

T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

PRE- VE POSTNATAL DÖNEMDE STRESE MARUZ KALAN
YÜKSEK VEYA DÜŞÜK ANKSİYETELİ SIÇANLARDA,
PREFRONTAL KORTEKSTEKİ NÖRONLARIN MORFOLOJİK
ÖZELLİKLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Dr. Erdem SÖZTUTAR

Anatomi Anabilim Dalı
TIPTA UZMANLIK TEZİ

ESKİŞEHİR
2013

**T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**PRE- VE POSTNATAL DÖNEMDE STRESE MARUZ KALAN
YÜKSEK VEYA DÜŞÜK ANKSİYETELİ SIÇANLARDA,
PREFRONTAL KORTEKSTEKİ NÖRONLARIN MORFOLOJİK
ÖZELLİKLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

Dr. Erdem SÖZTUTAR

**Anatomi Anabilim Dalı
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Emel ULUPINAR**

**ESKİŞEHİR
2013**

TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI

T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI'NA,

Dr. Erdem SÖZTUTAR'a ait "Pre- ve postnatal dönemde strese maruz kalan yüksek veya düşük anksiyeteli sıçanlarda, prefrontal korteksteki nöronların morfolojik özelliklerinin karşılaştırılması" adlı çalışma jürimiz tarafından Anatomi Anabilim Dalı'nda Tıpta Uzmanlık Tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Tarih: 13.09.2013

Jüri Başkanı	Prof. Dr. Emel ULUPINAR Anatomi Anabilim Dalı
Üye	Prof. Dr. Ferruh YÜCEL Anatomi Anabilim Dalı
Üye	Prof. Dr. Hilmi ÖZDEN Anatomi Anabilim Dalı

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Fakülte Kurulu'nun ... / ... 2013
Tarih ve Sayılı Kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Hüseyin İLHAN
Dekan Vekili

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca bana yol gösteren Anabilim Dalımız öğretim üyelerinden Prof. Dr. Ferruh YÜCEL, Prof. Dr. Nedim ÜNAL, Prof. Dr. Hilmi ÖZDEN, Prof. Dr. Yüksel AYDAR, Doç. Dr. Gül GÜVEN ve Yrd. Doç. Dr. Hakan AY'a; tez çalışmalarım esnasında laboratuvar imkanlarını kullanmama izin veren Farmakoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Kevser EROL'a; istatistiksel analizlerdeki yardımlarından dolayı Yrd. Doç. Dr. Ertuğrul ÇOLAK'a; banaengin bilgi ve beceri kazandıran değerli danışmanım Prof. Dr. Emel ULUPINAR'a sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım. Bu tez TÜBİTAK, 1002 hızlı destek programı (112S010) ve ESOGÜ BAP C1 projesi (201211C102) bursları ile desteklenmiştir.

ÖZET

Söztutar, E. Pre- ve postnatal dönemde strese maruz kalan yüksek veya düşük anksiyeteli sıçanlarda, prefrontal kortekste ki nöronların morfolojik özelliklerinin karşılaştırılması. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi Anabilim Dalı Tıpta Uzmanlık Tezi, Eskişehir, 2013. Gelişim dönemindeki stres maruziyeti, fetüsün beyin gelişimini olumsuz yönde etkileyerek bireylerin yatkınlık derecelerine göre farklı psikopatolojik süreçlerin gelişimine neden olabilmektedir. Kişiliği belirleyen ve davranışlarla ilgili hayati rol oynayan merkezler prefrontal korteks (PFK)'te bulunmaktadır. Bu tez çalışmasında, erken gelişim evrelerinden itibaren strese maruz kalan sıçanların PFK'deki nöronlarında meydana değişiklikler tarafsız stereolojik sayım yöntemleriyle incelenmiş ve yavruların emosyonel durumlarıyla olan ilişkisi araştırılmıştır. Prenatal ve postnatal dönemlerde strese maruz bırakılan sıçanların anksiyete düzeyinde meydana gelen değişiklikler ve depresyona yatkınlık düzeyleri değerlendirildikten sonra, nöronların strese karşı verdikleri yanıtın derecesi *c-Fos* immunohistokimyası ile incelenmiştir. Erken yaşam stresine maruz kalan dişi ve erkek sıçanların medial PFK'deki toplam *c-Fos* (+) nöron sayıları kontrol gruplarına göre anlamlı düzeyde yüksek olarak bulunmuştur. Erkek sıçanların anksiyete düzeyi ile toplam *c-Fos* (+) nöron sayısı arasında pozitif bir korelasyon saptanırken, depresyona yatkınlık düzeyleri ile negatif bir korelasyon saptanmıştır. Dişilerde ise anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. Golgi-Cox yöntemiyle boyanan piramidal nöronların dendritik kompleksitesinde ve dikensi çıkıntı yoğunluğunda da anlamlı yapısal değişiklikler gözlenmiştir. Stres maruziyeti, apikal dendritler üzerindeki dikensi çıkıntıların morfolojik özelliklerinde, yavruların anksiyete düzeyleri ile bağlantılı olarak değişikliklere neden olmuştur. Nöronlarda gözlenen bu yapısal değişiklikler, sinaptik plastisite kapasitesini olumsuz etkileyerek psikopatolojik bozuklukların gelişmesine zemin hazırlayabilir.

Anahtar Kelimeler: Stres, prefrontal korteks, *c-Fos*, optik parçalama, anksiyete

Destekleyen Kurumlar: TÜBİTAK – 1002 (112S010); ESOGÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu - (201211C102)

ABSTRACT

Soztutar, E. Eskişehir Osmangazi University, Faculty of Medicine, Comparison of morphological features of neurons in the prefrontal cortex of rats having high or low anxiety, following exposure to stress during pre- and postnatal periods. Speciality Thesis in Department of Anatomy, Eskişehir, 2013.

Exposure to stress during development adversely affects the brain development of fetus and might lead to the development of psychopathological processes that vary according to stress predisposition of individuals. Centers playing a crucial role in determining an individual's personality and behavior are found in the prefrontal cortex (PFC). In this thesis study, changes occurring in neurons of the PFC of rats exposed to stress from their early developmental stages were investigated by unbiased stereological counting methods and their relation with the emotional status of the offspring was examined. Following the evaluation of anxiety and depression susceptibility levels of the offspring, response of neurons to stress was examined by using *c-Fos* immunohistochemistry. In male and female rats exposed to early life stress, total number of *c-Fos* (+) neurons in the medial PFC was significantly higher than those of control groups. There was a positive correlation between the total number of *c-Fos* (+) neurons and anxiety levels of male rats, whereas a negative correlation with the susceptibility to depression levels. No significant differences were observed in females. Significant structural changes were also observed in the dendritic complexity and spine density of pyramidal neurons stained with Golgi-Cox method. Depending on the anxiety level, early life stress exposure caused to changes in the morphological properties of spiny protrusions on the apical dendrites. These structural changes observed in neurons might predispose to the development of psychopathological disorders by adversely affecting the synaptic plasticity capacity.

Key Words: Stress, prefrontal cortex, *c-Fos*, optic fractionator, anxiety

Supported by: TUBITAK – 1002 Grant (112S010); ESOGU Commission of Scientific Research Projects (201211C102)

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
TABLOLAR DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
1.1. Prefrontal Korteks	1
1.2. <i>c-Fos</i> Geni ve Ürünü	2
1.3. Dendrit Morfolojisi	3
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Stres Maruziyetinin Etkileri	4
2.2. Prefrontal Korteks	8
2.3. <i>c-Fos</i> Aktivitesi	12
2.4. Morfometrik Yöntemler	13
2.5. Dikensi Çıkıntılar	14
3. GEREÇ VE YÖNTEM	17
3.1. Deney Hayvanlarının Seçimi ve Grupların Oluşturulması	17
3.2. Lokomotor Aktivitenin Karşılaştırılması	17
3.3. Yükseltilmiş Artı Labirent Testi	19
3.4. Zorlu Yüzme Testi	21
3.5. Dokuların Hazırlanması	22
3.6. İmmunohistokimyasal Boyamalar	22
3.7. Sayısal Analizler	23
3.8. Golgi-Cox Boyama	24
3.9. İstatistiksel Analizler	26
4. BULGULAR	27
4.1. Lokomotor Aktivite Düzeylerinin Karşılaştırılması	27

	Sayfa
4.2. Anksiyete Benzeri Davranış Düzeylerinin Karşılaştırılması	30
4.3. Depresyona Yatkınlık Düzeylerinin Karşılaştırılması	33
4.4. Stres Karşısında Aktive Olan Nöronların Sayısal Analizi	34
4.5. Nöronal Aktivasyon ile Emosyonel Göstergelerin Korelasyonu	37
4.6. Kortikal Nöronların Dendritik Analizi	37
5. TARTIŞMA	47
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	55
KAYNAKLAR	57

SİMGELER VE KISALTMALAR

ACTH	Adrenokortikotropik hormon
AMPA	Alfa-amino-3-hidroksi-5-metik-4-isoksazolpropionik asit
AP-1	Aktive edici protein-1
asf	Alan örnekleme payı (<i>area sampling fraction</i>)
ATF	Aktive edici transkripsiyon faktörü
BAP	Bilimsel araştırma projeleri komisyonu
BDNF	Beyin kökenli nörotrofik faktör
CA1	Cornu Ammonis-1
CE	Hata katsayısı (<i>Coefficient of Error</i>)
CRH	Kortikotropin serbestleştirici hormon
CRH-BP	Kortikotropin serbestleştirici hormon-bağlayıcı protein
D	Dişi
DA	Düşük anksiyete
d _h	Dikensi çıkıntı başının uzunluğu
d _n	Dikensi çıkıntı boynunun uzunluğu
DNA	Deoksiribonükleik asit
E	Erkek
ESOGÜ	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
GABA _A	Gamma-aminobütirik asit-A
GR	Glukokortikoid reseptörü
h	Optik disektör sonda yüksekliği
HADYEK	Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
HPA	Hipotalamo-pituiter-adrenokortikal
IR	Kızılötesi (<i>infrared</i>)
K	Kontrol
LTD	Uzun süreli depresyon
LTP	Uzun süreli potansiasyon
M	Molar
MBF	MicroBright Field
MR	Mineralokortikoid reseptörü

NE	Norepinefrin
NGF	Sinir büyüme faktörü (<i>nerve growth factor</i>)
NMDA	N-metil-D-aspartik asit
n.s.	Anlamlı değil (<i>not significant</i>)
P	Postnatal
PBS	Fosfat tamponlu salin
PEK	Proenkephalin
PFK	Prefrontal korteks
S	Stres
SPSS	Statistical Package for Social Sciences, paket istatistik programı
ssf	Kesit örnekleme payı (<i>section sampling fraction</i>)
t	Ortalama kesit kalınlığı
TH	Tirozin hidroksilaz
TİCAM	Tıbbi-Cerrahi Deneysel Araştırma Merkezi
TRE	Tetradecanol phorbol acetate response element
TÜBİTAK	Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu
YA	Yüksek anksiyete
ZYT	Zorlu yüzme testi
°C	Derece santigrad
µm	Mikrometre
ΣQ	Sayılan toplam nükleus sayısı
5-HT	5-hidroksitriptamin

ŞEKİLLER

	Sayfa
2.1. Sağ hemisferdeki medial prefrontal korteks bölgesi	10
2.2. Dikensi çıkıntılarının morfolojik tiplendirme kriterleri	15
3.1. Prenatal ve postnatal stres protokolü uygulaması	18
3.2. Lokomotor aktivite ölçüm sistemi	18
3.3. Yükseltilmiş artı labirent düzeneği	20
3.4. Zorlu yüzme testinde gözlenen davranışlar	20
3.5. Optik parçalama yönteminin temel basamakları	25
4.1. Anksiyete benzeri davranışların karşılaştırılması	32
4.2. Depresyona yatkınlık düzeylerinin karşılaştırılması	33
4.3. <i>c-Fos</i> (+) nöronların fotomikrografileri	34
4.4. PFK'deki <i>c-Fos</i> (+) nöronların sayısal yoğunluklarının ve toplam sayılarının karşılaştırılması	36
4.5. Nöronal aktivasyon düzeyi ile emosyonel göstergelerin korelasyon analizi	38
4.6. Kortikal piramidal nöronların dendritik analizi	39
4.7. Dendrit uzunluklarının karşılaştırılması	40
4.8. Dendrit kompleksitelerinin karşılaştırılması	42
4.9. Dikensi çıkıntılarının tiplerinin belirlenmesi	43
4.10. Dikensi çıkıntı yoğunluklarının karşılaştırılması	45
4.11. Farklı tipteki dikensi çıkıntı oranlarının dağılımı	46

TABLÖLAR

	Sayfa
4.1. P30. gündeke spontan lokomotor aktivite düzeyleri	28
4.2. P60. gündeke spontan lokomotor aktivite düzeyleri	29
4.3. Anksiyete ve depresyon benzeri davranış düzeyleri	31
4.4. PFK'deki nöron aktivasyonu düzeyleri ve dendrit morfolojisi	35

1. GİRİŞ

Erken yaşam olayları ile epigenetik faktörlerin etkileşimi, bireyin genetik yatkınlık düzeyinde değişikliklere neden olarak kalıcı fenotipin oluşmasında rol oynamaktadır (1). Oluşan bu fenotipin niteliği, yani bireysel stres yanıtı, olumsuz yaşam olaylarının nöronların yapılarında ve işlevlerinde meydana getirdiği kalıcı değişikliklere paralel olarak ortaya çıkmaktadır (2). Stres maruziyetinin bilişsel ve psikiyatrik bozukluklar üzerindeki etkilerini araştıran hayvan ve insan çalışmaları gün geçtikçe artış göstermektedir. Ancak, emosyonel değişikliklerin temelinde yatan yapısal bozuklukların incelendiği morfolojik çalışmalar göreceli olarak daha sınırlı sayıdadır. Deney hayvanları üzerinde yapılan çalışmalar; stresörlerin dozuna, süresine, şiddetine ve zamanlamasına müdahale etmeye imkan vermesi bakımından, beynin farklı bölgelerindeki nöronlarda oluşan morfolojik ve fizyolojik değişikliklerin açığa çıkarılmasında son derece elverişlidir (3, 4). Bu tez çalışmasında, doğum öncesi ve sonrası dönemlerde strese maruz kalan sıçanlarda, prefrontal kortikal alandaki nöronlarda meydana gelen morfolojik değişiklikler araştırılmıştır.

1.1. Prefrontal Korteks

İnsan beynindeki en geniş kortikal alan olan prefrontal korteks (PFK), bireyin kişiliğini belirleyen ve davranışlarıyla ilgili hayati rol oynayan bir merkezdir. Burası aynı zamanda dikkatin sürdürülmesi, zihinsel faaliyetlerin amaca yönelik olarak düzenlenmesi, karmaşık davranışları planlama, duyguların ve işlevlerin toplumsal kurallara göre kontrolü, beklentilerin oluşturulması, iyi – kötü ayrımı, konuşma kabiliyeti, anlamsal ve kısa süreli bellek ile işleyen bellek gibi çok geniş bir yelpazede yer alan kognitif fonksiyonlarla ilgili merkezleri de içermektedir (5-7).

Son yıllarda fonksiyonel görüntüleme teknikleriyle yapılan çalışmalarda; şizofreni, bipolar bozukluk, hiperaktivite – dikkat eksikliği hastalığı, depresyon, tekrarlanan strese karşı bozuk yanıt, intihara, suça ve madde bağımlılığına eğilim gibi pek çok patolojik duruma, PFK'deki hacimsel değişiklikler ile içerdiği nöronların sayılarındaki ve bağlantılarındaki bozuklukların eşlik ettiği gösterilmiştir (6, 8-14). Bu bölgede meydana gelen morfolojik değişiklikleri inceleyen deneysel çalışmalarda da, özellikle prenatal dönemde maruz kalınan stresin PFK'deki

nöronları cinsiyete bağlı olarak farklı şekilde etkilediğine işaret edilmektedir (15-17). Ancak, stres maruziyeti sonrasında PFK'deki nöronlarda meydana gelen yapısal değişiklikler ile bireyin emosyonel göstergeleri arasında bir korelasyon olup olmadığı henüz bilinmemektedir. Bu nedenle bu tez çalışmasında, PFK'nin gelişimi esnasında strese maruz kalan sıçanların nöronlarında meydana gelen yapısal ve işlevsel değişikliklerin tarafsız stereolojik sayım yöntemleri kullanılarak değerlendirilmesi ve yavruların emosyonel durumları ile olan ilişkilerinin analiz edilmesi amaçlanmıştır.

1.2. *c-Fos* Geni ve Ürünü

Stresin nöronal yapılardaki uzun dönemli etkilerinin ortaya çıkmasında hücre içi gen transkripsiyonundaki değişiklikler etkili olmaktadır. Özellikle *c-Fos* ve *c-Jun* gibi “en erken genler” [(IEG) *immediate early genes*] olarak adlandırılan bir grup transkripsiyon etmeninin kodladığı DNA bölgelerindeki gen ekspresyonu değişiklikleri; uyarılmayı takiben dakikalar içinde ortaya çıkabilmektedir. Bu değişikliğin yol açtığı etkiler kısa dönemde nörotransmitter, peptit ve reseptör düzeylerindeki değişikliklere neden olurken; uzun dönemde de yapısal değişikliklere neden olmaktadır (18). *c-Fos*'un kodladığı protein, homodimer (benzer yapıda olan iki proteinin oluşturduğu) özellikte bir proteindir ve kendisiyle ya da diğer transkripsiyon etmeni proteinlerle birleşip heterodimer (farklı yapıda iki proteinin oluşturduğu) bir yapı oluşturmaktadır. Bu heterodimer yapı DNA bölgesine bağlandığında diğer protoonkojenlerin (hücre siklusunda bölünmenin devam etmesini sağlayan gen) tek başına gösterdiği etkiden daha fazla bir etki göstermektedir. Oluşan bu yapı hücre çekirdeğindeki AP-1 (aktivatör protein) DNA bölgesine taşınarak diğer protein ve peptitlerin sentezini başlatmaktadır. Bu sentezlenen peptit ve proteinler arasında, anksiyete bozuklukları ve afektif bozukluklarının nörobiyolojisi ile ilgili olan kortikotropin serbestleştirici hormon (CRH), glukokortikoid reseptörleri ve nörotrofik faktörler de yer almaktadır (19). Literatürde *c-Fos* immunohistokimyası, merkezi sinir sisteminde nöronal aktivitenin fonksiyonel göstergesi olarak yaygın bir şekilde kullanılmakla birlikte; PFK'de stres akabinde aktive olan nöronların sayısal yoğunluklarının hesaplandığı çalışmalar yok denecek kadar azdır (20). Bu nedenle çalışmamızda, stereolojik yöntemler aracılığıyla *c-Fos* proteinini ifade eden nöronların toplam sayısına ulaşılarak,

nöronların stres yapıcı uyarılar karşısında vereceği yanıtın derecesinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

1.3. Dendrit Morfolojisi

Nöronlarda meydana gelen yapısal değişikliklerin detaylı bir şekilde analiz edilebilmesi için, en klasik boyama yöntemlerden biri olan Golgi-Cox tekniği kullanılarak, dendritik kompleksite düzeyleri ve dendritik dallanmalar üzerindeki dinamik değişiklikler incelenmiştir. Dendritik dallar üzerinde bulunan dikensi çıkıntılar, yüzey alanını arttıran ve beyindeki tüm uyarıcı hücreler arası iletişimin %90'ından fazlasını işleten yapılardır. Son yıllarda multi-foton lazer tarayıcı mikroskopi tekniği kullanılarak yapılan araştırmalarda bu çıkıntıların yapısal özellikleri ile işlevleri arasında sıkı bir bağlantı olduğu ortaya çıkarılmıştır (21). Bu çıkıntıların morfolojik özelliklerinde ve büyüklüklerinde meydana gelen değişikliklerin sinapslardaki biyokimyasal ve elektriksel aktivite düzeyini etkilemek suretiyle sinaptik bağlantıların gücünü değiştirebildiği gösterilmiştir. Yine nöronların dendritik dallanma paternlerinde gözlenen değişiklikler de nöronların sinaptik bağlantı düzeylerini yansıtmaktadır. Piramidal nöronların dendritik ağacının kompleksite düzeyi arttıkça, bilgi depolama ve sinaptik plastisite kapasitesinin de arttığı bildirilmektedir (22). Kronik stres maruziyetinin ise, glukokortikoid reseptörlerinin yoğun olarak bulunduğu PFK ve hippocampus bölgelerinde bulunan nöronlar üzerinde değişikliklere yol açtığı ve dendritik dallanmayı azaltarak plastisite kapasitesini etkilediği gösterilmiştir (17). Literatürde, dendritlerde meydana gelen yapısal değişikliklerin anksiyete düzeyi ile ilişkisini gösteren bir çalışmaya rastlanmadığından; çalışmamızda yüksek ve düşük anksiyete seviyesine sahip olan sıçanların nöronlarındaki dikensi çıkıntı tipolojisinin belirlenerek, anksiyete düzeyleriyle ilişkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

İnsanlarda psikososyal streslere ilişkin değişkenler geniş bir çeşitlilik göstermekte, bu değişkenler aile yapısı ve çevresel faktörler tarafından farklı şekillerde etkilenmekte ve stres etkenlerinin başlama zamanı, şiddeti, sıklığı, süreğenliği gibi pek çok parametrelerine müdahale etmek etik açıdan mümkün olmamaktadır. Oysa deney hayvanları üzerinde yapılan prelinik çalışmalarda, stres etkenleri ve maruziyet derecesi değiştirilmek suretiyle, beyinde en fazla hangi bölgelerin, ne şekilde etkilendiğini incelemek mümkündür.

2.1. Stres Maruziyetinin Etkileri

Annenin gebelik süresince maruz kaldığı stresin çocuklarda entelektüel kapasitenin ve dil kabiliyetlerinin azalmasına neden olduğu bilinmektedir (4). Bunların yanı sıra çocuklarda görülen dikkat eksikliği, şizofreni, kaygı bozuklukları ve depresyon gibi hastalıklar da prenatal stres ile ilişkilendirilmiştir (23-26).

