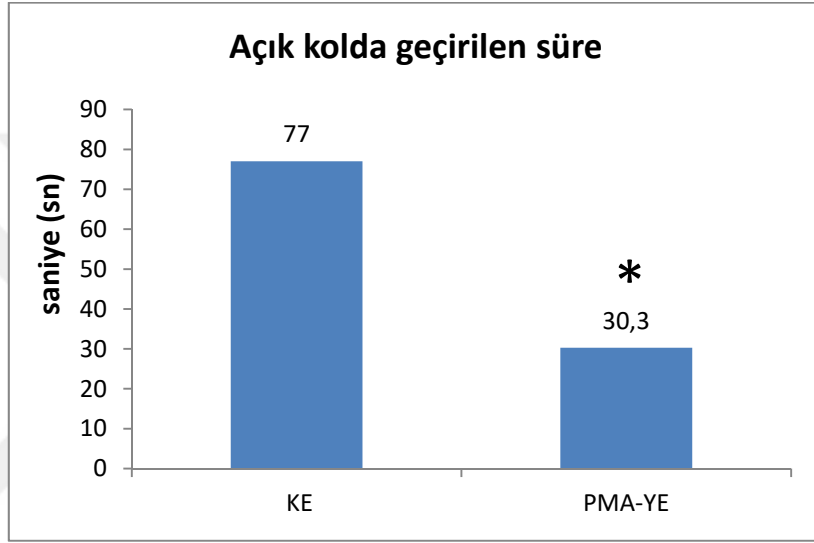
Çizelge 7. Yükseltilmiş artı labirent p değerleri

DIŞI	p Değerleri
Açık kolda geçirilen süre	0,675
Merkezde geçirilen süre	0,000
Kapalı kolda geçirilen süre	0,410
Açık kola giriş sıklığı	0,120
Kapalı kola giriş sıklığı	0,438
Baş kaldırma sıklığı	0,418
Ayağa kalkma sıklığı	0,000
Total giriş-çıkış sıklığı	0,137

T testi sonucu elde edilen p değerlerinden 0,05'ten küçük değerler anlamlı kabul edildi. Veriler $ORT \pm SE$ olarak ifade edildi.

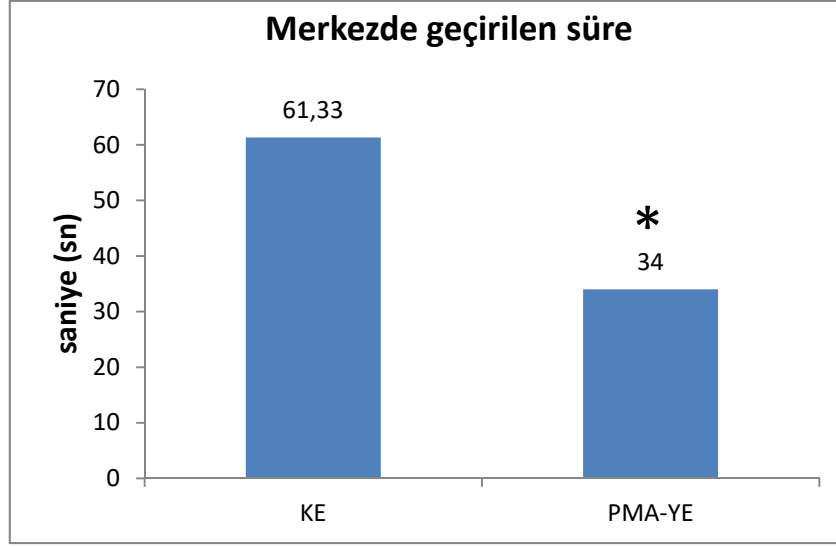
Erkek gruplar için elde edilen sonuçlar; açık kolda geçirilen süre, merkezde geçirilen süre, kapalı kolda geçirilen süre, kapalı kola giriş sıklığı ve ayağa kalkma sıklığı ile ilgili grafikler şu şekildedir;

Açık kolda geçirile süre; KE grubunda $ORT \pm SE$ değeri 77 iken, PMA-YE grubunda $ORT \pm SE$ değeri 30,3 olarak azalma göstermiştir (Şekil 13).



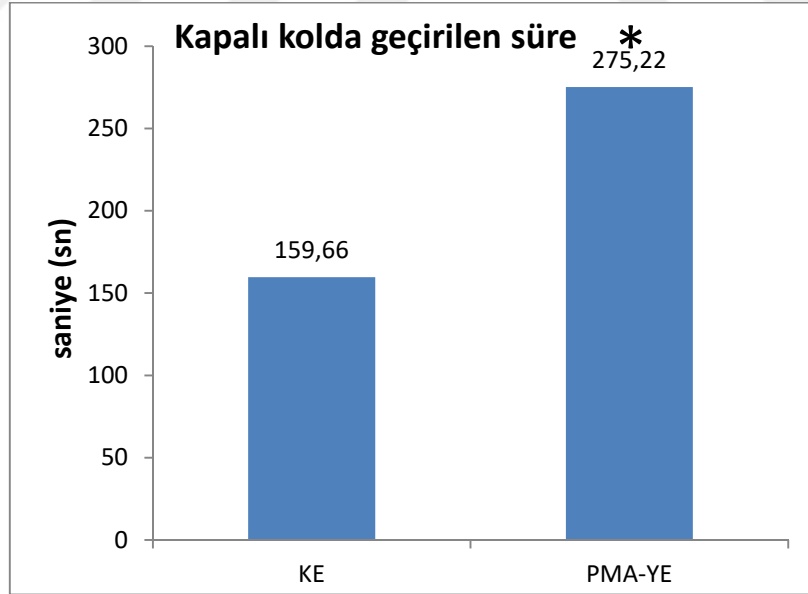
Şekil 13. Açık kolda geçirilen süreler için yükseltilmiş artı labirent testi değerleri; Gebelikte hiçbir uygulamaya maruz kalmayan kontrol erkek grup (KE) ve Gebelikteki (prenatal) üç hafta boyunca PMA'ya maruz kalıp doğan erkek grup (PMA-YE) $ORT \pm SE$ değerleridir. * $p < 0,05$ KE grubuna göre veriler $ORT \pm SE$. Student t testi ($n=5-10$).

Merkezde geçirilen süre; KE grubunda $ORT \pm SE$ değeri 61,33 iken, PMA-YE grubunda $ORT \pm SE$ değeri 34 olarak azalma göstermiştir (Şekil 14).



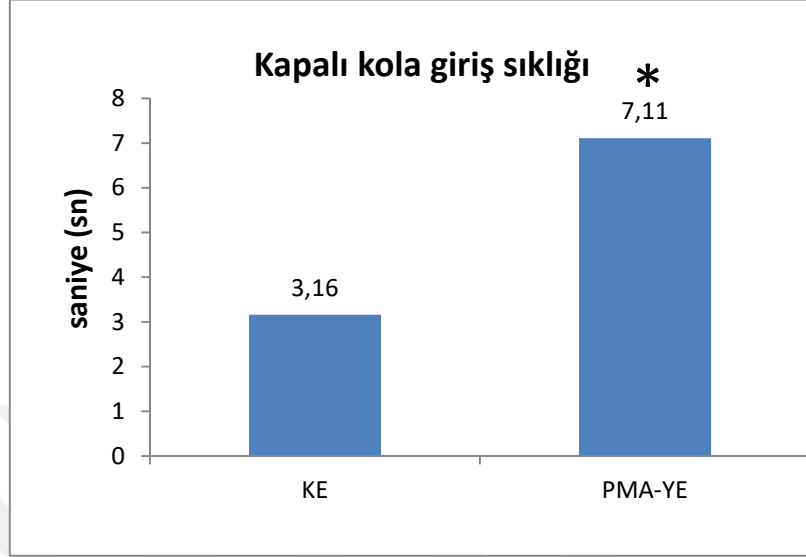
Şekil 14. Merkezde geçirilen süreler için yükseltilmiş artı labirent testi değerleri; Gebelikte hiçbir uygulamaya maruz kalmayan kontrol erkek grup (KE) ve Gebelikteki (prenatal) üç hafta boyunca PMA'ya maruz kalıp doğan erkek grup (PMA-YE) * $p < 0,05$ KE grubuna göre veriler $ORT \pm SE$. Student t testi ($n=5-10$).

Kapalı kolda geçirilen süre; KE grubunda $ORT \pm SE$ değeri 159,66 iken, PMA-YE grubunda $ORT \pm SE$ değeri 275,22 olarak artış göstermiştir (Şekil 15).



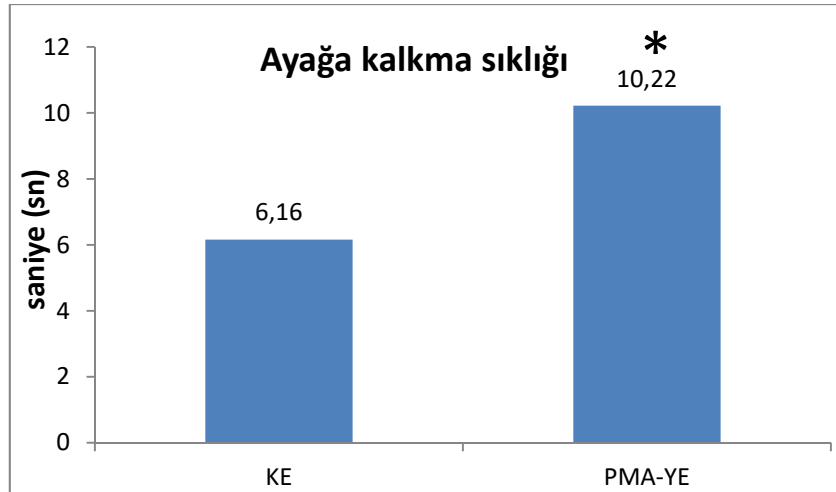
Şekil 15. Kapalı kolda geçirilen süreler için yükseltilmiş artı labirent testi değerleri; Gebelikte hiçbir uygulamaya maruz kalmayan kontrol erkek grup (KE) ve Gebelikteki (prenatal) üç hafta boyunca PMA'ya maruz kalıp doğan erkek grup (PMA-YE) * $p < 0,05$ KE grubuna göre veriler $ORT \pm SE$. Student t testi ($n=5-10$).

Kapalı kola giriş sıklığı; KE grubunda ORT \pm SE değeri 3,16 iken, PMA-YE grubunda ORT \pm SE değeri 7,11 olarak artış göstermiştir (Şekil 16).