Maternal stres sonucu annenin ürettiği stres hormonları olan katekolaminler, kortikotropin serbestleştirici hormon (CRH=*Corticotrophin-releasing hormone*) ve adrenal steroidler, plasentadan geçerek fetal gelişim üzerine etki gösterebilir. Fetüs hızlı büyüdüğü için hormonal çevredeki değişikliklere karşı daha hassastır (27).

Hipotalamo-pituiter-adrenokortikal (HPA) aksının esas düzenleyicisi olan CRH stres anında, hipotalamusun nucleus paraventricularis'inden hipofizin portal dolaşımına salınır. CRH'ye yanıt olarak ön hipofizden adrenokortikotropik hormon (ACTH=*adrenocorticotropic hormone*) ve β -endorfin dolaşıma verilir. Dolaşımdaki ACTH ve CRH adrenal kortekse etki ederek plazmadaki kortizol miktarının artmasını sağlar (27, 28). HPA aksının aktifleşmesi ile hem farklı beyin bölgelerinde hem de plazmada norepinefrin (NE) konsantrasyonu artmakta ve sempatik sistem etkileri belirginleşmektedir (29). Uzun süreli kortizol maruziyetinin zararlı etkilerinden korunmak için kortizol; hipofiz, hipotalamus, hippocampus ve prefrontal kortekste reseptörlerine bağlanarak, negatif geri bildirim ile HPA döngüsünü kapatabilir (28). Gebelerin stres yanıtlarının düzenlenmesinde de HPA aksı üzerinden etki gösteren CRH salınır (27). Strese yanıt olarak sentezlenen plasental CRH; hem annede, hem de fetüs üzerinde etki gösterir (30).

Gebelik boyunca CRH'nin plazma konsantrasyonları hızla artmaktadır (31) ancak etkileri CRH-bağlayıcı protein (CRH-BP) sayesinde engellenmektedir. Doğum yaklaştığında CRH-BP azalır ve serbest CRH artar. Bunun sonucu plazma ACTH ve β -endorfin seviyeleri yükselir. ACTH ve β -endorfin'in aksine hem anne hem de bebekteki plazma kortizolü gebelik boyunca CRH etkisi ile artmaya devam eder (27).

Kortizol'ün dahil olduğu glukokortikoid ailesi etkilerini intraselüler glukokortikoid reseptörü (GR) veya mineralokortikoid reseptörleri (MR) üzerinden gösterir. GR'ler beyinde çok çeşitli bölgelerde bulunabilir ve beyindeki esas görevi CRH'nin negatif geri bildirimini düzenlemektir. Ancak MR'ler yoğun olarak hipokampus'te bulunur ve hafıza, öğrenme gibi işlevlerin düzenlenmesinde önemlidir (4). Stres altındaki gebelerde kortizol, kortikosteron, ACTH, aldosteron ve katekolamin seviyelerinin yükseldiği bilinmektedir. Bu hormonlara uzun süreli maruziyet sonucu hem endokrin hem de nöronal değişiklikler gözlenebilmektedir.

Gebelik sürecinde maruz kalınan stres, birkaç farklı mekanizma aracılığıyla fetüsün beyin gelişimini ve davranış parametrelerini olumsuz yönde etkilemektedir. Bunlardan ilki, stresin hipotalamo-pituitar-adrenokortikal (HPA) aksın negatif geribildirim regülasyonunda oluşturduğu bozukluklar ve glukokortikoid düzeylerindeki artış nedeniyle meydana getirdiği etkileridir (32). Kemirgenlerin farklı yöntemlerle strese maruz bırakılması sonucunda, HPA aksında meydana gelen aktivasyon derecesine göre stres hormonları salınımında kalıcı değişiklikler ortaya çıkmaktadır (4). Bu hayvanlarda *eminencia mediana*'da, portal kan ve beyin-omurilik sıvısında CRH düzeylerinde artış olduğu ve bunun da plazma kortikosteron düzeylerini anlamlı olarak arttırdığı saptanmıştır. Bu durum, hipokampal glukokortikoid reseptörlerinde azalmaya neden olarak, sonuçta HPA ekseninde negatif geribildirim sonucu oluşan inhibisyonunun bozulmasına yol açmaktadır (3). Serbest CRH'nin yükselmesi erken doğumu tetikleyebilir (4). HPA aksının aşırı çalışması sonucu yavrularda düşük doğum ağırlıkları ve artmış insülin direnci nedeniyle diabetes mellitus'a yatkınlık oluşmaktadır (33).

Bir diğer mekanizma, monoaminerjik yolların aktivitesindeki değişikliklere bağlı olarak gelişmektedir (34). Hipokampus ve prefrontal kortekse uzantılar veren serotonerjik, dopaminerjik ve noradrenerjik nöronlarda ve reseptör düzeylerindeki kalıcı değişikliklere ek olarak, GABAerjik nörotransmisyonunda da işlev bozuklukları

meydana gelmektedir (35). Serotonin (5-HT=5-hidroksitriptamin) embriyonik nöral gelişim sırasında ve özellikle agresif davranışların düzenlenmesi kısmında hayati bir rol oynamaktadır (36). 5-HT'nin erken gelişim aşamalarında inhibe edilmesi erişkinlikte duygusal davranışların bozulmasına neden olmaktadır (37). 5-HT anksiyete, obsesif-kompulsif bozukluk, otizm ve anoreksia nervosa gibi patolojilerden sorumlu tutulmaktadır (38). Prenatal dönemde stres hormonlarına maruz kalınması sonucu adolesan döneminde neokorteks, hippocampus, hipotalamus, diencephalon ve beyin sapı bölgelerinde 5-HT döngüsünde belirgin azalma saptanmıştır. Erişkinlikte ise hipotalamus, diencephalon ve beyin sapında 5-HT yoğunluğunun arttığı saptanmıştır (39). Dopamin duygu durumun, motivasyonun ve ödül yanıtlarının düzenlenmesinde önemlidir (40). Prenatal stres sonucu özellikle *corpus striatum*'da belirgin bir dopamin azalması ve buna bağlı olarak davranış bozuklukları gözlenmiştir (40). Prenatal stres sonrasında *corpus striatum*'da dopamin-2 reseptörlerinin azalması medial PFK'de dopaminin artmasına ve işleyen bellek bozukluklarına neden olmaktadır (41). Kronik stres maruziyeti PFK'de norepinefrin (NE) yanıtının artmasına neden olmaktadır. NE yanıtının fazla olması kortekste piramidal nöronların dikensi çıkıntılarında kayıp ve dendritlerinde atrofiye neden olmaktadır (14). Ayrıca prenatal stres sonucu dopamin ile NE arasındaki denge bozulmakta ve beyin ileri dönemdeki stresörlere karşı daha canlı yanıtlar vermektedir (42). Benzer bir denge, gelişen beyindeki GABA_A ile santral benzodiazepin reseptörleri arasında görülmektedir. Erken yaşam stresinin bu reseptör sisteminde oluşturduğu değişikliklerin strese karşı oluşturulan davranış yanıtını etkilediği düşünülmektedir (35).

Üçüncü mekanizma, sempatoadrenal sistemdeki aktivite artışı ve plasental kan akımındaki azalma sonucunda oluşan gelişim geriliği, düşük doğum ağırlığı ve erken doğum komplikasyonlarına bağlı olarak meydana gelmektedir (33, 43). Gebeliğin son trimester'inde daha kaygılı olan kadınların uterus kan akımı azalmakta ve fetüs üzerinde başka bir stres faktörü oluşturmaktadır. Sempatik sistem aktivasyonunun bir bulgusu olarak fetüsün kalp atım hızı ve kan basıncı yükselmektedir (44). Erken yaşamda stres hormonlarına yüksek dozlarda ya da uzun sürelerde maruz kalmak sempatik sistemin programlanmasını değiştirmektedir. Bu sayede erken yaşam stresine maruz kalanların erişkin yaşlarında hipertansiyon ve

diabetes'e yatkınlık gibi sistemik etkiler gözlenmekte ve strese karşı uzamış sempatik cevap vermektedirler (45).

Normal gebelikte artış gösteren HPA aktivitesinden anneyi korumak için oksitosin ve prolaktin sistemleri inhibitör etki göstermektedir. Bu sayede özellikle doğum yaklaşırken artan CRH'nin anne üzerinde olumsuz etkileri dengelenmekte ve annenin çocuk bakımı için sakin kalması sağlanmaktadır. Bu sistemin kronik stres yüzünden bozulması durumunda, annede doğum esnasında duygu bozuklukları ve post-partum depresyon gözlenebilir (46).

Bu etkilerin yanı sıra anksiyete belirtileri yaşayan annelerde; sigara, alkol kullanımı, madde bağımlılığı, uyku bozuklukları, perinatal takiplere gelmeme, beslenme ve bağışıklık sistemindeki yetersizlikler gibi bir takım sağlıksız davranışlara bağlı olarak gelişen olumsuz etkiler de görülebilmektedir. Tüm bu olumsuz etkiler sonuçta fetüsün daha sonra karşılaşacağı yaşam olaylarındaki stres hassasiyetini arttırmakta ve bireysel yatkınlık düzeylerine göre, uzun vadede psikopatolojik süreçlerin görülme sıklığını arttırmaktadır (47).

Annedeki aşırı stres hormonları, yavrularda mineralokortikoid reseptörlerinin normal dağılımı ve etkinliğini etkileyebilir. HPA aksının geri bildiriminden sorumlu olan glukokortikoid reseptörleri de prenatal stresten etkilenmektedir. Özellikle PFK'de saptanan dopamin artışı, stres sonrası aşırı HPA aksı aktivasyonuna katkıda bulunmaktadır. Ayrıca prenatal strese maruz kalan bireylerin bazal şartlardaki 24 saatlik toplam kortizolü de yüksek bulunmaktadır (4).

Afektif ve anksiyete bozukluklarının altında, gelişim sırasında önbeyin limbik devrelerinin yanlış programlanması olduğu düşünülmektedir (4). Bu durum sıklıkla HPA aksının hiperaktivitesi ile birlikte. Depresyon hastalarının büyük bir kısmında deksametazon baskılama testi ile HPA aksının baskılanamaması bu bireylerde hiperkortizolizm'in bulunduğu ve HPA aksı geri bildirimin duyarlılığının azaldığının bir göstergesidir (48).

Prenatal stres maruziyeti erişkinlerde kronik anksiyeteye neden olabilir. Prenatal stres varlığında yavruların hippocampus ve amigdala'sındaki benzodiazepin reseptörlerinin azaldığı ve anksiyete benzeri davranışların arttığı gösterilmiştir (49). Strese karşı otonomik yanıtları düzenleyen amigdala'da CRH sinir sonlanmaları ve

reseptörleri bulunmaktadır. Prenatal strese uğrayan bireylerde bu amigdal yolun daha aktif çalıştığı gösterilmiştir (4).

2.2. Prefrontal Korteks

Erken gelişim dönemlerinde meydana gelen olumsuz koşulların, nöronal işlevlerde ve adaptif yanıtların oluşturulmasında bozukluklara neden olduğuna işaret edilmesine rağmen, bu bozuklukların altında yatan morfolojik değişiklikleri ortaya koyan çalışmalar oldukça sınırlı sayıdadır. Bu çalışmaların büyük bir çoğunluğunda, nöroenezisi erişkin yaşamda da devam eden, sinaptik plastisite kapasitesi çok yüksek olan, öğrenme ve hafıza fonksiyonlarında kritik rol oynayan hippocampus bölgesi üzerinde yoğunlaşmıştır (50). Halbuki beynin yürütücü ya da yönetsel olarak adlandırılan, daha üst düzey ve entelektüel işlevlerinden sorumlu olan bölümü kortektir. Tüm korteksin yaklaşık %30'luk bir kısmını oluşturan PFK, bireyin kişiliğini belirleyen ve davranışlarıyla ilgili hayati rol oynayan merkezleri içermektedir.

PFK'de filogenetik açıdan iki farklı bölge bulunmaktadır (51). Basoventral kısımlar, olfaktor bölümler ile ortak kökenden gelmektedir. Mediodorsal kısımlar ise *corpus callosum*'dan başlayarak frontal lobun mediali çevresine yayılmıştır (52). Filogenetik kökeni açısından eski olan basoventral bölgelerde granüler tabaka bulunmamaktadır. Ancak anterior ve laterale ilerledikçe daha yeni bölgelerde granüler tabaka (IV. tabaka) oluşmaktadır (53).

PFK'yi oluşturan nöron öncül hücreleri, tıpkı diğer kortikal hücreler gibi, embriyoda erken dönemde oluşur ve postnatal dönemlerde hatta erişkin hayatta bile gelişimlerini devam ettirirler. Hayatın erken dönemlerinde gereğinden çok nöron ve nöronal bağlantı bulunmaktadır. Bu bağlantılar, nöral aktivite sayesinde yeniden şekillendirilir. Çocukluk döneminde nöronların sinaps sayısı ile orantılı olan dendrit üzerindeki dikensi çıkıntıların yoğunluğu, erişkinlere oranla iki veya üç kat fazladır (5). Özellikle PFK'deki dikensi çıkıntılar ergenlik ve genç erişkinlik dönemine kadar aşırı miktarda üretilmeye ve eş zamanlı olarak ortadan kaldırılmaya devam etmektedir. (54). Bebeklik ve çocukluk çağlarında PFK'deki temel nöral devrelerin oluşumu büyük oranda tamamlanmakta ve nihai bilişsel işlevler oluşmaya başlamaktadır (55). PFK'deki sinaptik bağlantıların stabilizasyonu, beynin diğer kortikal bölgelerine göre çok daha geç dönemlerde görülmektedir. Bu nedenle

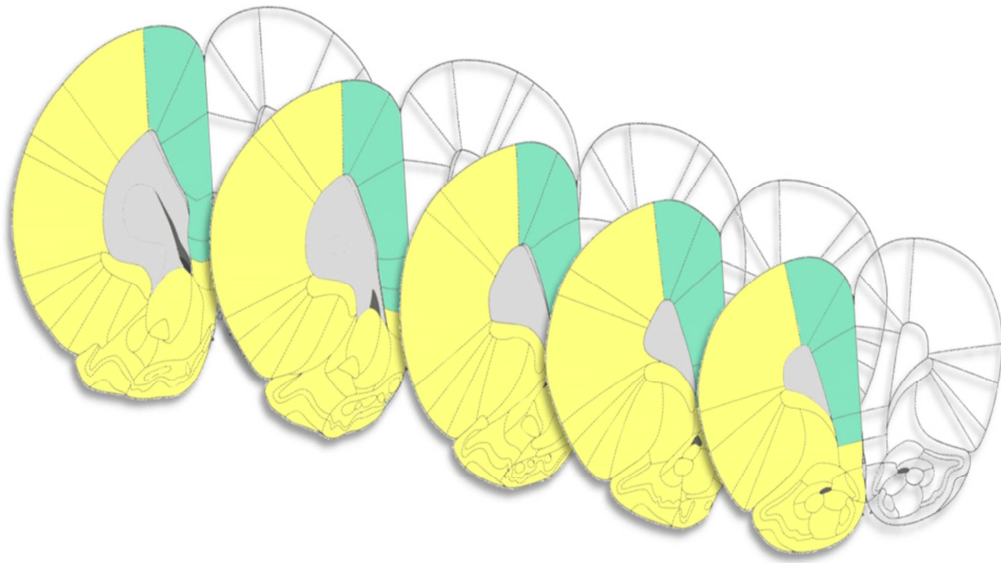
hayatın erken dönemlerinde PFK üzerindeki etkiler, hayat boyu sürecek davranış yansımalarına neden olabilmektedir.

PFK, frontal lobların anterior bölümünde bulunmaktadır ve çok sayıda kortikal bölgenin işlevsel olarak birleşmesi sonucu oluşmuştur (Şekil 2.1). Frontal lobların üç bölümü bulunmaktadır: Motor korteks, premotor korteks ve prefrontal korteks (56). PFK'nin medial, (dorso)lateral, ventral olmak üzere üç alt bölümü bulunmaktadır. Medial PFK; precentral, anterior cingulate, prelimbik, infralimbik ve medial orbital korteks kısımlarını içermektedir. Lateral PFK; dorsal ve ventral agranular insular ile lateral orbital bölgelerden oluşmaktadır. Son olarak ventral PFK; ventral orbital ile ventral lateral orbital bölgeleri barındırmaktadır (6, 57). Bu bölgelerin arasında kesin bir sınır bulunmamaktadır (52). Ventral bölümleri duygular ile ilgili girdileri alırken; dorsolateral kısımları sürdürülebilir dikkat, biliş ve eylem üreten bölgelerle yoğun bağlantılıdır ve inferior orbital kısımları da limbik sistemden gelen uyarıları baskılamaktadır. Anterograd ve retrograd boyama teknikleriyle yapılan anatomik çalışmalarda PFK'nin ventrolateral kısımlarının görmenin, somatik duyuların ve işitmenin assosiasyon alanları ve premotor alanlar ile ve medial kısımlarının görmenin, somatik duyuların, işitmenin assosiasyon alanları, temporal lob medial kısımları, talamus ve limbik alanlar ile karşılıklı lif alışverişinde bulunduğu gösterilmiştir (56, 58-60). Medial bölümler ayrıca, direkt olarak neostriatum'a, temporal neokortikal alanlara ve hipotalamus'a göndermiş olduğu efferentleri aracılığıyla; motor davranışları, vücudun emosyonel, nörokimyasal ve hormonal dengesini etkileyebilmektedir (61).

PFK'nin en önemli girdilerini thalamus'un *nucleus mediodorsalis*'inden aldığı bilinmektedir (5, 57). Talamo-kortikal bağlantılara ek olarak, yoğun kortiko-kortikal bağlantılar da içermektedir (6). PFK, tüm memelilerde kompleks bilişsel ve sosyal davranışları gerçekleştirebilmek için; beynin diğer bölgelerinden gelen bilgileri dikkatlice toplamakta, denetlemekte, yargılamakta, bütünleştirmekte, gerekli değişiklik, düzenleme ve sıralamaları yaptıktan sonra, ortaya çıkarılacak davranışa karar vermektedir. Bu nedenle de; hem çok sayıdaki posterior neokortikal assosiasyon alanları ve beyin sapındaki uyarıcı sistemler aracılığıyla dış çevreden, hem de limbik sistem aracılığıyla içyapılardan uyarılar almaktadır.

Prefrontal korteksin V. tabakasında bulunan piramidal nöronlar bazal ganglionlara projeksiyon lifleri gönderirler. III. tabakadaki piramidal nöronlar ise ipsi ve kontralateral kortiko-kortikal bağlantılardan sorumludur (62).

Stresli ortamlar gibi davranış değişikliği gerektiren uyarılar karşısında, ventral tegmental bölgeden PFK'ye uzanan dopaminerjik nöronların aktive olduğu gösterilmiştir (63). Aynı zamanda yoğun stresli durumlarda bu bölgeden asetilkolin salınımı olduğu da bilinmektedir (64). Bu iki nörotransmitterin dengeli salınması, stresli duruma uyum sağlamak için gerekli mekanizmaları aktifleştirmektedir.



Şekil 2.1. Sağ hemisferdeki (sarı) medial prefrontal korteks (yeşil) bölgesi.

Literatürde PFK'de meydana gelen morfolojik değişiklikleri inceleyen deneysel çalışmalar araştırıldığında, bunların genellikle prenatal dönemdeki stres maruziyetine bağlı etkileri inceledikleri görülmüştür. Oysa PFK gelişimini başlıca 6 aşamada tamamlamaktadır. İlk iki aşamada gerçekleşen nörogenezis ile ilgili gelişmeler prenatal döneme karşılık gelirken; 3. aşamadan itibaren gelişim postnatal dönemde devam etmektedir. İnsanlarda doğumdan sonraki ilk yıl içinde gerçekleşen bu dönemde, piramidal nöronların dendritik uzantıları büyüyerek olgunlaşmakta, sonuncu aşama ise; adolesan dönemin sonunda gerçekleşmekte ve erişkindekine benzer yapısal organizasyon bu dönemde kazanılmaktadır (65). Bu nedenle bu

çalışmada stres protokolü, prenatal dönemin son evresi ve erken postnatal dönemi kapsayacak şekilde, 14. embriyonik günden 14. postnatal güne kadar uygulanmıştır. Nöronlarda meydana gelen yapısal değişikliklerin incelendiği çalışmalarda, gözlenen değişikliklerin cinsiyete ve bölgelere göre farklılık gösterebileceğine dikkat çekilmektedir. Örneğin, PFK'deki piramidal nöronların dendritik morfolojilerinin incelendiği bir çalışmada; prenatal stresin her iki cinsten de dendritik dikensi çıkıntılarda azalmaya yol açtığı, ancak dendritik atrofinin sadece erkek yavrularda meydana geldiği gösterilmiştir (15). Yine sıçan medial PFK'deki nöronların dendritlerindeki dikensi çıkıntı çeşitlerini ve yoğunluğunu inceleyen bir başka çalışmada; prenatal stresin erkek sıçanların bazal dendritik çıkıntı yoğunluğunu değiştirmedeği ancak, daha güçlü ve stabil bir sinaps tipi olan mantarimsı tip çıkıntılarda azalmaya yol açtığı gösterilmiştir (16). Nöroanatomik yöntemlerle stereolojik sayım yöntemlerinin birleştirildiği oldukça güncel bir diğer çalışmada ise; prenatal stresin prefrontal korteksteki farklı anatomik bölgelere ve cinsiyete göre, toplam nöron sayısı, dikensi çıkıntı yoğunluğu ve sinaps sayıları bakımından zıt etkilere yol açtığı gösterilmiştir (66). Bunlara ek olarak erken dönemde uygulanan çeşitli çalışmalarda dokunma ile uyarılar, zenginleştirilmiş çevre, anneden ve babadan ayırma, oyun imkanlarının artırılması ve çeşitli maddeler (antipsikotikler, uyarıcılar, valproik asit ve alkol gibi) PFK'de morfolojik değişikliklere neden olmaktadır. Hayatlarının ikinci haftasına kadar, günde 15 dakika süreyle taktik uyarı alan sıçanların, erişkin olduklarında bile kortekslerinde daha yoğun bir sinaptik organizasyon (67) ve dikensi çıkıntı yoğunluğuna sahip oldukları gösterilmiştir (68). Zenginleştirilmiş çevrede yetiştirilen sıçanların tüm korteksinde nöron boyutları, dendrit dalları, dikensi çıkıntı yoğunlukları, nöron başına düşen sinaps sayısı, glia hücre yoğunluğu ve damarlanmanın arttığı gösterilmiştir (69, 70). Ancak PFK'deki etkiler cinsiyete bağlı olarak farklı karakter taşımaktadır; erkeklerde dikensi çıkıntılarının yoğunluğu azalırken (71), dişilerde artış gösterdiği bulunmuştur (72). *Octodon degus* gelişimi sırasında babadan ayırma, erişkin apikal dendritlerin daha kısa kalması ve üzerindeki dikensi çıkıntılarının daha az sayıda olmasına neden olmaktadır (73).