Şekil 16. Kapalı kola giriş sıklığı için yükseltilmiş artı labirent testi değerleri; Gebelikte hiçbir uygulamaya maruz kalmayan kontrol erkek grup (KE) ve Gebelikteki (prenatal) üç hafta boyunca PMA'ya maruz kalıp doğan erkek grup (PMA-YE) * $p < 0,05$ KE grubuna göre veriler ORT \pm SE. Student t testi (n=5-10).

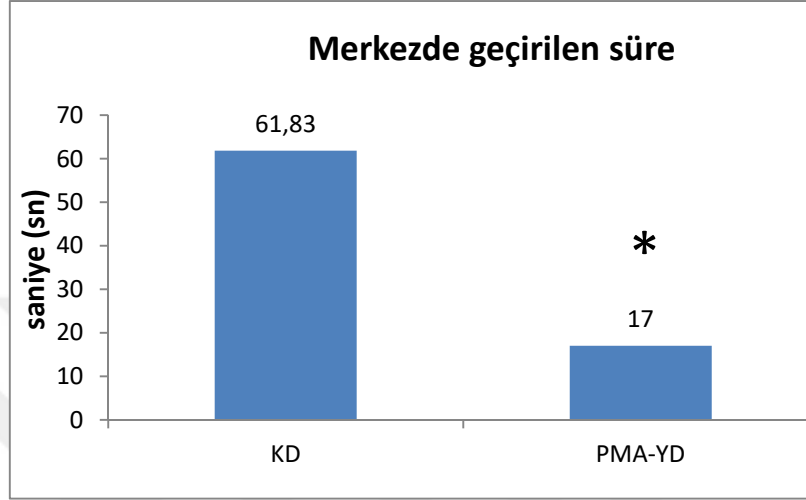
Ayağa kalkma sıklığı; KE grubunda ORT \pm SE değeri 6,16 iken, PMA-YE grubunda ORT \pm SE değeri 10,22 olarak artış göstermiştir (Şekil 17).



Şekil 17. Ayağa kalkma sıklığı için yükseltilmiş artı labirent testi değerleri; Gebelikte hiçbir uygulamaya maruz kalmayan kontrol erkek grup (KE) ve Gebelikteki (prenatal) üç hafta boyunca PMA'ya maruz kalıp doğan erkek grup (PMA-YE) * $p < 0,05$ KE grubuna göre veriler ORT \pm SE. Student t testi (n=5-10).

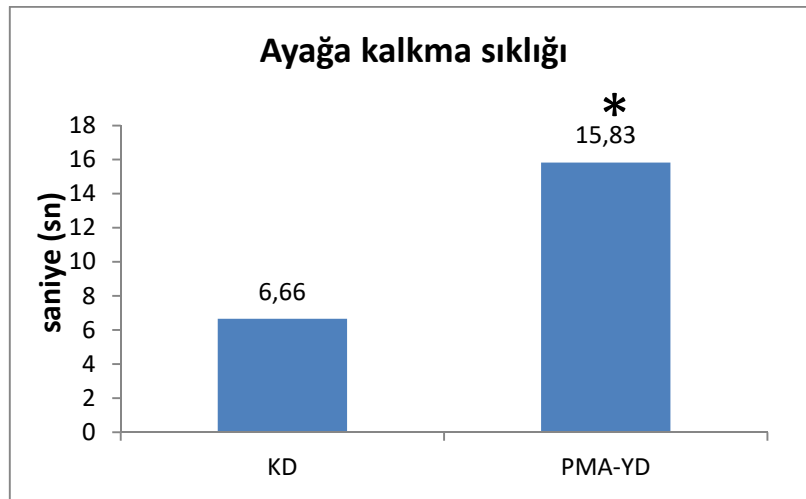
Dişi gruplar için elde edilen sonuçlar; merkezde geçirilen süre ve ayağa kalkma sıklığı ile ilgili grafikler şu şekildedir;

Merkezde geçirilen süre; KD grubunda ORT \pm SE değeri 61,83 iken, PMA-YD grubunda ORT \pm SE değeri 17 olarak azalma göstermiştir (Şekil 18).



Şekil 18. Merkezde geçirilen süreler için yükseltilmiş artı labirent testi değerleri; Gebelikte hiçbir uygulamaya maruz kalmayan kontrol dişi grup (KD) ve Gebelikteki (prenatal) üç hafta boyunca PMA'ya maruz kalıp doğan dişi grup (PMA-YD) * $p < 0,05$ KD grubuna göre veriler ORT \pm SE. Student t testi (n=5-10).

Ayağa kalkma sıklığı; KD grubunda ORT \pm SE değeri 6,66 iken, PMA-YD grubunda ORT \pm SE değeri 15,83 olarak artış göstermiştir (Şekil 19).



Şekil 19. Ayağa kalkma sıklığı için yükseltilmiş artı labirent testi değerleri; Gebelikte hiçbir uygulamaya maruz kalmayan kontrol dişi grup (KD) ve Gebelikteki (prenatal) üç hafta boyunca PMA'ya maruz kalıp doğan dişi grup (PMA-YD) * $p < 0,05$ KD grubuna göre veriler ORT \pm SE. Student t testi (n=5-10).