Tüm bu veriler, stres maruziyetinin prefrontal korteksteki nöronları cinsiyete bağlı olarak farklı şekilde etkileyebileceğine işaret etmektedir. Ancak, stres

maruziyeti sonrasında prefrontal korteksteeki nöronlarda meydana gelen yapısal değişiklikler ile bireyin emosyonel göstergeleri arasında bir korelasyon olup olmadığı halen bilinmemektedir.

2.3. *c-Fos* Aktivitesi

Çok sayıda etken, hücrelerde *c-Fos* geninin hızla ve geçici olarak transkripsiyonuna neden olmaktadır ve bunun sonucunda da hücrelerde büyüme ve farklılaşma gerçekleşmektedir (74). Hücrede herhangi bir uyarana karşı ilk yanıt veren genlerdendir. En erken genlerden olan *c-Fos* geni çekirdekdeki bir transkripsiyon faktörünü kodlar. Hücresel işlevler açısından ana anahtar olarak önemli bir belirleyici rol oynadığı düşünülmektedir (75). Fos protein ailesinde hidrofobik amfipatik α -sarmalına bağlanan N-terminali sayesinde DNA bağlama özelliği bulunur ancak Fos proteinlerinin DNA bağlayabilmesi için Jun proteinleri ile dimer yapması gerekmektedir (76). Fos proteinleri evrimsel olarak iyi korunmuştur. Sıçan ile insan arasında %94 oranında homoloji göstermektedir (76). *c-Fos* geninin ürünü olan Fos proteinleri, *c-Jun* geni ürünü olan Jun proteinleri ve bazı aktive edici transkripsiyon faktörü (ATF) proteinleri ile birleşmesi sonucu Aktive edici Protein-1 (AP-1) oluşur. Bütün AP-1 proteinleri fosfoproteindir ve hiperfosforilasyon ya da defosforilasyon sayesinde DNA-bağlanma ve transaktivasyon aktiviteleri düzenlenebilir. AP-1 proteinin bileşenlerine, hücre tipine ve hücre içeriğine bağlı olarak AP-1 transkripsiyon faktörleri hücre proliferasyonu, farklılaşması ve apoptozu hem indükleyebilir hem de inhibe edebilir (76, 77).

Bu özelliklerinden dolayı *c-Fos*, sinir sisteminde bir uyarı karşısında aktive olan hücreleri ve özellikle aktive nöronları belirlemek amacıyla kullanılmaktadır (19). Tüm hayat boyunca uyarıya karşı *c-Fos* aktivasyonunun gerçekleşmesi, özellikle embriyonik çalışmalarda da başarıyla kullanılmasını sağlamıştır. Bilim adamları, Fos ekspresyonu seviyesinin uyarının gücünü yansıttığını fark etmiş ve Fos yanıtını uyarının işlendiği nöro-endokrin ağları göstermek için kullanmışlardır. *c-Fos* aynı zamanda çift işaretleme sayesinde aktive nöronların tiplendirilmesi ve takip yöntemleri (*tracing*) sayesinde nöron bağlantılarının belirlenmesinde de kullanılabilir (19). Yapılan karşılaştırmalı çalışmalarda *c-Fos* işaretlerinin özellikle stresle ilişkili yanıtları değerlendirmekte etkin olduğu ve dinlenme durumunda *c-Fos* ekspresyonunun çok düşük olduğu gösterilmiştir (78).

Bu çalışmada nöronların stres durumunda verecekleri yanıtları değerlendirmek amacıyla hayvanlar sakrifiye edilmeden hemen önce zorlu yüzme testine tabi tutulmuştur. Zorlu yüzme testinin yarattığı stres sayesinde, stresle ilgili nöronlarda *c-Fos* aktivitesinin hızla artması sağlanmıştır. Böylece, en erken aktive olan genlerden biri olan *c-Fos*'un ifade edilim düzeyi; aktivasyon gösteren nöronların yoğunluklarının hesaplanmasında kullanılmıştır.

2.4. Morfometrik Yöntemler

PFK'deki aktivasyon gösteren nöronların toplam sayısına ulaşabilmek için modern morfometrik sayım yöntemleri kullanılmıştır. Bu yöntemler, hücreler, dokular, organlar veya organizmalar hakkında doğru sayısal verilere ulaşabilmek için günümüzde yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır (79). Bunlardan biri olan optik parçalama yöntemi, etkili, görece kolay ve güçlü bir tekniktir ve en etkin sayım yöntemi olarak tanımlanmıştır (80). Optik parçalama, bilinen en güçlü toplam tanecik sayısı hesaplama yöntemidir ve elde edilen toplam sayı ilgilenilen yapıdaki toplam tanecik sayısının tarafsız bir hesabını yansıtmaktadır (81). Tasarım tabanlı stereolojik yöntemlerden biri olan optik parçalama, hem teorik olarak sağlam temellere dayanmakta, hem de pratik olarak basit olan uygulanması sayesinde araştırmalarda sıklıkla tercih edilmektedir (82).

Çoğu zaman, çalışılan yapılarda ilgilenilen nicelik büyük olduğundan belli oranda örnekleme yapmak kaçınılmazdır. Bu örnekleme yapılırken dikkat edilmesi gereken çok sayıda etken bulunmaktadır. Paralel kesitlerin alınması, doku bileşenlerinin belli aralıklarla taranması, büyüklüğü belirli olan mikroskop görüntüleri üzerinden örneklem alınması, ardışık alanlar karşılaştırma ve kesit kalınlığı gibi çok sayıda etken dikkat gerektiren basamaklardır (82).

Optik parçalama yöntemi, dokuya uygulanan histolojik işlemlerden, dokuların şişme, büzüşme gibi yapısal değişimlerinden, kesit alma sırasındaki haraplanma ve hacim değişmelerinden bağımsız olması sebebiyle şu anda geçerliliği ve tarafsızlığı en yüksek olan sayım yöntemidir. Ayrıca çalışılan yapı, organ ve taneciklerle ilgili hiçbir ön bilgiye veya kabule gereksinim göstermez. Hücrelerin yönelimi ve dizilimi gibi dokuya özel durumlardan etkilenmez. Optik parçalama ile elde edilen toplam parçacık sayısı diğer yöntemlere oranla gerçeğe daha yakındır ve daha düşük hata katsayısına sahiptir. Aynı zamanda yüksek tekrarlanabilirlik özelliği

sayesinde farklı laboratuvarlardaki sonuçların bile güvenle karşılaştırılabilmesine olanak verir (83).

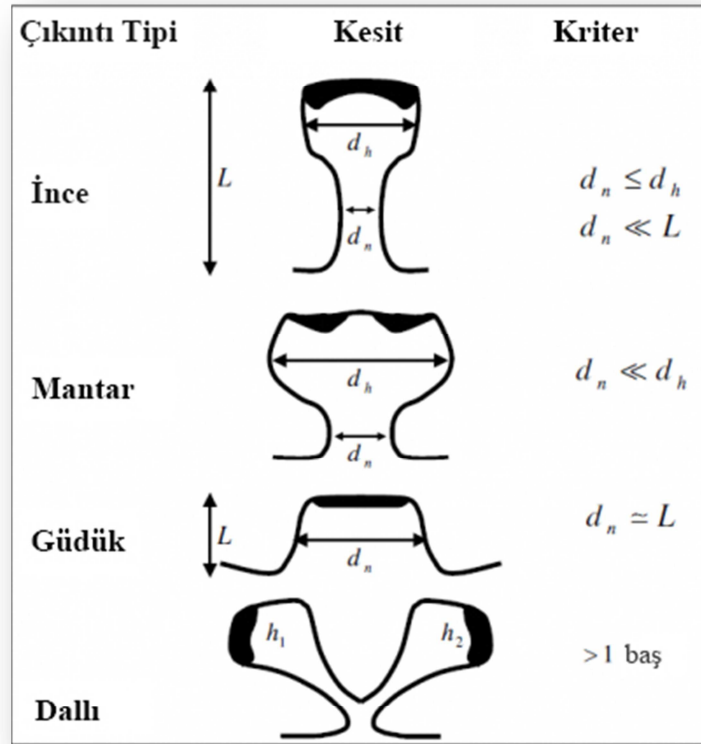
İlerleyen teknoloji ile birlikte stereolojik yöntemlerin verimini arttırmak amacıyla ticari bilgisayar destekli stereolojik analiz programları ve cihazları geliştirilmiştir. Bu tip sistemler parametrelerin istenen biçimde, belli bir tutarlılıkla ayarlanması sayesinde, stereolojik yöntemlerin uygulamalarını son derece hızlı ve güvenilir bir hale getirmektedir. Mikroskop üzerindeki tablanın yazılım aracılığıyla kontrol edilebilmesiyle, stereolojik yöntemlerin en fazla zaman harcanan kısımlarından biri olan belirli aralıklarla rasgele adımlama süreci tamamen otomatize edilmekte ve iş gücünden önemli oranda tasarruf sağlanmaktadır. Ayrıca bu sistemlerde kullanıcı hatasına önemli derecede sınırlama getirilmekte ve yapılan çalışmanın güvenilirliği ile tekrarlanabilirliği güvence altına alınmaktadır (82).

2.5. Dikensi Çıkıntılar

Nöronların aktivasyon düzeylerindeki değişikliklerine ek olarak, morfolojik özelliklerinde meydana gelen değişiklikler de incelenmiştir. Nöronlarda görülen başlıca morfolojik değişiklikler; dendritik dallanma paternlerinde görülen artış ve azalmalar ile bu dendritler üzerinde bulunan ve “*spine*” adı verilen dikensi çıkıntıların sayı ve şekillerinde gözlenen değişikliklerdir. Dendritik ağacın şekli, büyüklüğü ve kompleksitesi nöronun ateşleme potansiyeli ve sinaptik iletimini etkilemektedir (84). Aynı şekilde dikensi çıkıntıların yapısal özellikleri de nöronların işlevleriyle yakından bağlantılıdır. Bu çıkıntıların şekilsel özellikleri ile biyokimyasal içerikleri paralellik gösterebildiği için, çıkıntıların morfolojik özellikleri, kurulan sinaptik bağlantıların işlevlerinde önemli rol oynamaktadır.

Dendritik çıkıntılar pek çok farklı şekilde olmakla birlikte genel olarak 4 ana grupta toplanmaktadır: mantar şekilli, ince, güdük ve dallı olmak üzere (85). Bu gruplama esas olarak 2 ölçüm kriterinin birbirlerine oranına göre yapılmaktadır. Bunlardan birincisi dikensi çıkıntının boyun denin kısmının boyutu (d_n), diğeri de baş denin kısmının boyutu (d_h). Buna göre diken boynu diken başına eşit ya da biraz daha küçükse “ince”; diken başı boynundan daha geniş ve kesitlerinde mantara benziyorsa “mantar”; belirgin bir boyun kısmı yoksa ve diken eni ve boyu yaklaşık olarak eşit uzunluktaysa “güdük”; birden fazla dikensi çıkıntı başı varsa “dallı” olarak tiplendirilmektedir (Şekil 2.2). Dikensi çıkıntıların her biri genellikle bir

sinaps barındırmaktadır. Dolayısıyla bu çıkıntılar postsinaptik kimyasal cevabın oluşmasında özel bir mikro-kompartman gibi görev yapmaktadırlar (86). Dikensi çıkıntının boyun kısmı postsinaptik kalsiyum yanıtların büyüklüğünü ve kinetiğini kontrol edebilmektedir (87). Uzun boyunlu dikenlerde kalsiyum yanıtları kısa boyunlu dikenlere göre daha kısa bekleme süresine sahiptir ve daha geç kaybolurlar (88). Dikensi çıkıntılar oldukça küçük bir hacime sahip olmakla birlikte üzerinde sayısı 1-20 arasında değişen voltaj-bağımlı kalsiyum kanalı barındırmaktadır. Bu biyokimyasal kompartmanlaşmaya ek olarak, elektriksel kompartmanlar olarak da işlev görerek sinaptik potansiyellerin entegrasyonunu, amplitüdünü ve kinetiklerini düzenleyebilirler (21).



Şekil 2.2. Dikensi çıkıntılarının morfolojik tiplendirme kriterleri.

Dikensi çıkıntılar üzerinde birkaç farklı tipte kalsiyum-geçirgen reseptör ve kanal birlikte bulunabilmektedir. Bunlardan sinaptik ileti ve plastiste bakımından en önemli olanları glutamat reseptörleridir (89). Glutamat, beyinde en bol bulunan eksitatör amino asit nörotransmitterdir ve etkisini iyonotropik ve metabotropik glutamat reseptörlerini uyarak ortaya çıkarmaktadır (90). İyon kanalları ile

eşleşmeli iyonotropik glutamat reseptörleri; N-metil-D-aspartik asit reseptörleri (NMDA), α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-isoksazolpropionik asit (AMPA) ve kainat reseptörleri olarak sınıflandırılmaktadır. Elektron mikroskopik çalışmalar, dendritik çıkıntıların büyüklüğü ile AMPA reseptörlerinin sayısı arasında çok güçlü bir pozitif korelasyon olduğunu ortaya çıkarmıştır (91). Yine kalsiyum görüntüleme teknikleri ile yapılan çalışmalarda, sinaptik iletim esnasında NMDA reseptörleri aracılığıyla gerçekleşen kalsiyum akışının dikensi çıkıntı başlarında lokalize olduğu, çok az bir kısmının dendritler üzerinden gerçekleştiği gösterilmiştir (92). Bu nedenle, dendritik çıkıntıların morfolojik özelliklerinde meydana gelen değişiklikler sinaptik ileti ve plastisite işlevlerini yakından ilgilendirmektedir.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, glutamaterjik nörotransmisyon sisteminin ve NMDA reseptörlerinin; strese yanıt tepkilerinde büyük oranda yer aldığına, emosyonel bozukluklarının patofizyolojisinde, antidepresan ve mizaç düzenleyici ilaçların etki düzeneklerinde ana nörotransmitter sistemi olarak yeri olduğuna dair bilgiler giderek artış göstermektedir (93). Stresin hipokampus ve prefrontal kortekte sinaptik glutamat konsantrasyonunu arttırdığı gösterilmiştir (94). Glutamaterjik sistemin paralimbik-HPA aksın strese yanıtı ile de yakın ilişkisi bulunmaktadır. İnhibitör ve eksitatör uyarımlar arasında meydana gelen dengesizlikler, sonuçta dendritlerde yapısal ve işlevsel bozukluklara yol açmak suretiyle psikopatolojik değişikliklerin oluşmasına zemin hazırlamaktadır. Bu nedenle çalışmamızda kortikal nöronların dendritik ağacın yapısal özelliklerinde meydana gelen değişikliklerin emosyonel durumdaki değişikliklerle karşılaştırmalı olarak incelenmesi, mizaç bozukluklarının patofizyolojisini anlamamızda ve tedavi etmemizde yeni ufuklar açacaktır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

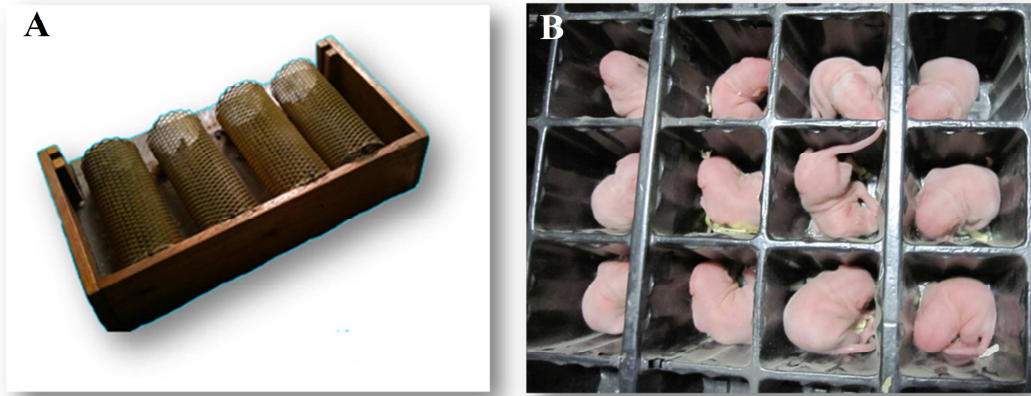
3.1. Deney Hayvanlarının Seçimi ve Grupların Oluşturulması

Bu uzmanlık tezi çerçevesinde yapılan deneyler, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (HADYEK) tarafından 22.12.2011 tarih ve 201-1 numaralı karar ile onaylandı ve çalışma süresince uluslararası yönergelerde belirtilen hayvan haklarına uyuldu. Deneylerde Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıbbi-Cerrahi Deneysel Araştırma Merkezi (TİCAM)’nden temin edilen ve daha önce hiç doğum yapmamış Sprague Dawley cinsi erişkin sıçanlardan elde edilen yavrular kullanıldı. Sıçanlar, araştırma süresince 19-21°C sabit sıcaklıkta, 12 saat aydınlık / karanlık periyotlarına ayarlanmış, otomatik olarak klimatize edilen odalarda korunarak, normal pellet cinsi yem ile beslendi. Gebelik günleri, geceden çiftleştirme kafeslerine konan sıçanlardan ertesi sabah alınan vajinal simirlerdeki sperm mevcudiyetine göre tayin edildi. Prenatal stres protokolü, 14-21. embriyonik günler arasında, gebe sıçanların her gün aynı saatlerde (9:00-12:00) metal silindirler içinde hareketsiz bırakılmaları suretiyle gerçekleştirildi (Şekil 3.1A). Hareketsizlik stresine maruz kalan sıçanlardan doğan yavrular doğumdan sonra da 2. günden başlayarak sütten kesilme dönemine kadar [postnatal (P) 21. gün] yine her gün aynı saatte (9:00-12:00) annelerinden ve diğer yavrularından ayrılarak izole edilmek suretiyle strese maruz bırakılmaya devam edildi (Şekil 3.1B).

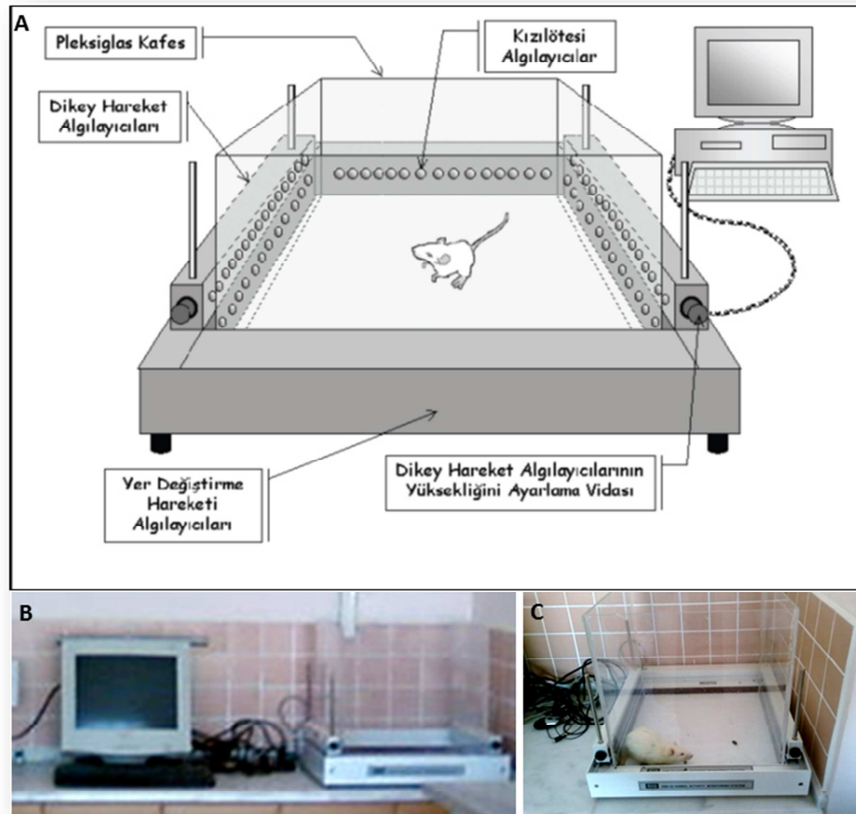
Yavrular sütten kesildikten sonra dölden kaynaklanabilecek hata payını en aza indirgeyebilmek için en az 5 farklı anneden elde edilen yavrular, cinsiyetlerine göre ayrı kafeslere alınarak kuyrukları kalıcı boya ile işaretlenmek suretiyle kodlandı. Bundan sonra yapılan tüm deneylerin sonuçlarını bireysel olarak takip edebilmek için bu kod numaraları referans alındı.

3.2. Lokomotor Aktivitenin Karşılaştırılması

Davranış testlerinin tamamı Farmakoloji Anabilim Dalı’nda ses yalıtımı yapılmış Psikofarmakoloji laboratuvarında gerçekleştirildi. Bu ortamdaki 2 günlük adaptasyon dönemini takiben, davranış testleri her gün aynı saatlerde (9:00-13:00) yapıldı. Yavruların duygusal durumlarını ve lokomotor aktivite düzeylerini tespit etmek amacıyla hayvanlar aktivite ölçüm sistemine (May-AMS 02 Animal Activity Monitoring System) yerleştirildi, 5 dakika süreyle hareketleri kaydedildi (Şekil 3.2).



Şekil 3.1. Prenatal ve postnatal stres protokolü uygulaması. Gebelerde hareketsizlik stresi uygulamak için kullanılan tel kafes düzeneği (A) ve postnatal dönemde yavrulara uygulanan anneden ayırma stresinde kullanılan düzenek (B).



Şekil 3.2. Lokomotor aktivite ölçüm sistemi. Cihazın çalışma sisteminin şematik çizimi (A), Psikofarmakoloji laboratuvarındaki aktivitemetre sistemi (B) ve aktivitemetre kafesi (C).

Aktivitemetre sistemi; her bir kenarı üzerinde kızılötesi (IR) ışık kaynakları içeren kare şeklindeki (40 cm × 40 cm) pleksiglas bir dörtgen kafesten oluşmaktaydı. Bu kafes içindeki deney hayvanı herhangi bir hareket yaptığında karşılıklı IR sensörler arasındaki iletişimi kestiği için deney hayvanının yaptığı hareketin şekline göre aktiviteleri farklı parametreler olarak kaydedildi. Test süresi içerisinde deney hayvanının yer değiştirme ve dikilme hareketleri yapmaksızın olduğu yerde yaptığı hareketler **“horizontal hareket”** olarak; vertikal sensörler yardımı ile algılanan dikilme hareketleri (arka ekstremiteleri üzerinde yükselme) ise **“vertikal hareket”** olarak kaydedildi. Deneğin kafes içinde dikilme haricinde yaptığı her türlü yer değiştirme (gezinme) hareketleri de **“ambulatuvar hareket”** olarak kaydedildi. Horizontal ve vertikal aktivitelerinin sayısı; deney hayvanının stereotipik hareketleri ve agresivitesini değerlendirmede, test süresince deney hayvanının yaptığı hareketlerin toplamı da total lokomotor aktiviteyi değerlendirmede kullanıldı.

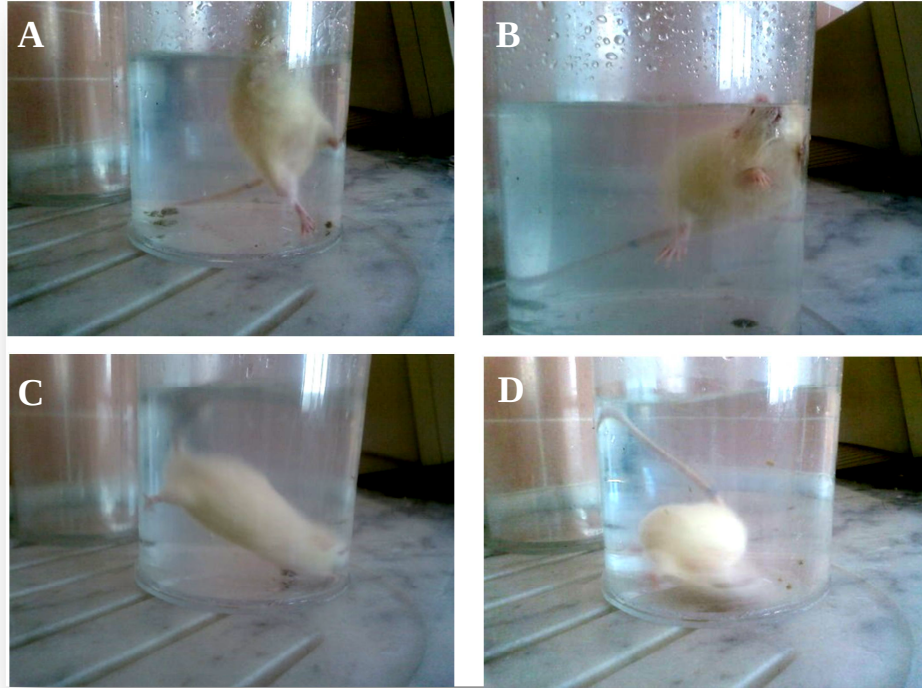
Rodentlerde spontan lokomotor aktivite gün içinde farklılık gösterebildiği için gruptaki hayvanların aktivite ölçümleri aynı kod sıralaması takip edilerek yapıldı. Her test periyodunun sonunda yavrular kafesten alındıktan sonra test alanı ıslak bez ile silinip kurularak, bir önceki hayvana ait kokunun daha sonraki hayvanın davranışlarını etkileme ihtimali en aza indirgenmeye çalışıldı.

3.3. Yükseltilmiş Artı Labirent Testi

Bu testte; yerden 70 cm yükseklikte, artı şeklinde 2 açık, 2 kapalı ve bunların birleştiği merkez bölgeden (10 × 10 cm) oluşan bir labirent düzeneği kullanıldı (Şekil 3.3). Labirentin kol boyları 50 × 10 cm (boy × en) boyutlarındaydı ve kapalı kolların kenarları 40 cm yüksekliğinde siyah renkli duvarlarla çevrilmişti. Açık kolların kenarlarında ise sadece 2.5 mm yüksekliğinde sığ bir çerçeve bulunmaktaydı. Hayvanlar yüzü açık kola bakacak şekilde yükseltilmiş labirentin merkezine bırakıldı. Deneye, aktivitemetre ölçümlerinin ardından, 5 dakikalık alıştırma periyodunu takiben başlandı ve 5 dakika süreyle hayvanın açık ve kapalı kollara giriş-çıkış sayıları ve bu kollarda geçirdiği süreler kronometre ile ölçüldü.



Şekil 3.3. Yükseltilmiş artı labirent düzeneği.



Şekil 3.4. Zorlu yüzme testinde gözlenen davranışlar. Duvara tırmanma ve sıçrama hareketi (A), hareketsiz kalma (B) ve dalarak çıkış arama hareketi (C - D).

Fare ve sıçanlar doğuştan açıklık ve yükseklikten korktukları için, kapalı kola giriş sayısı ve kapalı kolda geçirilen süre, artmış anksiyete düzeyini; toplam kol giriş-çıkış sayıları ise, genel lokomasyon düzeyini değerlendirmede kullanıldı. P30. günde yapılan test sonuçlarına göre hayvanlar açık kolda geçirdikleri süreye göre sıralandı. Daha sonra P60. günde test tekrarlanarak, aynı hayvanın P30. günde ve P60. günde açık kolda kalma sürelerinin ortalama değeri hesaplandı. Bu değerler büyükten küçüğe sıralanarak; açık kolda kalma süresi en fazla olan ilk 8 hayvan düşük anksiyete (DA) grubu, en az olan son 8 hayvan ise yüksek anksiyete (YA) grubu olarak belirlendi.

3.4. Zorlu Yüzme Testi

Porsolt ve arkadaşları tarafından geliştirilen bu test; beyin kimyasındaki değişiklikleri davranış boyutunda gözlemek için kullanılmaktadır. Bu testte 35 cm yüksekliğinde, 20 cm çapındaki pleksiglas malzemeden yapılmış silindirik bir tank kullanıldı ve içine 21 cm yüksekliğe kadar $25\pm0,5^{\circ}\text{C}$ ısıda su dolduruldu (Şekil 3.4). Bu su düzeyi hayvanların yere dayanmalarına, kenara tutunarak ve sıçrayarak dışarı çıkmalarına imkân vermediğinden hayvanlar kaçamayacakları bir ortamda yüzmeye zorlandı. Deney hayvanları 24 saat ara ile iki kez tanka konulup birinci gün 15 dakika, ikinci gün ise 5 dakika zorla yüzdürüldükten sonra, havlu ile kurularak kafeslerine alındı.

İlk kez suya konulan deney hayvanları ortamdaki kurtulmak için çabalayarak, özellikle deney süresinin sonlarına doğru hareketsiz kalmaya başladılar. Test 24 saat sonra tekrar edilince öğrenilmiş çaresizliğe giren deney hayvanlarının çabalama süreleri kısılırken, hareketsiz kalma süreleri uzadı. Sıçanların test süresince göstermiş olduğu bireysel davranışlar gözlenerek, davranış değişikliklerinin süreleri kronometre aracılığı ile ölçüldü. Buna göre;

- **“Hareketsizlik süresi”**: Deney hayvanının nefes alma dışında hiç hareket etmediği ve kulakları dahil su altında hareketsiz kalarak geçirdiği 9 saniyeden uzun sürelerin saniye cinsinden kaydedilmesi ile elde edildi. Sıçanın davranışsal çaresizliğini yansıtan bu değişken depresyon göstergesi olarak kabul edildi.

- **“Çabalama süresi”**: Deney hayvanının sıçrayarak veya kenara tırmanarak silindirden kurtulmak için yaptığı ve dalarak su altında çıkış aramakla geçirdiği mücadele davranışları esnasında geçirdiği sürenin saniye cinsinden kaydedilmesi ile

elde edildi. Sıçanın davranışsal çaresizlik, başka bir deyişle depresyonda olmadığını göstergesi olarak kabul edildi.

3.5. Dokuların Hazırlanması

Zorlu yüzme testinin hemen akabinde sıçanlar halotan inhalasyonu ile anestezi edildikten sonra transkardiak yolla önce fosfat tamponlu salin (PBS) solüsyonu, sonra da %4'lük paraformaldehid (0.1M fosfat tamponda [pH=7.4] hazırlanan) solüsyonu ile perfüze edildi. Beyin diseksiyonunu takiben yapılan midsagittal kesi ile sağ ve sol beyin hemisferleri ayrıldı. Sol hemisferler immunohistokimyasal analizler, sağ hemisferler ise Golgi-Cox boyama için kullanıldı.

3.6. İmmunohistokimyasal Boyamalar

Serebral hemisferler %4'lük paraformaldehid fiksativi içinde 24 saat süre ile postfikse edildi. Daha sonra 3-4 saat çeşme suyunda yıkanan doku parçaları kademeli olarak %70'lik, %80'lik, %90'lık ve %96'lık alkol serilerinde 45'er dakika bekletilerek dehidrate edildi. Doku örnekleri şeffaflaştırmak üzere 2 kez 20'er dakika ksilol'de bekletildi ve etüv içinde 65°C'de eritilmiş parafinlere alınarak bloklandı. Hazırlanan parafin bloklardan 5 µm kalınlığında alınan seri kesitler, 45°C'de su banyosunda açıldıktan sonra daha önceden iki kez poly-lysine ile kaplanmış temiz lamlara yapıştırıldı.

c-Fos immunohistokimyasında kullanılan preparatlar birer saat süre ile iki ayrı ksilol'de tutulup deparafinize edildi ve azalan konsantrasyonlu alkol serisinden geçirildikten sonra distile suyla yıkandı. % 3'lük hidroperoksit ile 30 dakika muamele edilen preparatlar; antijen açığa çıkarma (*retrieval*) işlemi için sodyum sitratlı (pH=6.00) tampon solüsyonuna konarak mikrodalga fırında iki kez 5'er dakika süreyle kaynatıldı. Soğuma sonrasında 3 kez PBS ile yıkayıp, oda sıcaklığında 30 dakika blok solüsyonunda bekletildi. 1: 50 oranında seyreltilen primer antikor (Millipore) ile kaplanan preparatlar bir gece buzdolabında tutuldu. Ertesi gün PBS ile 3 kez yıkama işlemini takiben biyotinli sekonder antikorla (Universal detection kit) oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi. PBS yıkamalarından sonra yine oda sıcaklığında 30 dakika ABC-Elite kit solüsyonunda (Vectastain) inkübe edildi ve 5 dakika kromajen solüsyonunda bekletildi. En son

aşamada distile suda yıkanan preparatlar, %95 ve %100'lük etanolde dehidrate edildi. Ksilol ile şeffaflaştırıldıktan sonra da entellan ile usulüne uygun olarak kapatıldı.

3.7. Sayısal Analizler

Tüm sayısal analiz uygulamalarında örnekler seçilirken sistematik randomize örnekleme metodu kullanıldı ve hesaplamalarda mikroskopik kalibrasyon skalası kullanılarak magnifikasyon faktörüne göre belirlenen gerçek uzunluklar kullanıldı. Sol hemisfer kesitlerde, *corpus callosum*'un *forceps minor* kısmının belirginleştiği ilk kesit (Bregma 3.72 mm) ile üçüncü ventrikülün görülmediği son kesit (Bregma 0.60 mm) (95) arasında kalan bölgeden (referans bölge) 90 µm aralıkla alınan 18 kesitten birinde sayım yapıldı. Bu referans bölge içerisinde aktivasyon gösteren nöronların sayısal yoğunluğunu hesaplayabilmek için her kesitte birim alana düşen *c-Fos* (+) nöronlar sayılarak her hayvan için ortalama değerler hesaplandı. PFK'deki toplam *c-Fos* (+) nöron sayısının hesaplanmasında ise Stereoinvestigator (MicroBright Field=MBF) yazılım programının *Optic Fractionator* (optik parçalama) probu kullanıldı. Bu amaçla öncelikle küçük büyütmeli objektif ile medial prefrontal kortikal sahanın konturları çizildi (Şekil 3.5A). Tüm alanın yirmide birinde sayım yapılacak şekilde, sayım çerçevesinin boyutları 300 µm × 300 µm olarak belirlendi. Belirlenen örnekleme alanında, optik odaklama esnasında çerçevenin sayılabilir alanı içerisine 1 veya 2 tanecik düşecek şekilde üç boyutlu disektör sondalarının boyutları ayarlandı (100 µm × 100 µm × 5µm) ve bu sondalar belirlenen konturlar içinde kalan alana yazılım programı tarafından otomatik olarak yerleştirildi (Şekil 3.5A-B). Kesitin alt ve üst yüzlerinde kesilme işlemi dolayısıyla meydana gelmiş olabilecek bozukluklardan kaçınmak için; üst ve alt kenarlardan 1 µm güvenlik alanı bırakıldı ve disektör sondasının yüksekliği 3 µm olarak belirlendi (Şekil 3.5C). Sonda içerisine düşen nükleer profillerin sayımında 40×'lık objektif kullanıldı. Odak değişimi ile optik olarak kesit içerisinde ilerlenirken, disektör sondasının içinde kalan ve tarafsız sayım çerçevesinin kurallarına uyan tüm *c-Fos* (+) hücreler sayıldı (Şekil 3.5D).

Toplam hücre sayısı aşağıdaki formül kullanılarak yazılım programı tarafından hesaplandı:

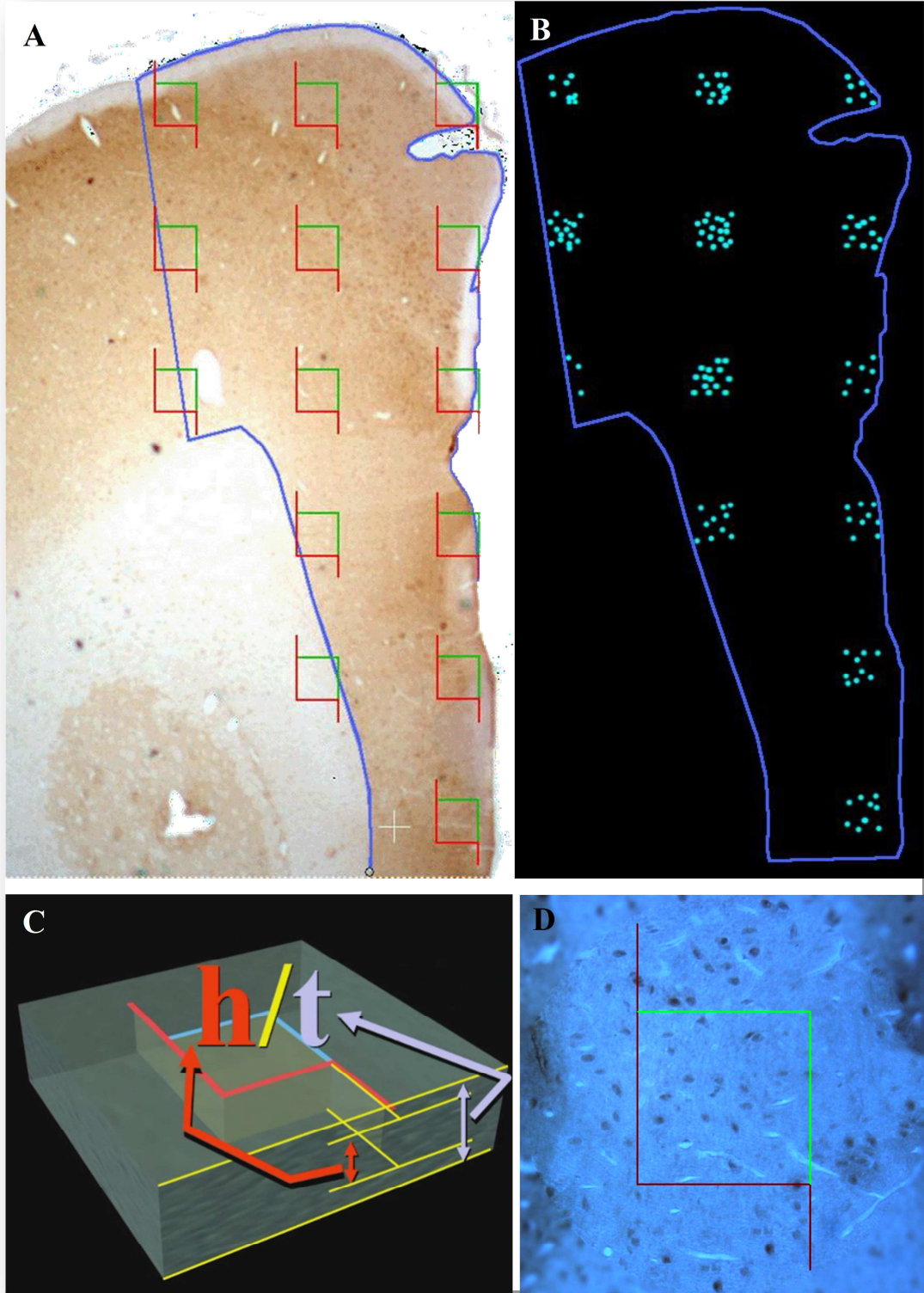
$$N = \sum Q \cdot t / h \cdot 1 / asf \cdot 1 / ssf$$

Formülde ($\sum Q$)= sayılan toplam nükleus sayısını, (t)=ortalama kesit kalınlığını, (h)= optik disektör sonda yüksekliğini, (asf)= (*area sampling fraction*) = alan örnekleme payını, (ssf)= (*section sampling fraction*) = kesit örnekleme payını göstermektedir.

Ölçümlerdeki hata katsayısı (CE =*Coefficient of Error*) da yazılım programı tarafından belirlendi. Schmitz ve Hof'un hesaplama metoduna göre bulunan değerin 0.05'in altında olması çalışmanın güvenilirliği için yeterli kabul edildi.

3.8. Golgi-Cox Boyama

Piramidal nöronların morfolojik özelliklerini detaylı bir şekilde inceleyebilmek amacıyla, sağ serebral hemisferler, 10 mm'lik dilimlere ayrılarak %4'lük paraformaldehid solüsyonu içinde 24 saat fiksasyona tabi tutuldu. Daha sonra FD Rapid GolgiStain™ hızlı Golgi boyama kiti (FD NeuroTechnologies) kullanılarak, dokular talimatlar doğrultusunda boyandı. Bunun için dokular önce kit içerisinde gelen A (*potassium dichromat* ve *mercuric chlorid* içeren) ve B (*potassium chromat* içeren) solüsyonlarının karışımından oluşan impregnasyon solüsyonuna daldırıldı (immersiyon). Bu solüsyon içerisinde karanlıkta, iki-üç hafta süreyle bekletildikten sonra C solüsyonuna aktarılan dokular, 4°C'de en az 1 hafta süreyle karanlıkta bekletildi. İlk 24 saatten sonra solüsyon değiştirildi. Boyama işlemini takiben dokular fosfat tamponlu %30'luk sukroz çözeltisine konuldu ve 4°C'de en az 24 saat süreyle bekletildi. Bu dokulardan vibratom yardımıyla 200 µm kalınlığında yavaşça alınan kesitler jelatin kaplı lamlara C solüsyonu ile birlikte aktarıldı. Bu kesitler dört kez 5 dakika süreyle distile suda yıkandıktan sonra 1 birim D solüsyonu, 1 birim E solüsyonu ve 2 birim distile sudan oluşan karışıma koyularak 10 dakika süreyle çalkalayıcıda (SV12DX, Finemould Precision Ind. Co.) bekletildi. Daha sonra distile suda 4 kez 5 dakika süreyle yıkandı. Bundan sonra seri alkollerden (%50, %75 ve %95 etanolde 4'er dakika) geçirilerek dehidratasyonu sağlanan kesitler 4 kez 4 dakika süreyle absolü etanolde bekletilip, ksilol'de şeffaflaştırıldı ve entellan ile kapatıldı.



Şekil 3.5. Optik parçalama yönteminin temel basamakları. Hücre sayımı yapılan kortikal sahanın konturlarının belirlenmesi (A), tarafsız sayım çerçevelerinin yerleşimi (B) ve disektör sondası (C) içindeki *c-Fos* (+) nöronların ile sayılması (D).

Bu kesitlerden elde edilen görüntüler Stereoinvestigator (MBF) yazılım programının Neurolucida probu kullanılarak analiz edildi. Prefrontal korteks'teki piramidal nöronlardan dendritik uzantıları net olarak ayırt edilebilenler çizildikten sonra nöronların dendritik paternleri Sholl analizi programı kullanılarak değerlendirildi. Bu amaçla, nöron gövdesinin etrafından başlayarak eşit aralıklarla (10 μm) yerleştirilen konsantrik halkalar ile kesişen dal sayıları hesaplandı ve bu değerler üzerinden de toplam dendritik uzunluğa ulaşıldı. Dendritler üzerindeki dikensi çıkıntıların analizi için ise, apikal dendritlerinin 3^o dalları üzerindeki dikensi çıkıntılar immersiyon objektifi altında çizildi. Bu çıkıntılar, yapısal ve işlevsel özelliklerine göre farklı belirteçlerle işaretlenerek sayıldı. Her hayvan için 20 farklı nöron analiz edildi ve elde edilen ortalama değerler iki yönlü varyans analizi ile karşılaştırıldı.