5. TARTIŞMA

Fetus gelişimi esnasında ve sonraki dönemde çocuğun sağlığı, hastalık riskleri göz önünde bulundurulduğunda intrauterin çevrenin önemli rol oynadığını yapılan çalışmalarda gösterilmektedir¹. Gebelikte sürekli maruz kalınan çevresel faktörlerden biri elektromanyetik alanlardır.

Elektromanyetik alanın etkinliğini; türü, frekansı ve maruziyet süresi belirler. Elektromanyetik alanların organizmaya çok farklı etkileri söz konusudur, şüphesiz etkisi en çok merak uyandıran alanlardan biri beyindir. Bu konuda gerek davranış testleriyle gerek moleküler düzeyde pek çok çalışma yapılmaktadır.

Erdal ve ark. yaptıkları çalışmada manyetik alan ve sham grubu oluşturmuşlar, sıçanları; genç dişi, ergin dişi, genç erkek ve ergin erkek olmak üzere gruplara ayırmışlardır. Her grubun manyetik alan ve sham grubu oluşturulmuş ve manyetik alana maruz bırakılan gruplara 60 gün boyunca, günde 4 saat süreyle sinüsoidal manyetik alan uygulaması yapılmıştır. Çalışmalarında tüm miRNA ekspresyon seviyeleri genç dişi sıçanlarda önemli derecede azalma göstermiştir fakat; beyin örneklerine göre kan örneklerindeki miRNA ekspresyon seviyelerindeki azalma daha fazla gözlenmiştir³⁵.

Dong ve ark. yaptıkları çalışmada; düşük frekanslı elektromanyetik alanların in vitro erkek Sprague-Dawley sıçan hipokampal dilimlerinde uzun vadeli güçlenme (LTP) yapıp yapamayacağını araştırmışlar; ilginç bir şekilde, aldıkları sonuçlar 100 Hz darbeleri sinüzoidal düşük frekanslı manyetik alanların bir LTP indükleyici yerine sadece modülatör rolü olduğunu vurgulamaktadır³⁶.

He ve ark. yaptıkları çalışmada; 21 gün/4 saat düşük frekanslı (50 Hz/2mT) elektromanyetik alan maruziyetinin, yükseltilmiş artı labirent testi sonuçlarına göre anksiyojenik etkiye sebep olduğunu öne sürmüşlerdir³⁷.

Cao ve ark. gebe farelerle yaptıkları çalışmalarında gebelik süresi boyunca, günde 8 saat olmak üzere 50 Hz/1,2 mT manyetik alan uygulamışlar ve manyetik alan uygulaması yapılan grupta düşükler, fetal kayıplar ve kusurlu fetüsler gözlemlemişlerdir³⁸.

Fetal beyinde plastisite yüksektir, dolayısıyla utero koşullardaki yapı ve işlevlerdeki küçük değişiklikler dahi uzun süreli etkilere sebep olabilir¹. Gebelikte

oldukça düşük frekanslı elektromanyetik alana maruz kalmanın annenin gebeliğini ve yavrunun gelişimini olumsuz etkileyebileceği düşünülmektedir³⁸.

İnsan fetal beyin gelişimi sırasındaki kronik veya tekrarlayan stres, ilerleyen yaşamda depresyonda dahil olmak üzere çeşitli öğrenme, davranış ve ruh hali bozuklukları ile ilişkilendirilmektedir³⁹.

Hove ve ark. yaptıkları çalışmada; doğum öncesi stresin her iki cinsiyet için de doğumdan hemen sonra beyin hücresi proliferasyonunda yaklaşık % 50'lik bir düşüşle sonuçlandığını, hipokampus içinde doğum sonrası 1. günde (% 36.1) ve doğum sonrası 5. günde (yalnızca dişilerde; %20.1) kaspaz-3 benzeri aktivitede eşzamanlı bir artış ortaya çıktığını gözlemlemişlerdir. Çalışma sonuçlarına göre, doğum öncesi stres altındaki erkek yavrularda postnatal 1 ve 5. günlerde, beyin kaynaklı nörotrofik faktör protein içeriği, hem olfaktör bulblarda (%24.6) hem de hipokampus'te (%28.2) azalmıştır. Gözlenen bu zararlı merkezi değişiklikler, doğum öncesi stres altındaki bireylerin ileriki yaşamlarında depresyon da dahil olmak üzere duygudurum bozukluklarına karşı artan duyarlılığını kısmen açıklayabilir³⁹.

Yapılan çalışmalar; korku ve kaygı ile ilgili davranışların modülasyonunda rolü olan hipokampusün, oldukça düşük frekanslı manyetik alandan etkilenebildiğini düşündürmektedir. (Hipokampal sinaptisitenin artması gibi)

Hipokampus, amigdala ve frontal korteks dahil olmak üzere farklı beyin bölgeleri anksiyetede ve modülasyonda rol oynamaktadır¹⁴. Patolojik anksiyete ve kronik stres, hipokampus ve prefrontal korteksin yapısal dejenerasyonuna ve fonksiyonunun bozulmasına neden olur ve bu durum da depresyon ve demans dahil olmak üzere nöropsikiyatrik bozuklukların gelişme riskinin artmasına neden olabilir⁴⁰.