3.9. İstatistiksel Analizler

Gruplar arasında gözlenen farklılıklar SPSS (Statistical Package for Social Sciences, 22.sürüm) paket programı kullanılarak değerlendirildi. Cinsiyetler arasında gözlenen farklılıklar ise Student's *t*-testi ile karşılaştırıldı. Çalışma verileri değerlendirilirken tanımlayıcı istatistikler olarak, ortalama, standart sapma, ortanca, en küçük ve en büyük değerler hesaplandı. Uygulanan testlerden elde edilen değerlerin dağılımları önce Kolmogorov-Smirnov ve Shapiro-Wilk testi ile incelendi. Dağılımları normal olan değişkenler parametrik istatistik testlerle, dağılımları normal olmayan değişkenler ise non-parametrik istatistik testlerle değerlendirildi. Gruplardaki niceliksel veriler normal dağılım özelliklerine uydukları zaman çift yönlü varyans analizi ve Tukey çoklu karşılaştırma testi ile karşılaştırılarak tablolarda ortalama ve standart sapma değerleri sunuldu. Korelasyon analizlerinde Pearson (parametrik) ve Spearman (non-parametrik) testleri kullanıldı. Grup içi dağılımlar normal olmadığı zaman ise Kruskal-Wallis testi uygulandı. Sonuçlar %95'lik güven aralığında ve anlamlılık $p < 0.05$ düzeyinde değerlendirildi.

4. BULGULAR

Erken gelişim dönemlerinde uygulanan stres protokolü reproduktif parametrelerde bir aksaklığa neden olmadı. Maternal vücut ağırlıkları, canlı doğan yavru sayısı, yavruların cinsiyet oranları gibi parametrelerde bir farklılık gözlenmedi. Yavruların sütten kesilme dönemine kadar geçen dönemlerinde de anne-infant ilişkisi, emme reaksiyonları, genel aktivite düzeyleri ve sosyal davranışlar bakımından belirgin bir farklılık gözlenmedi. Ancak yavrular sütten kesildikten sonra kontrol gruplarıyla strese grupları arasında cinsiyete de bağlı olmak üzere bazı farklılıklar gözlenmeye başladı.

4.1. Lokomotor Aktivite Düzeylerinin Karşılaştırılması

Yavruların aktivitemetre testi süresince yapmış oldukları farklı hareketlerin sayıları kaydedildi. Gruplar arasındaki cinsiyete bağlı farklılıklar iki yönlü varyans analizi ve Tukey çoklu karşılaştırma testi ile incelendi. P30. günde uygulanan test sonuçları Tablo 4.1’de, P60. günde uygulanan test sonuçları ise Tablo 4.2’de verildi. Bu sonuçlara göre, dişilerde kontrol grubu ile YA ve DA’lı gruplardaki yavruların horizontal, vertikal, stereotipik, ambulator hareketlerinde ve test süresince kat ettikleri toplam mesafede anlamlı bir fark bulunmadı (Tablo 4.1). Erkeklerde ise stereotipik hareketlerin sayısı ($p<0.01$) ve yüzdesi ($p<0.05$) YA ve DA’lı gruplarda kontrol grubuna oranla anlamlı düzeyde düşük bulundu. Bunun haricinde diğer hareketlerin sayısı, test süresince yapmış oldukları stereotipik ve ambulator hareketlerinin dinlenme süresine göre oranları karşılaştırıldığında gerek gruplar arasında, gerekse cinsiyetler arasında anlamlı bir fark gözlenmedi (Tablo 4.1).

P60. günde tekrarlanan aktivitemetre testi sonuçlarında da kontrol grubu ile DA ve YA’lı gruplar arasında genel olarak anlamlı farklar gözlenmedi (Tablo 4.2). Sadece DA grubundaki erkeklerde, horizontal hareketler ve katedilen toplam mesafe kontrol grubuna göre anlamlı derecede artmış olarak bulundu ($p<0.05$). Öte yandan yavruların test süresince yapmış oldukları stereotipik ve ambulator hareketlerinin dinlenme süresine göre oranları karşılaştırıldığında dişiler ve erkekler arasında anlamlı bir fark olduğu gözlemlendi ($p<0.05$). Bu farklılık dişilerdeki stereotipik hareket sayılarının erkeklere kıyasla daha düşük; ancak ambulator hareket sayılarının daha yüksek olmasından kaynaklanmaktaydı (Tablo 4.2).

Tablo 4.1. P30. gündeki spontan lokomotor aktivite düzeyleri.

(P30. GÜN)		KONTROL	YA	DA	p değeri
Horizontal	D	3480,13 ±278,7	2827,50 ±272,7	2791,38 ±402,7	n.s.
	E	3636,38 ±874,3	2961,75 ±229,0	3335,29 ±387,0	
Vertikal	D	90,63 ±4,7	56,88 ±6,0	54,50 ±10,2	n.s.
	E	76,38 ±11,4	71,38 ±9,8	67,71 ±12,9	
Stereotipik	D	276,00 ±25,4	268,50 ±36,0	202,00 ±46,0	KE-YAE:** KE-DAE:**
	E	386,25 ±92,2	202,38 ±33,6	196,29 ±31,7	
Ambulatuvar	D	1144,75 ±59,7	956,50 ±73,3	900,00 ±105,3	n.s.
	E	933,25 ±112,2	1033,88 ±58,5	1104,00 ±100,6	
Toplam hareket	D	1511,38 ±69,1	1281,88 ±68,6	1156,50 ±135,3	n.s.
	E	1395,88 ±134,0	1307,63±85,2	1368,00 ±126,8	
Toplam mesafe	D	3419,75 ±275,8	2676,50 ±323,4	2732,50 ±388,4	n.s.
	E	3046,63 ±701,6	2925,25 ±211,1	3315,43 ±403,2	
Stereotipik %	D	9,25 ±0,8	9,38 ±1,4	7,13 ±1,6	KE-YAE:* KE-DAE:*
	E	13,63 ±1,2	7,38 ±1,2	7,14 ±1,1	
Ambulatuvar %	D	40,75 ±2,0	34,88 ±2,7	32,50 ±3,6	n.s.
	E	32,75 ±4,0	38,50 ±2,0	40,43 ±3,8	
Dinlenme %	D	50,00 ±2,2	55,63 ±2,3	60,63 ±4,4	n.s.
	E	53,75 ±4,4	54,25 ±2,8	52,71 ±4,4	

Tabloda verilen değerler, ortalama ± standart sapma değerlerini göstermektedir (n=8, her iki cinsiyet ve grup için). D = Dişi; E = Erkek; K = Kontrol; DA = Düşük anksiyete; YA = Yüksek anksiyete.; n.s. = anlamlı değil. * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

Tablo 4.2. P60. gündeki spontan lokomotor aktivite düzeyleri.

(P60. GÜN)		KONTROL	YA	DA	p değeri
<i>Horizontal</i>	D	2937,375 ±205,9	2954,38 ±536,2	4297,13 ±387,2	KE-DAE:*
	E	2394,75 ±249,45	3464,375 ±404,7	4244,00 ±523,99	
<i>Vertikal</i>	D	106 ±13,4	89,50 ±11,4	119,75 ±11,1	n.s.
	E	93,50 ±9,62	92,125 ±10,5	84,71 ±12,6	
<i>Stereotipik</i>	D	702,5 ±41,1	604,63 ±78,2	681,63 ±56,8	D-E:*
	E	784,50 ±61,16	793,75 ±69,5	795,71 ±75,05	
<i>Ambulatuvar</i>	D	556,75 ±39,0	635,50 ±92,5	794,25 ±94,7	D-E:*
	E	367,13 ±40,54	530,875 ±70,4	645,57 ±59,23	
<i>Toplam hareket</i>	D	1365,25 ±69,7	1329,63 ±168,9	1595,63 ±80,5	n.s.
	E	1245,13 ±102,94	1416,75 ±97,7	1526,00 ±125,7	
<i>Toplam mesafe</i>	D	1826,5 ±198,1	2049,38 ±367,7	3123,88 ±446,0	KE-DAE:*
	E	1238,13 ±159,11	2034,5 ±292,2	2693,43 ±384,36	
<i>Stereotipik %</i>	D	25,75 ±1,5	21,38 ±2,5	24,75 ±2,0	D-E:*
	E	28,50 ±2,21	29,12 ±2,5	29,00 ±2,82	
<i>Ambulatuvar %</i>	D	20,25 ±1,5	22,75 ±3,1	29,00 ±3,4	D-E:*
	E	13,25 ±1,42	19,375 ±2,6	23,57 ±2,18	
<i>Dinlenme %</i>	D	54,125 ±2,3	56,13 ±5,2	46,25 ±2,7	n.s.
	E	58,13 ±3,37	51,75 ±3,4	47,43 ±4,15	

Tabloda verilen değerler, ortalama ± standart sapma değerlerini göstermektedir (n=8, her iki cinsiyet ve grup için). D = Dişi; E = Erkek; K = Kontrol; DA = Düşük anksiyete; YA = Yüksek anksiyete; n.s. = anlamlı değil. * $p < 0.05$.

4.2. Anksiyete Benzeri Davranış Düzeylerinin Karşılaştırılması

Erken yaşam stresine maruz kalan yavrular adolesan döneme geldiklerinde anksiyete benzeri davranış düzeylerini belirlemek için yükseltilmiş artı labirent testine tabi tutuldular. Bu yavruların anksiyete benzeri davranış parametrelerinde zaman içerisinde meydana gelen değişimi değerlendirebilmek amacıyla test P60. günde tekrarlandı (Tablo 4.3). P30. günde yapılan testte, erken yaşam stresine maruz kalan dişi sıçanların kapalı kolda kalma süreleri, kontrol gruplarına göre daha uzundu ($p<0.05$); erkek sıçanlarda ise anlamlı bir fark saptanmadı (Şekil 4.1A). Strese maruz kalan dişilerde çevreyi araştırma ve keşfetme davranışına paralellik gösteren giriş-çıkış sayılarında da anlamlı düzeyde ($p<0.001$) azalma görüldü (Şekil 4.1B). Kontrol grubundaki dişi sıçanların kapalı kolda kalma süresi erkeklere kıyasla anlamlı ($p<0.05$) derecede düşük iken; labirentin açık ve kapalı kollarına giriş sayısı anlamlı derecede yüksekti (Tablo 4.3, $p<0.001$). Ancak stres grubunda cinsiyetler arasında böyle bir farklılık gözlenmedi.

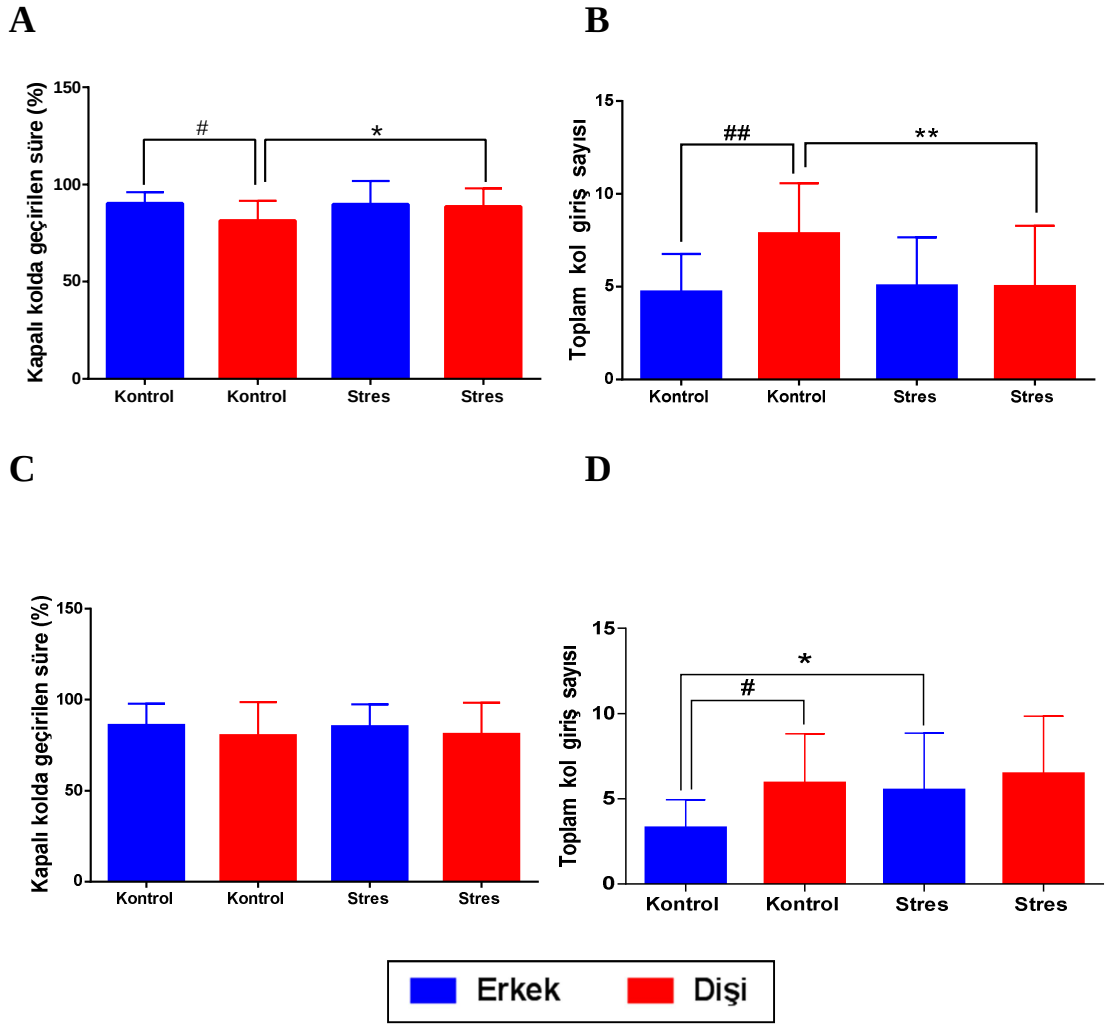
P60. günde, kontrol ve stres grubundaki sıçanların kapalı kolda kalma süreleri arasında gözlenen fark ortadan kayboldu (Şekil 4.1C). Stres grubundaki erkeklerin labirentin açık ve kapalı kollarına giriş sayısı kontrol gruplarına göre anlamlı derecede ($p<0.05$) artış gösterdi (Şekil 4.1D). Kol giriş sayıları bakımından stres grubunda cinsiyete göre bir fark gözlenmezken, kontrol gruplarındaki dişilerin erkeklere oranla daha fazla giriş-çıkış yaptığı gözlemlendi (Tablo 4.3, $p<0.05$).

Bundan sonraki testlerde PFK'deki nöronlarda meydana gelen morfolojik değişiklikler ile yavruların anksiyete düzeyleri arasındaki ilişkiyi incelemek amacıyla, strese maruz kalan yavrular anksiyete düzeylerine göre YA ve DA olmak üzere iki gruba ayrıldılar. Bunun için P30 ve P60. günlerde uygulanan yükseltilmiş artı labirenti testindeki kapalı kolda kalma sürelerinin ortalama değeri hesaplanarak, elde edilen değerler büyükten küçüğe doğru sıralandı. En büyük ortalamaya sahip sıçanlar YA, en küçük ortalamaya sahip sıçanlar ise DA grubu olarak belirlendi.

Tablo 4.3. Anksiyete ve depresyon benzeri davranış düzeyleri.

(P30. GÜN)		KONTROL		STRES		<i>p</i> değeri
<i>Kapalı kolda</i>	D	81.29 ±2.879		88.60 ±1.777		KD-SD:*
<i>geçirilen süre (%)</i>	E	90.31 ±1.798		89.81 ±2.015		KD-KE:*
<i>Kollara giriş sayısı</i>	D	7.846 ±0.7583		5.000 ±0.5969		KD-SD:**
	E	4.700 ±0.6506		5.030 ±0.4574		KD-KE:**
(P60. GÜN)						
<i>Kapalı kolda</i>	D	80.32 ±5.114		80.89 ±3.283		n.s.
<i>geçirilen süre (%)</i>	E	85.83 ±3.776		85.24 ±2.054		
<i>Kollara giriş sayısı</i>	D	5.923 ±0.8043		6.464 ±0.6393		KD-KE:*
	E	3.300 ±0.5175		5.512 ±0.5205		KE-SE:*
(P60. GÜN)						
<i>ZYT’de hareketsiz kalma süresi</i>	D	102.6 ±9.7		101.7 ±11.4	101.8 ±12.2	KD-KE:*
	E	48.3 ±9.3		42.2 ±7.9	104.0 ±18.9	KE-DAE:*
						DAE-YAE:**
						YAD-YAE:

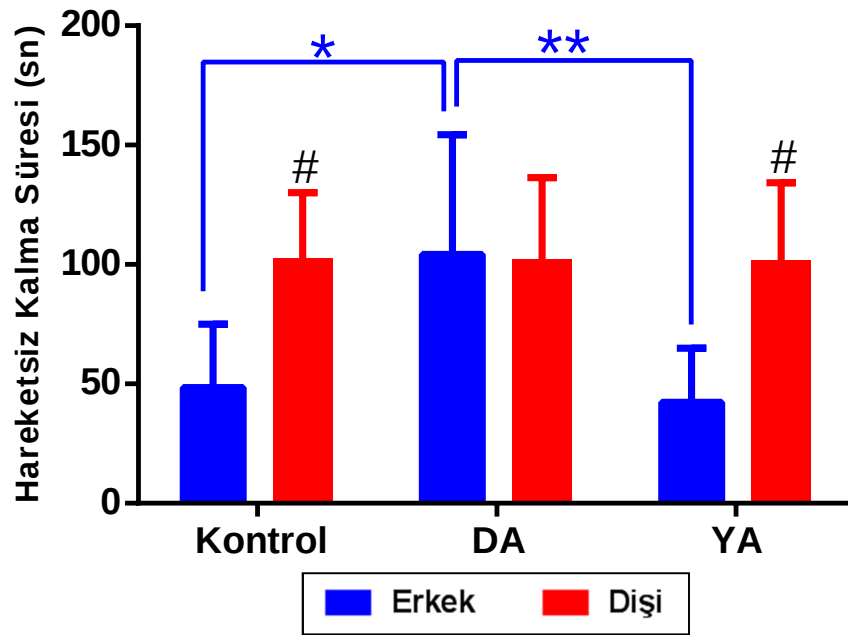
Tabloda verilen değerler, ortalama ± standart hata değerlerini göstermektedir (n=12 kontrol grupları için, n=41 stres erkek grubu için, n=30 stres dişi grubu için). D = Dişi; E = Erkek; K = Kontrol; S = Stres; DA = Düşük anksiyete; YA = Yüksek anksiyete; n.s. = anlamlı değil; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.



Şekil 4.1. Strese maruz kalan dişi ve erkek sıçanların anksiyete benzeri davranışlarının karşılaştırılması. P30. (A-B) ve P60. günde (C-D) uygulanan yükseltilmiş artı labirent testinde sıçanların kapalı kolda kaldıkları süre ve kollara toplam giriş sayıları çift yönlü varyans analizi ile karşılaştırılmıştır. Grafiklerde verilen değerler ortalama $\pm$ standart sapma değerlerini göstermektedir (Her iki cinsiyet için; $n=10$ kontrol grubu ve $n=32$ stres grubu). * $p<0.05$, ** $p<0.01$: ANOVA gruplar arası farklılık. # $p<0.005$, ## $p<0.01$: ANOVA cinsiyetler arası farklılık.

4.3. Depresyona Yatkınlık Düzeylerinin Karşılaştırılması

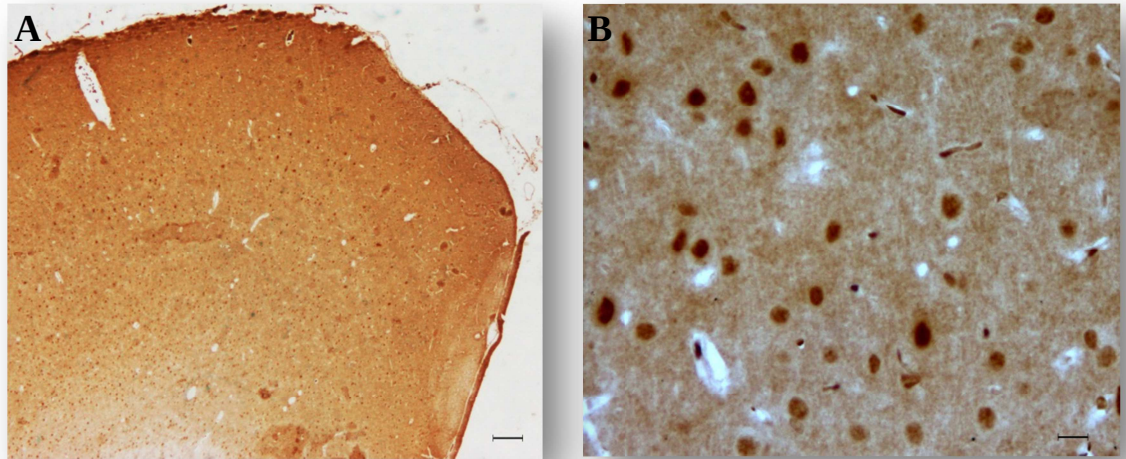
Yüksek ve düşük anksiyete seviyesine sahip oldukları belirlenen yavruların prefrontal kortekslerinde bulunan nöronlarının stres maruziyeti sonrasındaki aktivasyon düzeylerini değerlendirmek amacıyla hayvanlar P60. günde sakrifiye edilmeden hemen önce zorlu yüzme testine tabi tutuldular. Bu test aynı zamanda yavruların öğrenilmiş çaresizlik düzeylerini ölçmek suretiyle hayvanların depresyon benzeri davranış düzeylerinin de karşılaştırılmasını sağladı. Hayvanların hareketsizlik süreleri gruplara ve cinsiyete göre iki yönlü varyans analizi ile karşılaştırıldığında, dişilerde gruplar arasında anlamlı bir farklılığın olmadığı görüldü. Erkeklerde ise DA grubunun hareketsizlik süresi kontrol grubuna ($p<0.05$) ve YA grubuna ($p<0.01$) göre anlamlı düzeyde yüksek olarak bulundu (Şekil 4.2). Kontrol ve YA gruplarında dişi sıçanların hareketsizlik sürelerinin erkek sıçanlara oranla daha uzun olduğu ($p<0.05$), DA grubunda ise belirgin bir farklılığın olmadığı gözlemlendi (Tablo 4.3).



Şekil 4.2. Düşük ve yüksek anksiyeteli dişi ve erkek sıçanların depresyona yatkınlık düzeylerinin karşılaştırılması. Grafiklerde verilen değerler zorlu yüzme testi esnasında sıçanların hareketsiz kaldıklarının sürenin ortalama $\pm$ standart sapma değerlerini göstermektedir ($n=8$, her iki cinsiyet ve grup için). * $p<0.05$, ** $p<0.01$: ANOVA gruplar arası farklılık. # $p<0.005$: ANOVA cinsiyetler arası farklılık.

4.4. Stres Karşısında Aktive Olan Nöronların Sayısal Analizi

Sıçanlarda zorlu yüzme stresine yanıt olarak aktive olan nöronların belirlenmesinde *c-Fos* immunohistokimyası kullanıldı (Şekil 4.3). Medial PFK sahalarında bulunan toplam *c-Fos* (+) nöron sayısı optik parçalama yöntemi ile hesaplandı. Bu sayıların gruplar ve cinsiyetler arasındaki farklılıkları çift yönlü varyans analizi ile karşılaştırıldığında, YA seviyesine sahip erkek sıçanların nöronal aktivasyon düzeyinin kontrol ($p<0.0001$) ve DA ($p<0.001$) gruplarına göre anlamlı derecede yüksek olduğu bulundu (Şekil 4.4). Benzer şekilde dişilerde de YA seviyesine sahip sıçanlarda toplam *c-Fos* (+) nöron sayısı kontrol ($p<0.0001$) ve DA ($p<0.0001$) gruplarına göre anlamlı derecede yüksekti (Şekil 4.4). Cinsiyetler arasında ise anlamlı bir fark bulunmadı (Tablo 4.4).

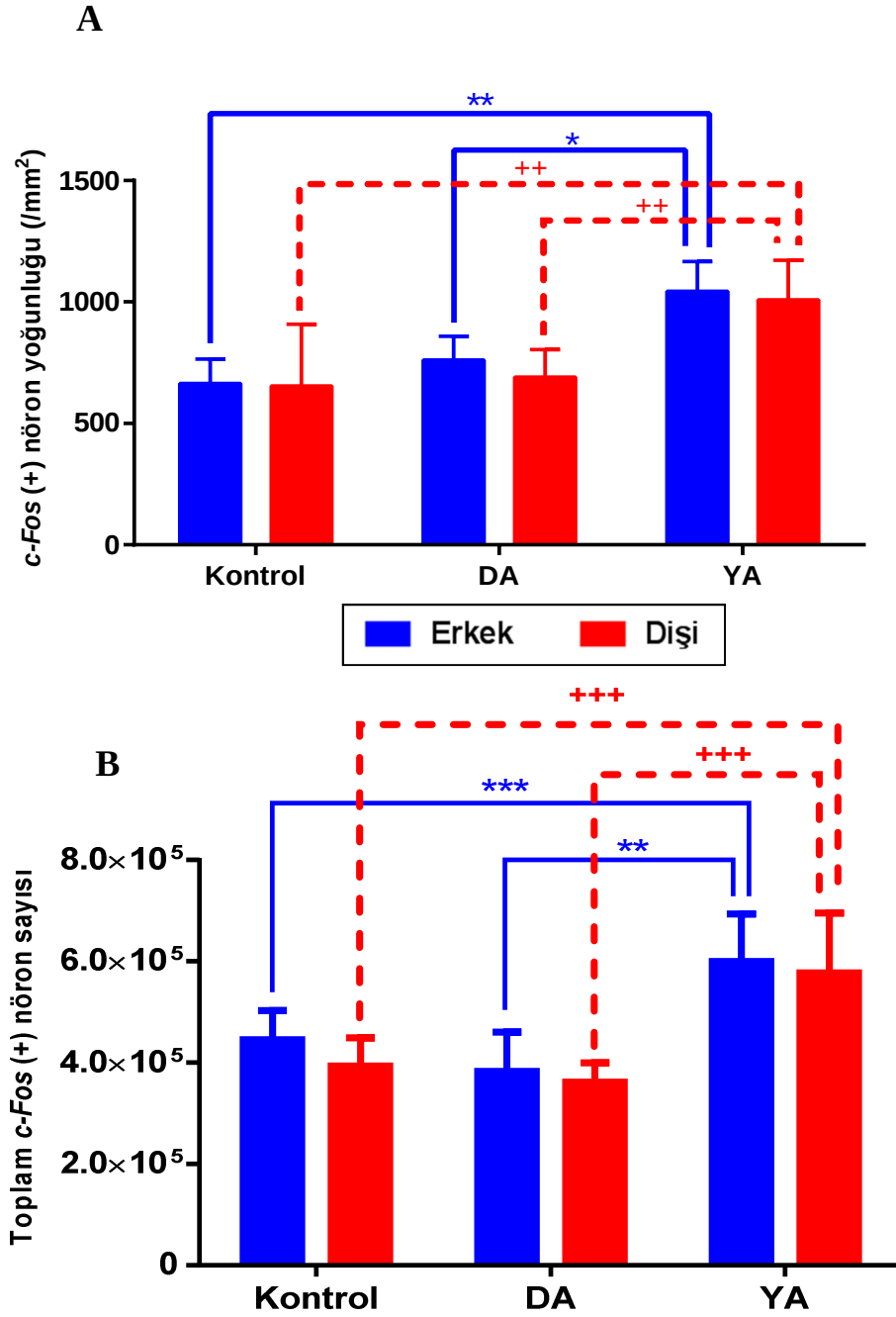


Şekil 4.3. Prefrontal kortekste *c-Fos* immunohistokimyası ile boyanmış nöronların küçük (A) ve büyük (B) büyütmedeki fotomikrografileri. Skala, A’da 100 μm , B’de 10 μm ’ye karşılık gelmektedir.

Tablo 4.4. PFK'deki nöron aktivasyonu düzeyleri ve dendrit morfolojisi.

		KONTROL	YA	DA	p değeri
<i>Toplam c-Fos (+) nöron sayısı</i>	D	393500 ±21054	576839 ±44607	361593 ±13505	KD-YAD:*** DAD-YAD:***
	E	444813 ±23680	599795 ±38329	383135 ±31425	KE-YAE:*** DAE-YAE:**
<i>c-Fos (+) nöronların yoğunluğu (/mm²)</i>	D	654.8 ±95.6	1009.2 ±61.3	690.9 ±40.1	KD-YAD:** DAD-YAD:**
	E	664.2 ±41.5	1044.8 ±49.7	760.5 ±40.5	KE-YAE:** DAE-YAE:*
<i>Toplam dendrit uzunluğu (μm)</i>	D	725.94 ±24.73	579.13 ±15.73	582.94 ±19.35	KD-KE:*** KD-DAD:*** KD-YAD:***
	E	888.18 ±27.35	555.51 ±17.49	488.31 ±17.77	KE-DAE:*** KE-YAE:*** DAD-DAE:*
<i>Dikensi çıkıntı yoğunluğu (μm)</i>	D	0.592 ±0.015	0.283 ±0.008	0.412 ±0.012	KD-KE:*** KD-DAD:*** KD-YAD:***
	E	0.834 ±0.063	0.291 ±0.013	0.360 ±0.032	DAD-YAD:** KE-DAE:*** KE-YAE:***

Tabloda verilen değerler, ortalama ± standart hata değerlerini göstermektedir (n=8, her iki cinsiyet ve grup için). ZYT = Zorlu yüzme testi; D = Dişi; E = Erkek; K = Kontrol; DA = Düşük anksiyete; YA = Yüksek anksiyete; n.s. = anlamlı değil. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$.



Şekil 4.4. Düşük ve yüksek anksiyeteli dişi ve erkek sıçanların PFK'deki *c-Fos* (+) nöronların sayısal yoğunluklarının (A) ve toplam sayılarının (B) karşılaştırılması. Grafiklerde verilen değerler ortalama $\pm$ standart hata değerlerini göstermektedir (n=8, her iki cinsiyet ve grup için). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$: ANOVA erkek gruplar arası farklılık. ++ $p < 0.01$, +++ $p < 0.001$: ANOVA dişi gruplar arası farklılık.

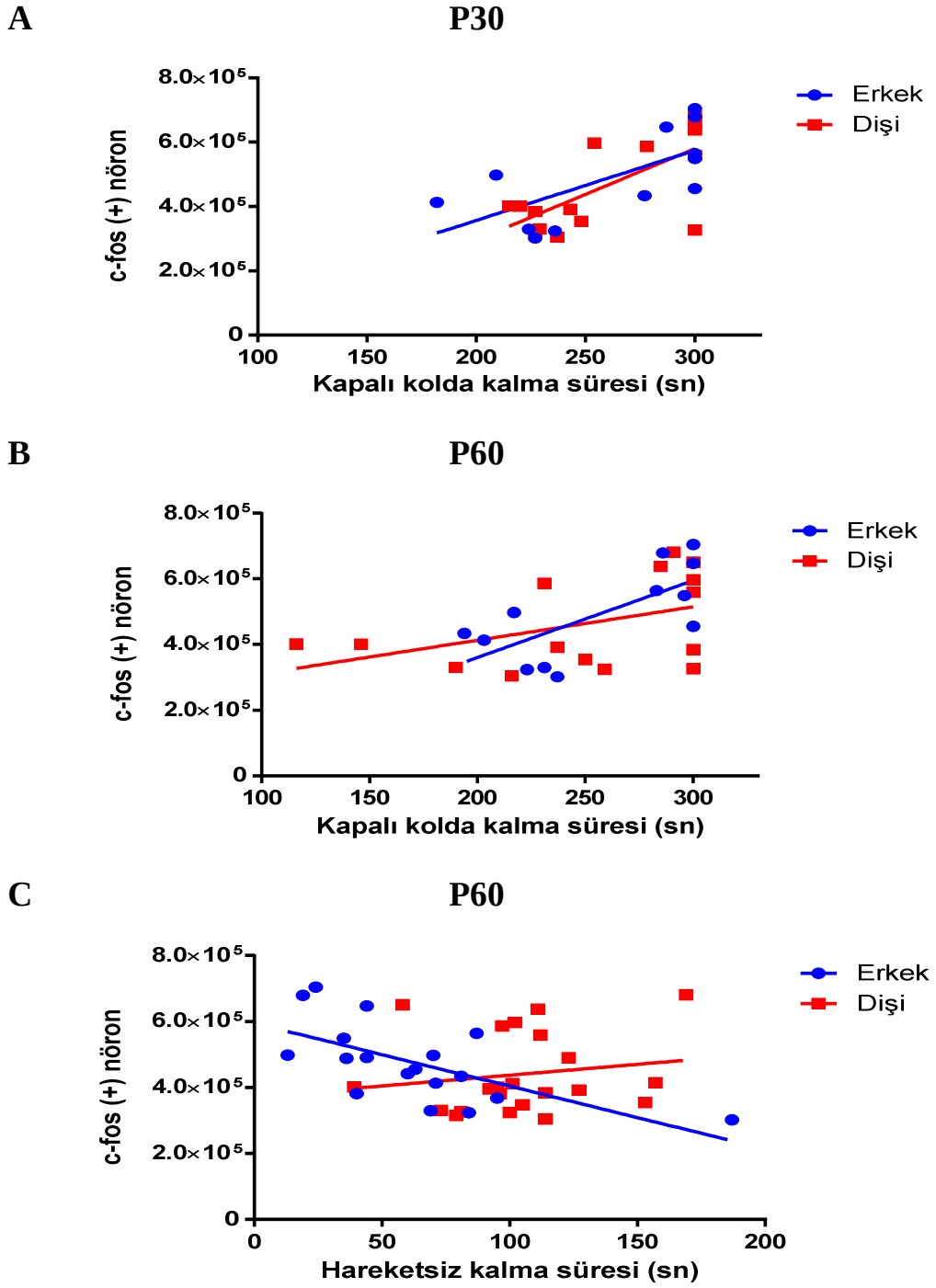
4.5. Nöronal Aktivasyon ile Emosyonel Göstergelerin Korelasyonu

YA düzeyine sahip dişi ve erkek yavrularda PFK'deki nöronal aktivasyon düzeyindeki artışın, yavruların emosyonel durumunda gözlenen değişikliklerle ilişkisini araştırmak amacıyla; anksiyete ve depresyona yatkınlık düzeyi parametreleri ile toplam *c-Fos* (+) nöron sayıları arasındaki ilişki Pearson korelasyon analizi ile test edildi. Yavruların anksiyete seviyesindeki artışı gösteren kapalı kolda kalma süresinin P30. günde yapılan ölçümleri ile PFK'deki toplam *c-Fos* (+) nöron sayısı arasında dişilerde ($p=0.0038$, $r=0.6975$) erkeklerde ($p=0.0159$, $r=0.6756$) göre daha güçlü olmak üzere pozitif bir korelasyon olduğu saptandı (Şekil 4.5A). P60. günde tekrarlanan anksiyete düzeyi ölçümlerine göre yapılan korelasyon analizlerinde ise erkeklerdeki pozitif korelasyonun güçlenerek devam etmesine rağmen ($p=0.0108$, $r=0.7030$) dişilerde anksiyete düzeyi ile aktive nöron sayıları arasında anlamlı korelasyon olmadığı ($p=0.1014$, $r=0.4392$) gözlemlendi (Şekil 4.5B).

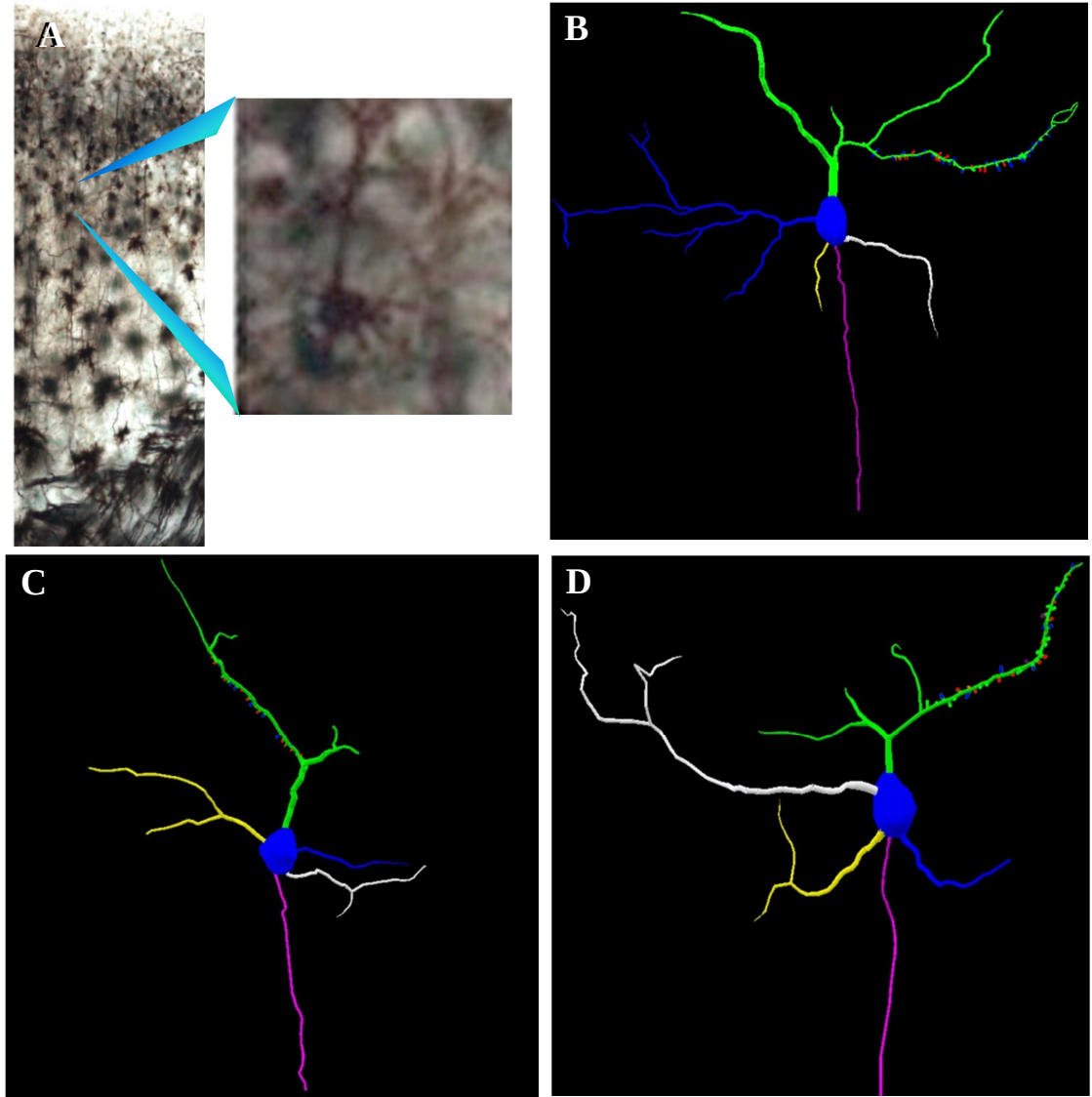
Yavruların depresyona yatkınlık seviyesindeki artışı gösteren zorlu yüzme testindeki hareketsizlik süresi ile PFK'deki toplam *c-Fos* (+) nöron sayısı arasındaki ilişki araştırıldığında; dişilerde anlamlı bir korelasyon olmadığı ($p=0.4630$, $r=0.1650$), erkeklerde negatif bir korelasyon olduğu ($p=0.0046$, $r=-0.6349$) saptandı (Şekil 4.5C).

4.6. Kortikal Nöronların Dendritik Analizi

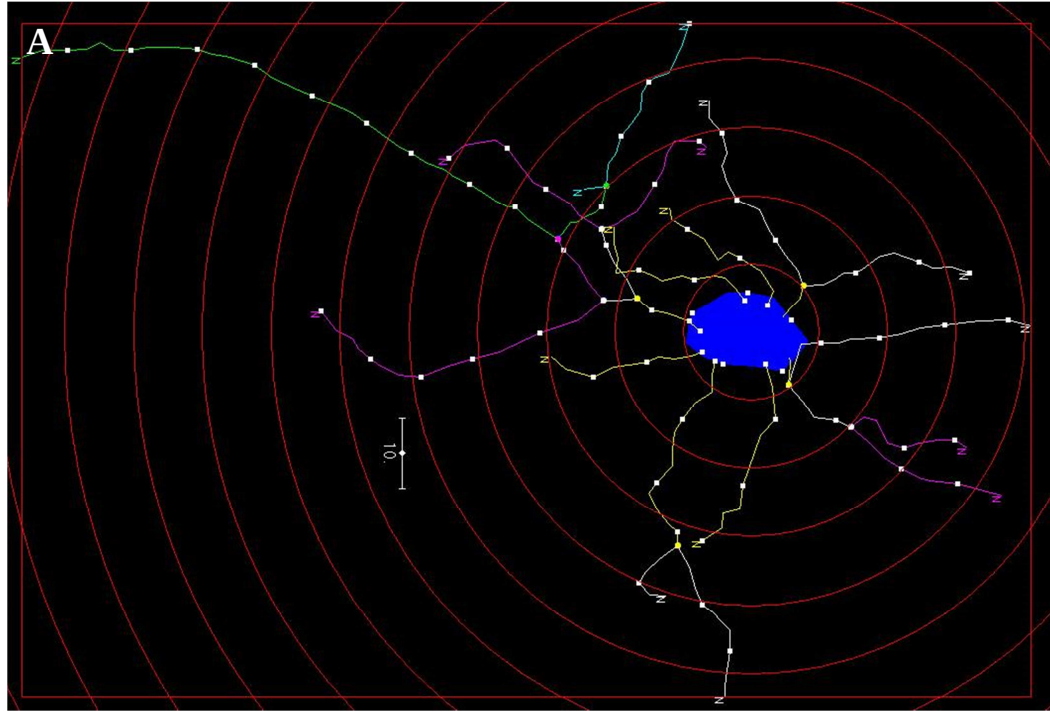
PFK'deki piramidal nöronların dendritik analizlerinin karşılaştırılmasında Golgi-Cox yöntemi kullanıldı (Şekil 4.6A). Bu amaçla, PFK'nin II/III. tabakalarında lokalize olan nöronlar Neurolucida yazılım programı kullanılarak dijital ortamda çizildi (Şekil 4.6B-D). Kontrol (Şekil 4.6B) ve DA grubundaki (Şekil 4.6C) nöronların apikal dendritik dallanma paternleri ve üzerinde bulunan dikensi çıkıntı yoğunlukları birbirlerine benzerlik göstermekle birlikte, YA grubundaki (Şekil 4.6D) nöronların dal sayılarında ve dikensi çıkıntılarda belirgin bir azalma olduğu dikkati çekmekteydi. Nöronların toplam dendritik uzunluklarının hesaplanmasında, Sholl analizi kullanılarak soma etrafındaki konsantrik halkalar ile kesişen dendritik dallar sayıldı (Şekil 4.7A). Elde edilen veriler gruplara ve cinsiyetlere göre iki yönlü varyans analizi ile karşılaştırıldığında, DA ($p<0.001$) ve YA'lı grupların ($p<0.001$) toplam dendrit uzunlukları hem erkek hem de dişilerde kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük bulundu (Şekil 4.7B).