Hipokampus özellikle adolesan dönemde değişmektedir, artan sayıda granül hücre ve adolesan döneminde kemirgenlerde hipokampal tabakaların genel olarak artan hacmi gözlenmiştir⁹. Bizde bu bağlamda çalışmamızı; gebelik süresince elektromanyetik alan maruziyetinden doğan yavruların adolesan dönemlerinde ve hipokampus dokuları üzerinden gerçekleştirdik.

Anksiyete gibi birçok duygudurum bozukluklarına; nörotransmitterler ve onların reseptörlerinin fonksiyon bozuklukları yol açabilir. Dopaminin beynin farklı bölgelerindeki anksiyete modülasyonunda önemli bir rol oynadığına dair kanıtlar vardır. Bazı kanıtlar mezolimbik, mezokortikal ve nigrostriatal dopaminerjik sistemin

anksiyeteye ilişkili olduğunu göstermektedir¹⁴. Hipokampus ise, (ventral tegmental area) VTA ve substantia nigra pars compacta(SNc) gibi mezolimbik yapılardan dopamin projeksiyonları alır. Bu fenomen, hipokampus plastisitesinde önemli bir role sahiptir. Dorsal hipokampus (CA1) ve ventral hipokampusun Dopamin D1 ve D2 reseptörlerinin anksiyete ile ilgili davranışlarda rol oynadığı; dopamin tükenmesinin, anksiyete ve depresyon gibi davranışların tetikleyicisi olabileceği bildirilmiştir¹⁴. Çalışmamızda; PMA-YE grubunda Dopamin D1 reseptör geni ifadesinde yaklaşık 2 kat baskılanma gözlemledik.

GABA erjik sistem çeşitli anksiyete bozukluklarının patogeneğinde rol oynamaktadır¹⁶. Panik anksiyete ve posttravmatik stres bozukluğu olan hastalarda GABA (A) reseptörlerinin sayısında azalma gözlenmiştir¹⁶. Adora1 ve Adora2a, presinaptik sinir terminallerinde eksprese edilir ve bu reseptörlerin aktivasyonu, beyindeki glutamat, GABA, dopamin ve asetilkolin dahil olmak üzere hemen hemen tüm nörotransmitterlerin salımını kontrol eder³¹.

Çalışmamızda PMA-YE grubunda; Adora1 gen ifadesinde yaklaşık 10 kat ve Adora2a gen ifadesinde yaklaşık 4 kat baskılanma gözlemledik.

Son dönemdeki çalışmalar 5-HT1A ve 5-HT4 reseptörlerinin de anksiyete ve depresyon tedavisinde önemli rolleri olduğunu desteklemektedir²⁴. Farklı beyin bölgelerindeki elektrofizyoloji, davranış ve bağlanma çalışmaları, 5-HT1A ve 5-HT4 reseptörlerinin duygudurum bozukluklarının patofizyolojisinde ve tedavi yanıtında rol oynadığını düşündürmektedir²⁴.

Postnatal gelişimde, postsinaptik önbeyin 5-HT1A reseptörlerinin artması anksiyeteyi azaltırken, yetişkin farelerde presinaptik 5-HT1A otoreseptörlerinde artış depresyon benzeri fenotip ve antidepresanlara direnci teşvik etmektedir⁴¹.

Depresif intihar hastalarından alınan beyin sapı örneklerinin postmortem analizleri, özellikle dorsal raphe çekirdeklerinde, depresif olmayan kontrol bireyleri ile karşılaştırıldığında 5-HT1A otoreseptör düzeylerinde anlamlı bir artış olduğunu göstermektedir²¹. Pozitron emisyon tomografisi (PET) çalışmaları bu verileri doğrulamaya çalışırken bazı çelişkili sonuçlar ortaya koymuştur, ancak bu çalışılan popülasyonların özelliklerinin farklı olmasından kaynaklanabilir²⁴.

5-HT1A reseptörü knock out fareler kontrol grubuna kıyasla, artan anksiyete ilişkili davranışlar sergilemişlerdir⁴².

Gen ekspresyonu çalışma sonuçlarımız PMA-YE grubunda 5-HT1A reseptör geni ifadesinin yaklaşık 5 kat baskılandığını göstermektedir.

BDNF ve 5-HT'nin yetişkin beyninde sinaptik plastisite, nöronal hayatta kalma ve nörogenezi düzenlediği bilinmektedir. Bozulmuş 5-HT ve BDNF sinyalleri depresyon ve anksiyete bozukluklarının hedefindedir⁴³.

Murakami ve ark. 1-3 haftalık kronik stresli hayvanlarda, BDNF mRNA seviyelerini, plazma GC seviyeleri ile birlikte, hipokampus/hipotalamus ve 5-HT sentezleyen enzimdeki GC reseptörleri, raphe çekirdeklerinde triptofan hidroksilazı; in situ hibridizasyon ve immünohistokimya kullanarak araştırmışlar. Çalışma sonuçlarına göre, BDNF mRNA seviyeleri, 6 saatlik kısıtlama stresinden sonra hipokampusta önemli ölçüde azalmış, fakat bu kısıtlamanın BDNF sentezini azaltması, akut stres modellerinde görülenlerden daha az gözlenmiştir⁴⁴.

Hayvanlarda depresyon modelleriyle yapılan çalışmalar, anne yoksunluğunun azalmış BDNF ekspresyonu ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Bu bulgu, duygu durum bozuklukları, şizofreni ve anksiyete bozukluklarının biyolojisinde BDNF'nin rolünü düşündürmektedir. Hayvan modeli çalışmalarında BDNF'nin antidepresan aktivitesi de gösterilmiştir. Antidepresan ilaçların çoğu, sinaptik yarıktaki artan monoaminlerle ve BDNF proteininin üretimi aracılığı ile hareket eder²⁹.

Gebelikte strese maruz kalmanın yavruların duygudurum bozuklukları geliştirme riskini arttırdığına dair kanıtlar mevcuttur. BDNF'in, nöronal gelişim sırasında kritik bir rol oynadığı ve bu nedenle, hamilelik sırasında stres altındaki dişi sıçanların yetişkin yavrularında nöronal sinyalleme modüle etmeye yarayan başlıca aday olduğu düşünülmektedir. Boersma ve ark. doğum öncesi stres altındaki sıçanların amigdala ve hipokampuslarında hem ablaktasyon (sütten kesme) aşamasında hem de erişkinlikte azalmış BDNF ekspresyonu gözlemlemişlerdir³⁵. Biz çalışmamızda hem dişi hem de erkek yavru gruplarında, gen ve protein ifadesinde BDNF'in indüklendiğini gözlemledik⁴⁵.

Gebe birinci, ikinci ve üçüncü hafta pulslu elektromanyetik alan maruziyeti, hipokampus dokularında, gen ekspresyon düzeylerinde haftalara göre değişkenlik göstermektedir.

Gen ekspresyon profillerinde olduğu gibi davranış testinde de sonuçlar dişi ve erkek yavrulardan oluşan gruplar arasında farklılık göstermektedir. Dişi grupta (PMA-

YD) yükseltilmiş artı labirent testinde; merkezde geçirilen sürenin azalması ve ayağa kalkma sıklığının artması dışında anlamlı sonuçlara ulaşamamıştır. Dişilerde östrus siklusu takibi yapılmamış olması anlamlı bir sonuca ulaşmamızı engellemiş olabilir. Erkek grupta (PMA-YE) ise yükseltilmiş artı labirent testinde açık kolda geçirilen sürenin azalması, kapalı kola giriş sıklığının artması, merkezde geçirilen sürenin azalması, kapalı kolda geçirilen sürenin artması ve ayağa kalkma sıklığında artışı değerlendirdiğimizde anlamlı sonuçlar gözlemledik. Ayağa kalkma sıklığı dışındaki diğer süreler anksiyete benzeri davranışları destekler niteliktedir.

PMA-YE gruptaki anksiyete benzeri davranışların arttığı, moleküler düzeyde ise; c-fos geninin ifadesinin yaklaşık 4,5 kat, Grin2d gen ifadesinin yaklaşık 2 kat, 5-HT1A gen ifadesinin yaklaşık 5 kat, Grin1 gen ifadesinin yaklaşık 2,5 kat, Adora1 gen ifadesinin yaklaşık 10 kat, Grin2a gen ifadesinin yaklaşık 2 kat ve Adora2a gen ifadesinin ise yaklaşık 4 kat ifadelerinin baskılandığını, yalnızca BDNF gen ifadesinin 4,5 kat indüklendiğini gözlemledik. BDNF geninin bu artışını western blot sonuçlarımız da destekledi.

PMA-YE grubunda gözlemlediğimiz anksiyete benzeri davranışların, (He ve ark.) 21 gün günde 4 saat düşük frekanslı elektromanyetik alan uygulaması yapılan çalışmanın yükseltilmiş artı labirent testi sonuçlarıyla benzerlik göstermiş olması, elektromanyetik alanın gebelikte dikkat edilmesi gereken bir unsur olduğunu, elektromanyetik alana maruz kalan annelerin çocuklarının anksiyeteye daha duyarlı olabileceğini düşündürmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Çalışmamızın sonuçlarına göre; pulslu elektromanyetik alana maruz kalan gebelerden doğan yavruların ileriki dönemde beyin gelişimi, duygu durumlarında etkisi olan genlerin ifade düzeylerinde anlamlı ölçüde ifade değişikliği gözlemledik. Gözlemediğimiz ifade değişiklikleri dişi ve erkek gruplarda farklılık göstermektedir, fakat BDNF geni hem dişi hem de erkek gruplarda ifade artışına sebep olmuştur.
2. Gen ifade düzeyinde BDNF geninde gözlemediğimiz bu anlamlı artışı western blot yönteminde de değerlendirdiğimizde benzer sonuçlar gözlemledik.
3. Çalışmamız sıçanlar üzerinde gerçekleştirilmiş ve elektromanyetik alanın yavruların ileriki yaşam dönemlerinde etkilerine hipokampus dokularından bakılmıştır. Bu çalışmaya hipokampusün etkileşimde olduğu diğer bölgeler eklenebilir ve gen ekspresyon ve protein düzeylerinde çalışılabilir.
4. Davranış testi sonuçlarına göre; dişi gruptaki sonuçlara kıyasla, erkek gruplarda daha anlamlı ölçüde anksiyete benzeri davranışlarda artış gözlemledik.
5. İleriki çalışmalarda dişi gruplarda östrus siklusu takibi yapılarak daha anlamlı sonuçlar alınabileceğini düşünmekteyiz.
6. Davranış testinde her iki grup için de denek sayısı arttırılabilir.
7. Çalışmamızın sonuçları; elektromanyetik alanın gebelikte dikkat edilmesi gereken bir unsur olduğunu, elektromanyetik alana maruz kalan annelerin çocuklarının anksiyeteye daha duyarlı olabileceğini düşündürmektedir.