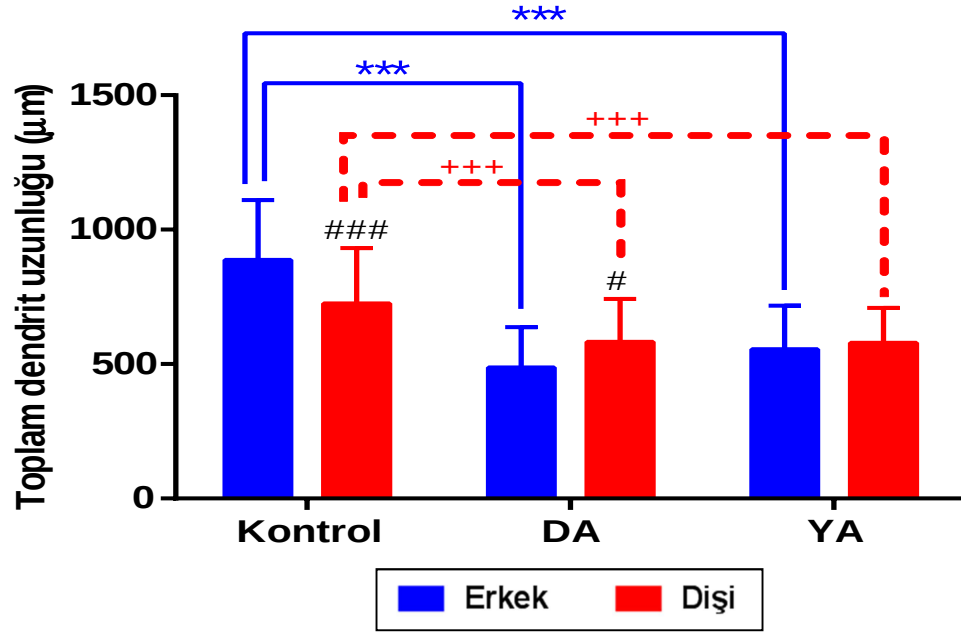
Şekil 4.5. Nöronal aktivasyon ile emosyonel göstergelerin korelasyon analizi. P30. günde (A) ve P60. günde (B) anksiyete benzeri davranış göstergesi olarak kullanılan kapalı kolda kalma süresi ve depresyona yatkınlık göstergesi olarak kullanılan hareketsiz kalma süresi (C) ile PFK'deki toplam *c-Fos* (+) nöron sayıları arasındaki ilişki Pearson korelasyon analizi ile değerlendirilmiştir (n=16, her iki cinsiyet için).



Şekil 4.6. PFK'deki piramidal nöronların dendritik analizi. PFK'nin II/III. tabakasındaki Golgi-Cox yöntemi ile boyanan piramidal nöronlar (A) dijital ortamda çizilerek, apikal (yeşil) ve bazal dendritlerinin (mavi, sarı ve beyaz) toplam uzunlukları hesaplanmıştır. Kontrol (B), DA (C) ve YA (D) gruplarındaki piramidal nöronların aksonları (mor) ve apikal dendritlerinin 3. dalları üzerinde bulunan dikensi çıkıntılar farklı belirteçlerle işaretlenmiştir.



B

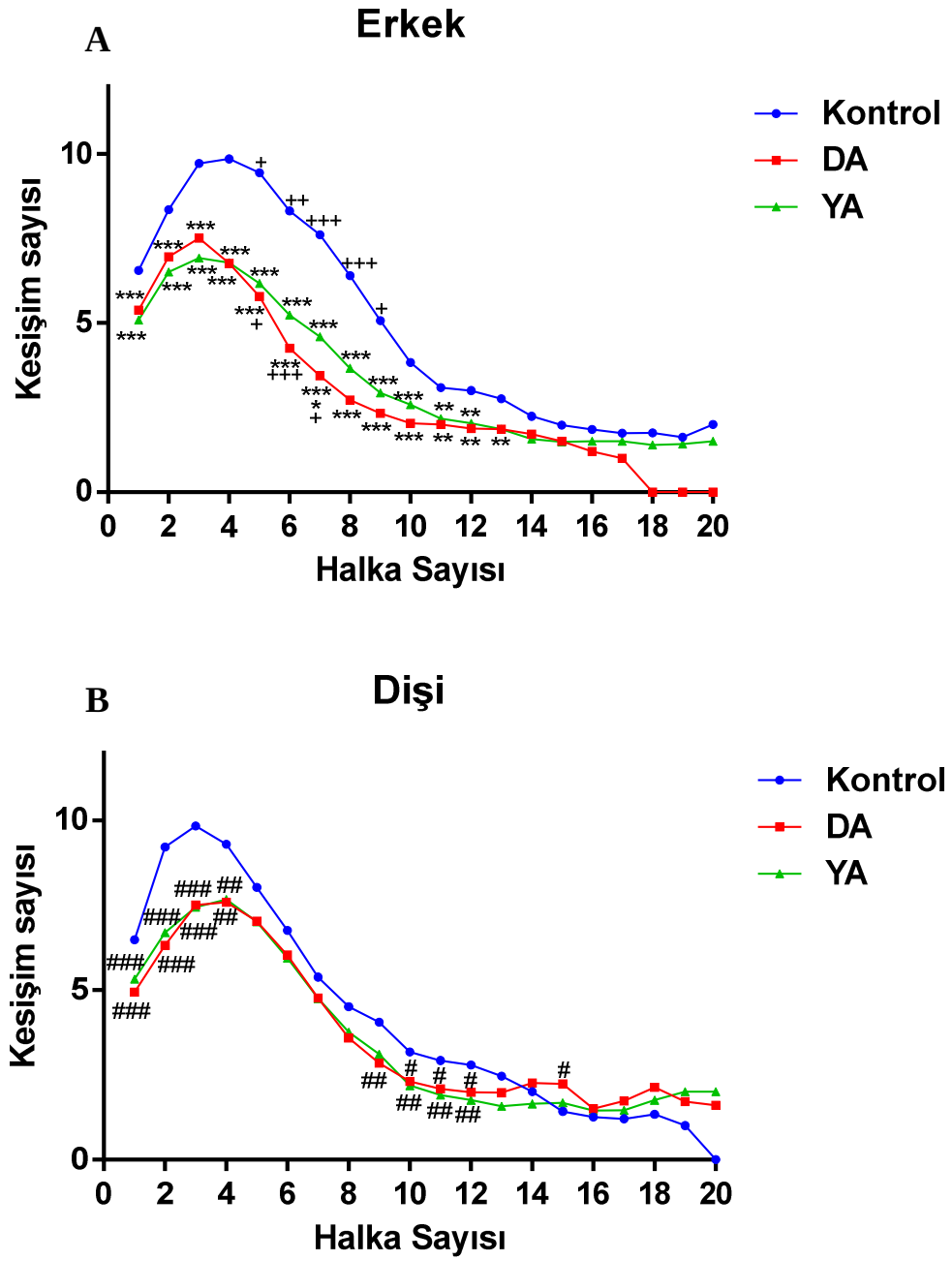


Şekil 4.7. PFK'deki piramidal nöronların toplam dendrit uzunluklarının karşılaştırılması. Sholl analizi (A) kullanılarak hesaplanan toplam dendrit uzunlukları iki yönlü varyans analizi ile karşılaştırılmıştır (B). Grafiklerde verilen değerler her gruptan 160 farklı nöronun ortalama $\pm$ standart sapma değerlerini göstermektedir. *** $p < 0.001$: ANOVA erkek gruplar arası farklılık. +++ $p < 0.001$: ANOVA dişi gruplar arası farklılık. # $p < 0.05$, ### $p < 0.001$: ANOVA cinsiyetler arası farklılık.

Toplam dendritik uzunlukların cinsiyetlere göre farklılıkları karşılaştırıldığında, kontrol grubundaki dişilerin uzunlukları erkeklere oranla anlamlı derecede ($p<0.001$) düşük bulundu. Tam tersine DA gruplarında dişilerin toplam dendritik uzunlukları erkeklere oranla daha fazla idi (Tablo 4.4, $p<0.05$). YA gruplarında ise dişi ve erkekler arasında gözlenen farklılığın ortadan kaybolduğu gözlemlendi (Şekil 4.7B).

Dendritik dalların kompleksite düzeylerini karşılaştırmak için somanın etrafında yerleştirilen konsantrik halkalar ile kesişen dendritik dal sayıları karşılaştırıldı. Erkeklerde, DA ve YA grubunda somaya daha yakın olan proksimal dendritik dal sayısının kontrol grubuna kıyasla daha az olduğu gözlemlendi (Şekil 4.8A). Somadan 60-100 mikrometre uzaklaşıldığında, DA'lı grubun distal dendrit dal sayısının hem kontrol hem de YA grubuna kıyasla anlamlı düzeyde düşük olduğu gözlemlendi. Dişilerde de hem YA, hem de DA gruplarındaki proksimal dendritik dalların kontrol gruplarına oranla anlamlı derecede düşük olduğu gözlemlendi (Şekil 4.8B). Ancak somadan 50 mikrometre uzaklaşıldığında gruplar arasındaki farklılığın ortadan kaybolduğu gözlemlendi. Daha distal dendritlere doğru gidildiğinde (somadan 100-120 mikrometre uzaklıkta) YA ($p<0.01$) ve DA ($p<0.05$) grubundaki dişilerin dendritik dal sayısı kontrol grubuna oranla daha düşük olarak bulundu.

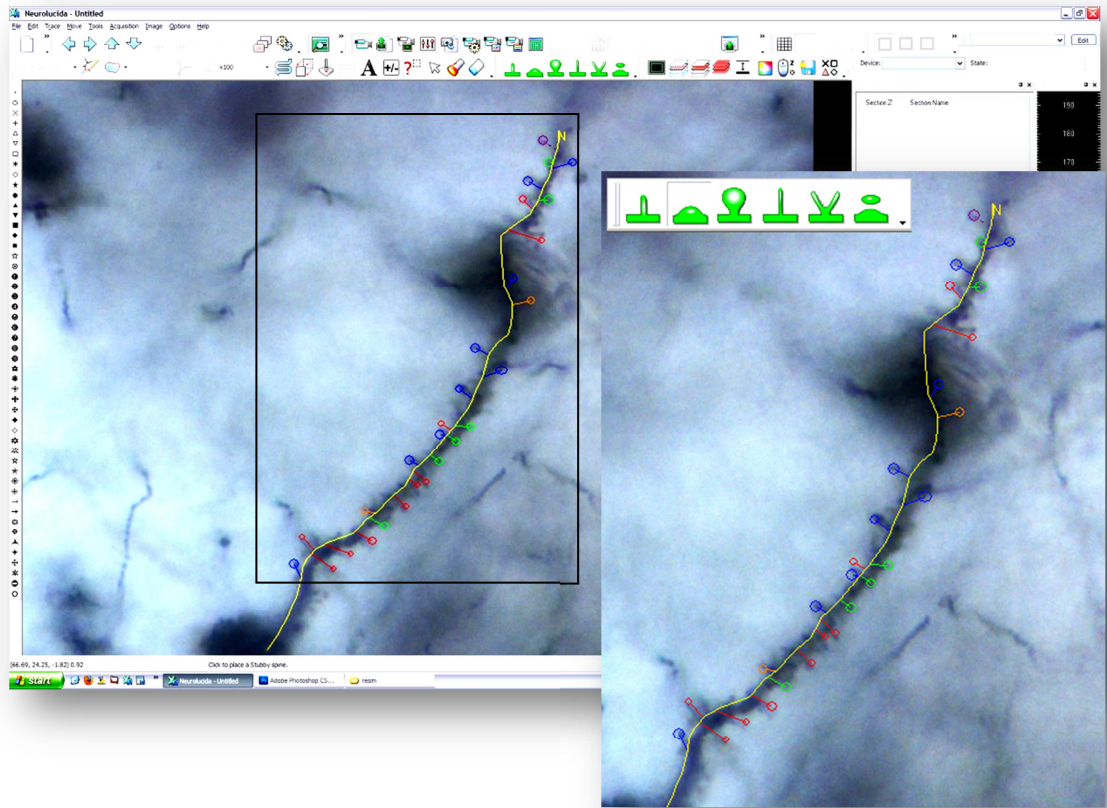
Dendritik dal sayılarının cinsiyetlere göre farklılıkları karşılaştırıldığında özellikle kontrol grubundaki erkeklerin distal dendritik dal sayılarının (somadan 50-90 mikrometre uzaklıkta) dişilere oranla daha yüksek olduğu gözlemlendi. Ancak stres maruziyeti sonrasında, özellikle DA gruplarında, dendritik kompleksitenin erkeklerin aleyhine olacak şekilde anlamlı düzeyde azaldığı gözlemlendi ($p<0.05$).



Şekil 4.8. Kortikal piramidal nöronların dendrit kompleksitelerinin karşılaştırılması. Grafiklerde verilen değerler, erkeklerde (A) ve dişilerdeki (B) Sholl analizi esnasında kullanılan konsantrik halkalarla kesişen dendritik dal sayılarını göstermektedir.

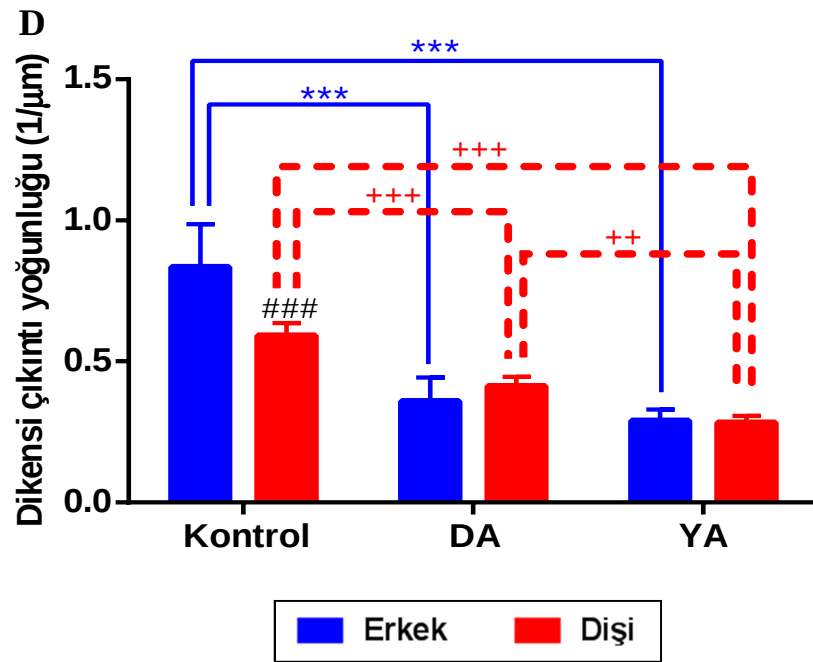
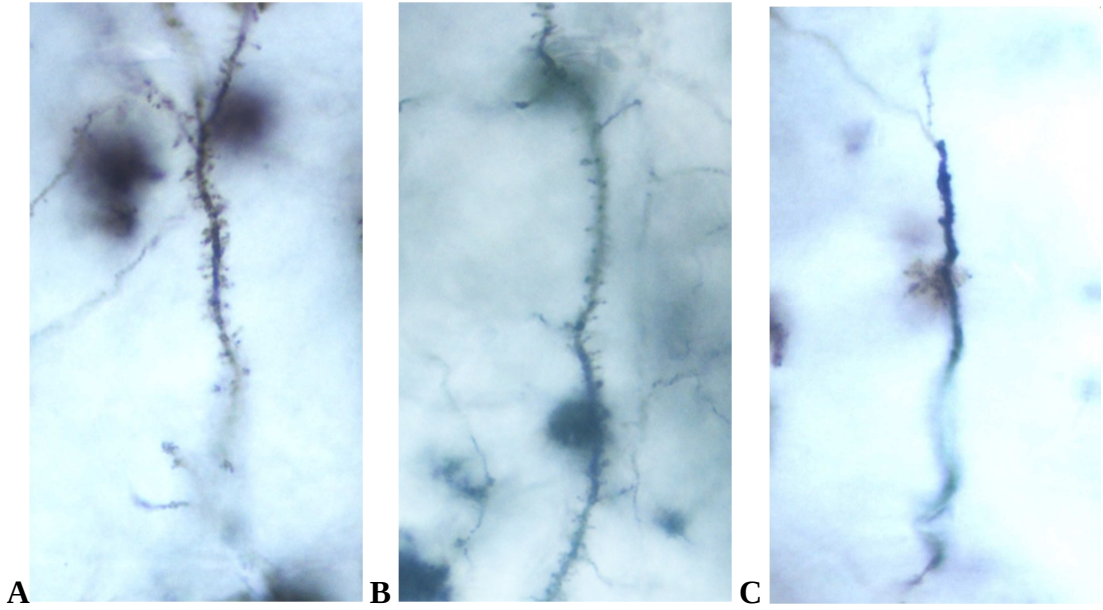
* Kontrol erkek ve YA erkek ($p<0.05$), ** Kontrol erkek ve YA erkek ($p<0.001$), ## Kontrol dişi ve DA dişi ($p<0.001$), ### Kontrol dişi ve YA dişi ($p<0.001$), + ($p<0.05$), ++ ($p<0.01$), +++ ($p<0.001$) cinsiyetler arasındaki farklılıkları göstermektedir.

Piramidal nöronların üzerinde bulunan dikensi çıkıntılarının yoğunluklarının hesaplanması ve tipolojisinin belirlenmesinde de yine Neurolucida yazılım programının *spine* analiz probu kullanıldı (Şekil 4.9). Prefrontal korteksin II/III. tabakalarında lokalize olan piramidal nöronların apikal dendritlerinin 3° dalları üzerindeki dikensi çıkıntılar immersiyon objektifi altında çizildi. Bu çıkıntılar, yapısal ve işlevsel özelliklerine göre farklı belirteçlerle işaretlenerek sayıldı.



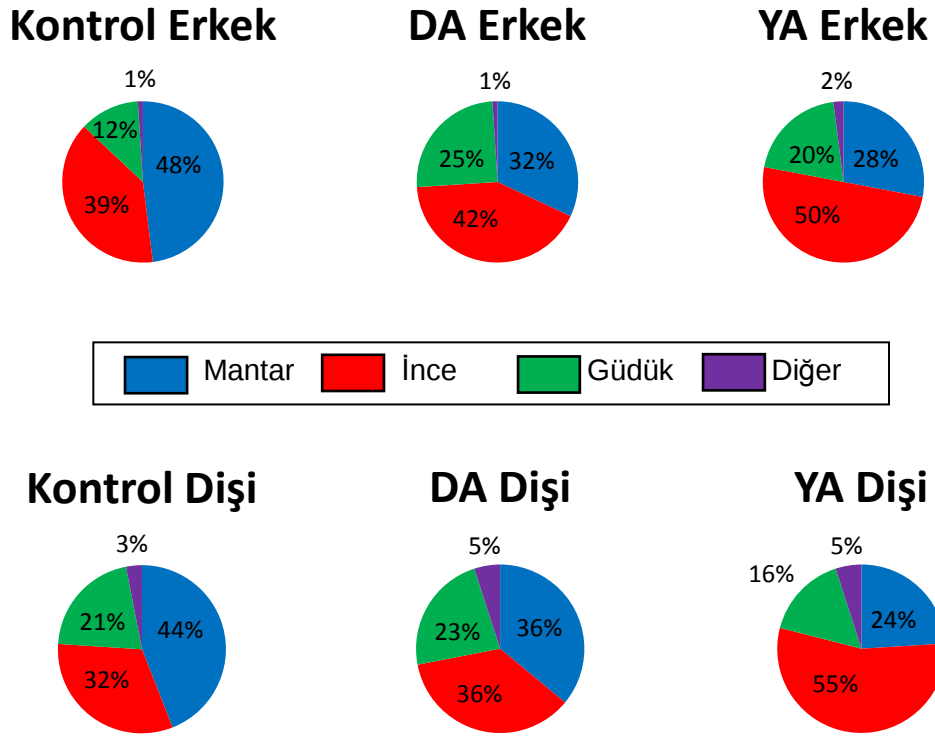
Şekil 4.9. Piramidal nöronlardaki dendritlerin dikensi çıkıntılarının tiplerinin belirlenmesi. Dikdörtgen kutu içinde çizilen apikal dendrit üzerindeki mantarimsı, ince, güdük veya dallı tipteki dikensi çıkıntılarının büyük büyütmedeki görüntüsü ve tipolojide kullanılan belirteçler gösterilmektedir.

Dikensi çıkıntılarının, her iki cinsiyette de erken yaşam stresine maruz kalan yavrularda dramatik bir şekilde azalmış olduğu dikkati çekmekteydi (Şekil 4.10A-C). Bu çıkıntılarının birim uzunluğa düşen sayıları gruplara ve cinsiyete göre karşılaştırıldığında da; hem erkeklerde, hem de dişilerde kontrol grubundaki nöronlar üzerinde bulunan çıkıntı sayısının, DA ve YA grubundakilere kıyasla anlamlı ($p<0.0001$) derecede yüksek olduğu bulundu (Şekil 4.10D). Erkeklerde YA ve DA grupları arasında anlamlı bir fark yokken; dişilerde YA grubundaki dikensi çıkıntı yoğunluğunun DA grubundakilere oranla daha düşük ($p<0.001$) olduğu görüldü. Dikensi çıkıntı yoğunluklarının cinsiyetlere göre karşılaştırılması yapıldığında, kontrol grubundaki erkeklerdeki yoğunluğun dişilere kıyasla anlamlı derecede (Tablo 4.4, $p<0.0001$) yüksek olduğu gözlemlendi. YA ve DA grubunda ise erkek ve dişilerin dendritik çıkıntı yoğunlukları arasında anlamlı bir fark yoktu.



Şekil 4.10. Dikensi çıkıntı yoğunluklarının karşılaştırılması. Üst panelde kontrol (A), DA (B) ve YA (C) gruplarındaki apikal dendritlerinin fotomikrografları (100×) görülmektedir. Grafiklerde verilen değerler her gruptan 20 farklı nöronun ortalama yoğunluk $\pm$ standart sapma değerlerini göstermektedir. *** $p < 0.001$: ANOVA erkek gruplar arası farklılık. ++ $p < 0.01$, +++ $p < 0.001$: ANOVA dişi gruplar arası farklılık. ### $p < 0.001$: ANOVA cinsiyetler arası farklılık.