KAYNAKLAR

1. **Lindsay KL, Buss C, Wadhwa PD, Entringer S.** The Interplay Between Nutrition and Stress in Pregnancy: Implications for Fetal Programming of Brain Development. *Biological Psychiatry*. **2018**.
2. <http://www.who.int/peh-emf/about/WhatisEMF/en/>
3. **Assadollahianbonab S.** 5 Hz ve 15 Hz Düşük Frekanslı Pulsu Elektromanyetik Alanların Streptozotosinin İndüklediği Sıçanlarda Periferal Nöropatiyi Tedavi Edici Etkilerinin Araştırılması. Yüksek lisans tezi. **2017**. Adana
4. <https://adaa.org/about-adaa/press-room/facts-statistics> Erişim: 04.06.2018 15:18
5. <http://www.apa.org/topics/anxiety/index.aspx> erişim: 04.06.2018 14:43
6. <https://www.anxiety.org/what-is-anxiety> Erişim: 11.06.18 20:06.
7. **Zaletel I, Filipovic D, Puskas N.** Hippocampal BDNF in physiological conditions and social isolation. *Reviewsin the Neuroscience*. **2017**; 28(6): 675–692.
8. **Markow MS.** Magnetic Field Therapy: A Review. *Electromagnetic Biology and Medicine*, **2007**;26:1–23.
9. **Hueston CM, Cryan JF, Nolan YM.** Stress and adolescent hippocampal neurogenesis: diet and exercise as cognitive modulators. *Translational Psychiatry*. **2017**; 1 – 17.
10. **Morgane PJ, Galler JR, Mokler DJ.** A review of systems and networks of the limbic forebrain/limbic midbrain. *Progress in Neurobiology*. **2005**;75:143–160.
11. **Herman JP, Ostrander MM, Mueller NK, Figueiredo H.** Limbic system mechanisms of stress regulation: Hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Progress in Neuro Psychopharmacology & Biological Psychiatry*. **2005**; (29): 1201–1213.
12. **Songur A, Özen OA, Sarsılmaz M.** Hipokampus. *T Klin J Med Sci*. **2001**;21.
13. **Çalışkan G, Stork O.** Hippocampal network oscillations at the interplay between innate anxiety and learned fear. *Psychopharmacology*, **2018**; 11-18.
14. **Zarrindast MR, Khakpai F.** The Modulatory Role of Dopamine in Anxiety-like Behavior. *Archives of Iranian Medicine*, September **2015**; 18:9.
15. **Cohen SD, Cukor D, Kimmel PL.** Anxiety in Patients Treated with Hemodialysis. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, **2016**; 11: 2250–2255.
16. **Chen X, Gerven JV, Cohen A, Jacobs G.** Human pharmacology of positive GABA-A subtype-selective receptor modulators for the treatment of anxiety. *Acta Pharmacologica Sinica*, **2018** ;0:1–12.
17. **Stefanopoulou E, Lewis D, Taylor M, Brocombe J, Larkin J.** Digitally Delivered Psychological Interventions for Anxiety Disorders: a Comprehensive Review. *Psychiatric Quarterly*, **2018**; 1-19.
18. **Köroğlu E.** Amerikan Psikiyatri Birliği, Ruhsal Bozuklukların Tanısal ve Sayımsal Elkitabı, Beşinci Baskı(DSM-5) çeviri. **2014**.
19. **Bandelow B, Michaelis S.** Epidemiology of anxiety disorders in the 21st century. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, **2015**;17:3.

20. **Crocq MA.** A history of anxiety: from Hippocrates to DSM. *Dialogues in Clinical Neuroscience.* **2015**;17: 3.
21. **Lanfume Y, Hamon M.** Central 5-HT1A Receptors: Regional Distribution and Functional Characteristics. *Nuclear Medicine & Biology,* **2000**; 27:429-435.
22. **Glikmann-Johnston Y, Salling MM, Reutens DC, Stout JC.** Hippocampal 5-HT1A Receptor and Spatial Learning and Memory. *Frontiers in Pharmacology,* **2015**; 6:289.
23. **Meneses A.** 5-HT system and cognition. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews,* **1999**; 23:1111-1125.
24. **Samuels BA, Mendez-David I, Faye C, David SA, Pierz KA, Gardier AM, Hen R, David DJ.** Serotonin 1A and Serotonin 4 Receptors: Essential Mediators of the Neurogenic and Behavioral Actions of Antidepressants. *Neuroscientist,* **2016**; 22(1): 26–45 **Craske M.G., Stein M.B.** Anxiety. *PLoS Metrics,* **2016**; 388:10063,3048–3059.
25. **Lyons MR, West AE.** Mechanisms of specificity in neuronal activity-regulated gene transcription. *Prog Neurobiol,* **2011**; 94(3): 259–295.
26. **Gallo FT, Katche C, Morici JF, Medina JH, Weisstaub NV.** Immediate Early Genes, Memory and Psychiatric Disorders: Focus on c-Fos, Egr1 and Arc. *Frontiers in Behavioral Neuroscience,* **2017**; 12:79.
27. **McReynolds, Christianson JP, Blacktop JM, Mantsch JR.** What does the Fos say? Using Fos-based approaches to understand the contribution of stress to substance use disorders. *Neurobiology of Stress,* **2018**; 9:271-285.
28. **Joo JY, Schaukowitz K, Farbiak L, Kilaru G, Kim TK.** Stimulus-specific combinatorial functionality of neuronal c-fos enhancers. *Nat Neurosci.* **2016** January ; 19(1): 75–83.
29. **Abdolmaleky HM, Thiagalingam S, Wilcox M.** Genetics and Epigenetics in Major Psychiatric Disorders : Dilemmas, Achievements, Applications, and Future Scope. *Genomics in Health and Disease,* **2005**; 5 (3): 149-160.
30. **Sperlágh B, Vizi ES.** The Role of Extracellular Adenosine in Chemical Neurotransmission in the Hippocampus and Basal Ganglia: Pharmacological and Clinical Aspects. *Current Topics in Medicinal Chemistry,* **2011**, 11, 1034-1046.
31. **Chen JF, Lee CF, Chern Y.** Adenosine Receptor Neurobiology: Overview. *International Review of Neurobiology,* **2014**; volume 119.
32. **Moura AC, Lazzari VM, Becker RO, Gil MS, Ruthschilling CA, Agnes G, Almeida S, Veiga AB, Lucion AB, Giovenardi M.** Gene expression in the CNS of lactating rats with different patterns of maternal behavior. *Neuroscience Research.* **2015**; 99: 8–15.
33. **Wu Y, Luo H, Kou H, Wen Y, Shen L, Pei L, Zhang Y, Wang H.** Prenatal caffeine exposure induced a lower level of fetal blood leptin mainly via placental mechanism. *Toxicology and Applied Pharmacology.* **2015**; 289: 109–116.
34. **Yawalkara R, Changotrab H, Gupta GL.** Protective influences of N-acetylcysteine against alcohol abstinence-induced depression by regulating biochemical and GRIN2A, GRIN2B gene expression of NMDA receptor signaling pathway in rats. *Neurochemistry International.* **2018**; 118: 73–81.

35. **Erdal ME, Yılmaz SG, Gürgül S, Uzun C, Derici D, Erdal N.** miRNA expression profile is altered differentially in the rat brain compared to blood after experimental exposure to 50 Hz and 1 mT electromagnetic field. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. **2018**; 132:35-42.
36. **Dong L, Zheng Y, Li ZY, Li G, Lin L.** Modulating effects of on-line low frequency electromagnetic fields on hippocampal long-term potentiation in young male Sprague-Dawley rat. *J Neuro Res*. **2018**;96:1775–1785.
37. **He L, Shi H, Liu T, Xu Y, Ye K, Wang S.** Effects of extremely low frequency magnetic field on anxiety level and spatial memory of adult rats. *Chin Med J*. **2011**;124(20):3362-3366.
38. **Cao YN, Zhang Y, Liu Y.** Effects of exposure to extremely low frequency electromagnetic fields on reproduction of female mice and development of offsprings, **2006** ;24(8):468-70.
39. **Hove VD , Steinbusch HW, Scheepens A, Berg VD, Kooiman LA, Boosten BJ, Prickaerts J, Blanco CE.** Prenatal Stress and Neonatal Rat Brain Development. *Neuroscience* .**2006**;137:145–155.
40. **Mah L, Szabuniewicz C, Fiococ AJ.** Current Opinion.Can anxiety damage the brain? **2016**;29(1).
41. **Albert PR, Fiori LM.** Transcriptional Dys-regulation in Anxiety and Major Depression:5-HT1A Gene Promoter Architecture as a Therapeutic Opportunity. *Curr Pharm Des*. **2014** ; 20(23): 3738–3750.
42. **Savitz J, Lucki I, Drevets WC.** 5-HT(1A) receptor function in major depressive disorder.*Prog Neurobiol*. **2009**;88(1):17-31.
43. **Mattson MP, Maudsley S, Martin B.** BDNF and 5-HT: a dynamic duo in age-related neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. *Trends in Neurosciences*. **2004**; (27)10:589-594.
44. **Murakami S, Imbe Y, Kubo C, Senba E.** Chronic stress, as well as acute stress, reduces BDNF mRNA expression in the rat hippocampus but less robustly. *Neuroscience Research*, **2005**;(53):129–139.
45. **Boersma GJ, Lee RS, Cordner ZA, Ewald ER, Purcell RH, Moghadam AA, Tamashiro KL.** Prenatal stress decreases Bdnf expression and increases methylation of Bdnf exon IV in rats. *Epigenetics*. **2014**;9(3):437–447.

ÖZGEÇMİŞ

1 Eylül 1990 yılında Adana'nın Seyhan ilçesinde doğdu. İlkokula Celalettin Sayhan İlköğretim Okulunda başlayıp Ziyapaşa İlköğretim okulunda ortaokul eğitimini tamamladı. Lise eğitimini Adana Borsa Anadolu lisesinde 2007 yılında tamamladı. 2009-2013 yılları arasında Çukurova Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde okudu. 2014 yılında pedagojik formasyon eğitimini Aksaray Üniversitesinden aldı. İkinci üniversite programı kapsamında 2014 yılında Anadolu Üniversitesi Sağlık Kurumları İşletmeciliği bölümünü bitirdi. 2016 yılında Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans programına başladı.