Kontrol ve anksiyete gruplarındaki nöronların dendritik dikensi çıkıntıların tipolojisi incelendiğinde, farklı yapısal ve işlevsel özelliklere sahip olan çıkıntı tiplerinin gruplara göre farklı oranlarda dağıldığı gözlemlendi. Bu dağılımlar cinsiyetlere göre de bazı farklılıklar göstermekteydi. Erkeklerde, mantarimsı tipteki çıkıntıların görülme oranı kontrol grubunda %48 iken, bu oran DA grubunda %32, YA grubunda ise %28'e düştü. Buna karşılık ince tipteki dikensi çıkıntıların görülme oranı kontrol grubunda %39 iken, DA grubunda %42 ve YA grubunda da %50'ye yükseldi. Dişilerde ise; mantarimsı tipteki çıkıntıların görülme oranı kontrol grubunda %44 iken, DA grubunda %36, YA grubunda ise %24'e düştü (Şekil 4.11). Öte yandan ince tipteki dikensi çıkıntıların görülme oranı kontrol grubunda %32'den, DA grubunda %36'ya ve YA grubunda da %55'e yükseldi (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. Farklı tipteki dikensi çıkıntı oranlarının dağılımı.

5. TARTIŞMA

Erken gelişim dönemlerinde strese maruz kalan deney hayvanları üzerinde yapılan araştırmalarda, nöroenezisin olumsuz yönde etkilendiği, nöronal bağlantılarında ciddi düzeyde kayıplar olduğu ve uzun vadede yavruların davranış paternlerinde kalıcı değişiklikler meydana geldiği gösterilmiştir (4). Gebelerin, özellikle birden fazla stres etmenine tekrarlayıcı bir şekilde maruz kalması, kortizol seviyelerinin yükselmesine neden olarak fetal gelişimin etkilenme olasılığını arttırmaktadır (96). Bu projede, erken gelişim evrelerinden itibaren strese maruz kalan sıçanların kortikal nöronlarında meydana yapısal değişikliklerin yavruların emosyonel durumlarıyla ilişkisi araştırılmıştır.

Gelişimlerinin hem prenatal, hem de postnatal dönemleri süresince strese maruz bırakılan deney hayvanları adolesan döneme geldiklerinde spontan lokomotor aktivite düzeylerinde belirgin bir farklılık olmadığı gözlenmiştir. Öte yandan erkeklerde, stres maruziyeti sonrasında stereotipik hareketlerin görülme oranında belirgin bir düşme kaydedilmiştir. Normalde deney hayvanlarının kendi ortamından alınıp tek başına bilmediği bir ortama bırakılması; “*agorofobi*” denilen açık alan korkusu nedeniyle hayvanlarda anksiyete davranışını tetiklenmektedir. Deney hayvanlarının anksiyete düzeyinin değerlendirilmesinde otonom fonksiyonların da göstergesi olan “stereotipik hareketler” ve defekasyon sayısı dolaylı olarak fikir vermektedir. Rodentlerde gözlenen belli başlı stereotipik davranışlar: kemirme, taranma, dikilme, sık sık başını havaya kaldırma, havayı koklama, esneme, yalanma, çiğneme, eksen etrafında dönme ve kaşınma davranışları şeklinde gözlenmektedir (97). Bu nedenle aktivitemetrede deneklerin stereotipik hareketlerinin sayısı genellikle horizontal hareketlerinin sayısına paralellik göstermektedir. Ambulatuvar hareketler, test kafesi içerisinde kat edilen mesafe ve çevreyi keşfetme davranışları ise vertikal hareketlerin sayısı ile doğru orantılı olarak değerlendirilebilmektedir. Çalışmamızda erken yaşam dönemlerinde strese maruz kalan yavruların anksiyete düzeylerinde zaman içinde meydana gelen değişimler incelendiğinde; özellikle DA seviyesine sahip erkek sıçanların stereotipik hareket sayılarında dişilere kıyasla anlamlı bir artış olduğu gözlenmiştir. Tam tersine, yavruların test süresince yapmış oldukları ambulatuvar hareketlerinin dinlenme süresine oranları karşılaştırıldığında dişilerin erkeklere kıyasla daha hareketli oldukları gözlenmiştir. Bu sonuçlar stres

maruziyetinin, cinsiyete bağı bir şekilde, farklı davranış bozukluklarına ve anksiyeteye zemin hazırlayabileceğine işaret etmektedir. Cinsiyetler arasında gözlenen bu farklılıklara literatürlerde de dikkat çekilmektedir (68, 98, 99). Çalışmamızda, yavruların anksiyete düzeyleri yükseltilmiş artı labirent testi ile değerlendirildiğinde, cinsiyete göre farklı sonuçlar elde edilmiştir. Adolesan dönemde yapılan testlerde, kontrol grubundaki erkek yavruların dişilere oranla daha fazla anksiyojenik oldukları gözlenmiştir, ancak stres maruziyeti erkek sıçanların kapalı kolda kalma süresinde bir değişikliğe yol açmamıştır. Oysa erken yaşam stresine maruz kalan dişilerdeki anksiyete düzeyinin anlamlı derecede artış gösterdiği gözlenmiştir. Strese maruz kalan dişi yavruların kapalı kolda kalma süresinin yüksekliğine paralel olarak düzeneğin kollarına giriş-çıkış düzeyi, yani araştırmacı davranış parametreleri de anlamlı derecede düşük bulunmuştur. İlginç bir şekilde P60. güne gelindiğinde tekrarlanan testlerde; erken yaşam stres maruziyetinin ne erkeklerde ne de dişilerde anksiyete düzeyini anlamlı bir şekilde değiştirmedeği gözlenmiştir. Hatta stres grubundaki erkeklerde test düzeneğinin kollarına giriş sayısı kontrol gruplarına kıyasla daha fazla olarak bulunmuştur.

P60. gündeki anksiyete testlerinin sonuçlarına paralel olarak, strese maruz kalan dişilerdeki depresyon benzeri davranış bozukluğuna yatkınlık parametrelerinde de anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. Bu dönemde yapılan zorlu yüzme testlerinde kontrol gruplarında da, YA gruplarında da dişilerin immobilizasyon süresinin erkeklere oranla daha uzun olduğu yani öğrenilmiş çaresizliği daha kolay kabullenerek depresyon benzeri davranışlar gösterdiği gözlenmiştir. Ancak erken yaşam döneminde strese maruz kalan DA'li erkeklerde immobilizasyon süresinin kontrol gruplarındaki yavrulara kıyasla anlamlı derecede artış gösterdiği gözlenmiştir. Bu nedenle davranışa yansıyan etkilerin değerlendirilmesinde cinsiyet faktörü mutlaka göz önünde tutulmalıdır. Prenatal stres maruziyetinin yavruların davranış parametrelerini olumsuz yönde etkilediğine dair literatürde pek çok çalışma bulunmasına rağmen; özellikle depresyon ve anksiyeteye yatkınlık bakımından birbirine zıt sonuçlar gösteren çalışmalara da rastlamak mümkündür (100, 101). Bu varyasyonların ortaya çıkmasında cinsiyete bağı farklılıklar ve nörokimyasal düzeyde meydana gelen değişiklikler kritik bir rol oynadığına işaret edilmektedir

(102). Bizim projemizdeki davranış testlerinden elde ettiğimiz sonuçlar da bu anlamda literatüre önemli bir katkı sağlayacaktır.

Stres maruziyetinin bazı davranış parametreleri üzerindeki etkileri gelişim döneminin ileri evrelerinde anlamlılık düzeyini kaybetmekle birlikte, bu yavruların beyinlerinde meydana gelen morfolojik değişikliklerin kaybolmadığı gözlenmiştir. Beyinde gözlenen değişiklikler araştırılırken özellikle prefrontal korteks bölgesindeki nöronlar üzerine odaklanılmıştır. Beynin bu bölgesi dikkatin yeniliklere odaklanmasında, düşünme, davranış uyum ve kişilik üzerinde önemli rol oynamaktadır. Ayrıca son zamanlarda diğer beyin bölgelerini de kapsayan devrelerle olan bağlantıları nedeniyle bellek ve öğrenme işlevleriyle de yakından ilişkili olduğu üzerinde durulmaktadır. Bu nedenle çalışmamızda yavruların yaşamlarının ileri dönemlerinde tekrarlayan bir stres maruziyeti karşısında vereceği yanıtın derecesini değerlendirmek amacıyla, PFK'deki nöronlarda meydana gelen aktivasyon derecesi incelenmiştir. Bu nöronlara ilişkin sayısal verilerin elde edilmesinde, yapının morfolojik özelliklerinden mümkün olduğunca bağımsız, yani gerçek değerden sistematik bir sapma göstermeyen, tekrar edilebilir ve güvenilir sonuçların elde edilmesini sağlayacak yöntemlerin kullanılması esastır. Bu projede, PFK'de aktivasyon gösteren *c-Fos* (+) nöron sayılarında meydana gelen değişiklikler tasarım-tabanlı stereolojik sayım yöntemleri kullanılarak analiz edildiği için, daha doğru ve daha tarafsız bir değerlendirmenin yapılması mümkün olmuştur.

Stereolojik yöntemler temelde istatistiksel bazda yapılan analiz teknikleri olup, düzlem kesit veya doğrusal prob'lar üzerinde yapılan ölçümlere dayanarak tesadüfi (randomize) küme modelleri ile kompleks paternleri açıklamayı amaçlamaktadır. Bu yöntemlerin kullanımı sayesinde ilgilenilen yapıların iki boyutlu görüntüleri üzerinden herhangi bir ön kabul yapmaksızın ve düzeltme faktörlerine gerek kalmadan üç boyutlu verilerin elde edilmesi mümkün hale gelmiştir (103). Bununla birlikte stereolojik yöntemlerin uygulama aşamasında, kesit görüntülerinin alan örneklemeleri ve bu alanlar üzerinde rastgele belirlenen adımlarda ilgili ölçümlerin yapılması aşamaları çok fazla emek gerektirmekte ve araştırmacıların çok fazla zaman harcamasına neden olmaktadır. Ancak projemizde kullanılan stereoloji yazılım programı sayesinde sayımlarda kullanıcı hatasından kaynaklanabilecek

tarafllık önemli ölçüde bertaraf edilmiş, böylece çalışmamızın güvenilirliği ve tekrarlanabilirliği artmıştır.

PFK'de optik parçalama yöntemi kullanılarak hesaplanan toplam *c-Fos* (+) nöron sayısı, hem dişilerde hem de erkeklerde anksiyete düzeyine paralel olarak anlamlı derecede artış göstermektedir. *c-Fos* geni hücrede herhangi bir uyarana karşı ilk yanıt veren genlerdendir [*Immediate-Early Gene* (IEG) veya *Early Responses Genes*]. Bu gruba giren genler hücre büyümesi, çoğalması, farklılaşması ve hücrenin programlı ölümü (apoptozis) ile ilgili transkripsiyon faktörleridir (104, 105). Çekirdeksel bir transkripsiyon faktörü olan *c-Fos* geni, nükleer üçüncü ulak veya hücresel işlevler yönünden ana anahtar olarak düşünölmektedir ve hücre çoğalması ve farklılaşması sırasında gen ekspresyonunun aşamalı düzenlenmesi ile ilgilidir (106). Bu genin hücredeki ekspresyonu ve birikimi çeşitli uyarılara yanıt olarak hücre aktivasyonu ile birlikte artış göstermektedir. Bu yüzden *c-Fos* gibi IEG'lerin ekspresyonu, merkezi sinir sisteminde nöronal aktivite göstergesi olarak kullanılmaktadır (107). Bazı uyarı çeşitlerini takiben ilgili nöron topluluklarının çekirdeklerinde Fos proteinlerinin uyarılma özelliğinden dolayı; *c-Fos* immunohistokimyasından merkezi sinir sistemindeki nöronal haritalama yönteminde yararlanılmaktadır (108). Bizim çalışmamızda da erken yaşam stresinin, hem erkek hem de dişi sıçanlarda medial PFK'deki nöronlarda dramatik bir aktivite değişikliği yaptığı saptanmıştır. Üstelik bu aktivite düzeyi ile bireylerin anksiyete düzeyleri arasında da güçlü bir korelasyon olduğu gösterilmiştir. Literatürde şimdiye dek böyle bir korelasyon analizinin yapıldığı bir çalışmaya rastlanmamıştır. *c-Fos* transkripsiyonunun uyarılması, hücrede 10 dakika içerisinde en üst düzeye ulaşır ve TRE (*tetradecanol phorbol acetate response* – yanıt – *element*) aracılığı ile hedef genlerin transkripsiyonunu aktive eder. PEK (Proenkephalin) ve TH (tirozin hidroksilaz) genleri *c-Fos*'un potansiyel hedefleri olmakla birlikte pek çok bağımsız yeni proteinin de sentezi meydana gelebilmektedir. Sentezlenen proteinler nörotrofik faktörler örneğinde olduğu gibi hücreleri uyarının zararlı etkilerinden korumaya yönelik olabileceği gibi, apoptotik ve nörotoksik süreçleri uyarmaya da aracılık edebilir. Ancak çalışmamızda özellikle erkek sıçanlarda *c-Fos* (+) nöron sayısı ile zorlu yüzme testindeki hareketsizlik süresi yani depresyona yatkınlık düzeyi arasında negatif bir korelasyon olduğu bulunmuştur. Bu sonuçlar, yüksek anksiyeteli deney

hayvanlarında gözlenen *c-Fos* ekspresyonu artışının, depresyon yatkınlığını azaltan genlerin aktivasyonuna neden olabileceğine işaret etmektedir. Depresyon yatkınlığını azaltmaya aday genlerin başında nörotrofinler gelmektedir. Bu nörotrofik faktörler santral sinir sisteminde fizyolojik koşullar altında nöronlar tarafından üretilmekte, anterograd yolla nöron gövdesine taşınmakta ve farklı sinyal iletim mekanizmalarını devreye sokmak suretiyle oldukça geniş bir yelpazede gözlenen etkilerini gösterebilmektedir (109). Son yıllarda yapılan çalışmalar, nörotrofik faktörlerden özellikle beyin kökenli nörotrofik faktör (BDNF)'nin nöronal aktivite düzeyi ile yakından alakalı olarak sinaptik, yapısal, epigenetik ve davranışsal plastisite süreçlerinde kritik bir rol oynadığını ve bu nedenle de düzeylerinde meydana gelen değişikliklerin pek çok psikopatolojik bozukluğun temelinde rol oynayabileceğine işaret etmektedir (110-113). Özellikle stres maruziyetine bağlı olarak artan glukokortikoid düzeyleri, hücre içi sinyal iletim yollarını etkileyerek, BDNF ile düzenlenen sinaptik fonksiyonları baskılamaktadır (114). Glukokortikoid seviyelerindeki artış ve BDNF ifade edilimindeki düşüşe paralel olarak oluşan nöroplastisite kapasitesindeki yetersizlikler depresif hastalıkların patofizyolojisinde de bir etken olarak düşünülmektedir (115, 116).

c-Fos transkripsiyonu sonucu uyarılan ve depresyona yatkınlık düzeyini azaltan diğer bir koruyucu molekül *synaptophysin* olabilir. Bu sinaptik protein özellikle presinaptik terminallerdeki veziküllerde bulunmakta, nöronal iletimde ve sinaps oluşumunda aktif bir rol oynamaktadır (117). Nöronal aktivite düzeylerindeki değişikliklere bağlı olarak salınımı değiştiği için nöroplastisite belirteci olarak da kullanılmaktadır. Bizim daha önce serebellar nöronlar üzerinde yapmış olduğumuz çalışmalarda, prenatal stres maruziyetinin *synaptophysin* salınımını anlamlı düzeyde azalttığı gösterilmiştir (118). Stres maruziyeti aynı zamanda hippocampus'teki *synaptophysin* salınımında da düşüşe neden olmaktadır (119-121). Bu nedenle PFK'de stres maruziyeti sonrasında azalan sinaptik protein düzeyini kompanse etmek amacıyla erken gen ekspresyonunda değişikliklerin meydana gelmesi muhtemeldir.

Sinir büyüme faktörü (NGF=*nerve growth factor*), hasarlı sinir hücrelerinin tamirinde görev alan ve antiinflamatuvar etkili bir molekül olup, sinir sistemi gelişiminde, plastisitede ve çeşitli hastalıklarında patogenezinde önemli rol oynamaktadır. (112). Erkeklerde NGF salınımının dişilere oranla daha fazla olması,

depresyondan korunmada rol oynayabilir (122). Depresyona yatkınlık seviyelerinde cinsiyet hormonları da önemli rol oynamaktadır. Östrojen etkisi ile dişilerde daha koruyucu davranışlar gözlenmektedir (123). Oysa androjenik etki altındaki erkeklerde stres durumunda saldırganlık hareketlerinde artış gözlenmektedir. Epigenetik mekanizmalar, genetik kodu değiştirmeksizin, genlerin ekspresyon düzeyleri üzerinde değişikliklere neden olarak östrojen ve androjen düzeylerini değiştirebilmektedir (99, 124-126). Bu etkiler, DNA metilasyonu veya histonların asetilasyonu aracılığı ile gerçekleşmektedir (127).

Öte yandan, strese maruz kalan yavruların nöronların dendritik analizlerinde anksiyete düzeylerine paralel olarak önemli düzeyde morfolojik değişikliklerin meydana geldiği görülmüştür. Her iki cinsiyette de, YA ve DA'lı gruplardaki nöronlarda kontrol gruplarına göre çok daha az sayıda dikensi çıkıntı olduğu bulunmuştur. Literatürde PFK'deki piramidal nöronların dendritik morfolojilerinde meydana gelen değişiklikleri inceleyen çalışmalar incelendiğinde; farklı patolojik durumlarda nöronların dendritik dallanma paterninin daha az değişikliğe uğradığı, ancak dikensi çıkıntı yoğunluklarında daha erken ve daha belirgin farklılıkların ortaya çıktığı görülmektedir (128). Örneğin; 16 hafta süreyle arteriyel kan basıncını arttırmak suretiyle oluşturulan bir renovasküler hipertansiyon modelinde, PFK'deki nöronların dendritik uzunluklarında %32 oranında artış olduğu, dallanma sayısının arttığı ancak dikensi çıkıntı yoğunluğunun kontrol gruplarına oranla %50 azalma gösterdiği bulunmuştur (129). Parkinson hastalığı modeli oluşturulan sıçanlarda yapılan bir başka çalışmada da, PFK'deki piramidal nöronlarda dendritik uzunluk ve dallanma paterninde bir değişiklik meydana gelmeksizin, dendritik dikensi çıkıntı yoğunluklarında anlamlı düzeyde düşüş olduğu gösterilmiştir (130). Sütten kesildikten sonra 8 hafta süreyle izolasyon stresine maruz bırakılan sıçanlarda ise; hippocampus'un *Cornu Ammonis-1* (CA1) bölgesinde bulunan piramidal nöronların dendritik uzunluklarında anlamlı bir düşme görülmesine rağmen, PFK'deki piramidal nöronların Sholl analizlerinde anlamlı bir değişiklik saptanmadığı bildirilmiştir. Ancak dikensi çıkıntı yoğunlukları karşılaştırıldığında, sosyal izolasyona maruz bırakılan sıçanlarda hem PFK, hem de hippocampus'ta kontrol gruplarına göre anlamlı düzeyde azalma olduğu gösterilmiştir (131). Yine bir başka çalışmada, 2 ay süreyle kan şekeri düzeyini arttırmak suretiyle uygulanan bir deneysel diyabet

modelinde, 3 farklı bölgedeki kortikal nöronların dendritik morfolojilerinde meydana gelen değişiklikler karşılaştırılmıştır. Oksipital korteks, PFK ve hipokampus'teki piramidal nöronların Sholl analizlerinde, diyabetik hayvanlarda dendritik uzunlukların %20-%45 oranında; dikensi çıkıntı yoğunluğunun ise %36-%58 oranında azalma gösterdiği bulunmuştur. İncelenen kortikal bölgeler arasında en fazla etkilenen bölgenin hipokampus, en az değişiklik gözlenen bölgenin ise oksipital korteks olduğuna dikkat çekilmektedir (132).

Literatürde dendritik kompleksite düzeyini ve dikensi çıkıntı yoğunluklarını cinsiyete göre analiz eden çalışmalar daha sınırlı sayıdadır. Bizim çalışmamızda kontrol grubundaki yavrularda erkeklerdeki dikensi çıkıntı yoğunluğunun dişilere oranla daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Ancak anksiyete gruplarında cinsiyetler arasında anlamlı bir farklılığın olmadığı görülmüştür. Gebeliğin 15-20. günleri boyunca strese maruz bırakılan annelerden doğan yavruların PFK'lerinde yapılan Sholl analizlerinde, erkeklerde anterior cingulat ve orbitofrontal korteks'te bulunan piramidal nöronların apikal dendritik uzunluklarının %30 ve %26 düzeyinde azalma gösterirken dişilerde anlamlı bir dendritik atrofi gözlenmediği bildirilmiştir. Buna karşılık her iki cinsiyette de hem apikal hem de bazal dendritlerdeki dikensi çıkıntı yoğunluğunun yaklaşık olarak %20 oranında azaldığı gösterilmiştir (15). Gebeliğin 12-16. günleri arasında prenatal strese maruz bırakılan yavrularda yapılan bir başka çalışmada da PFK'nin iki farklı bölgesi olan medial PFK ile orbital PFK'de cinsiyete bağlı olarak birbirinin tam tersi sonuçlar elde edildiği gösterilmiştir. Dendritik morfoloji ve nöron sayılarına göre hesaplanan sinaptik konnektivite düzeyinde erkeklerde orbital PFK'de azalma, medial PFK'de artma olurken; dişilerde tam tersine orbital PFK'de artma, medial PFK'de ise azalma gözlenmiştir (133). Bu değişikliklerin erişkin yaşamdaki stres maruziyeti sonrasında görülen değişikliklere paralellik gösterdiğine de vurgu yapılmaktadır (134). Özetlemek gerekirse, PFK'deki nöronların dendritik morfolojilerinde yapılan çalışmalarda nöronların lokalize olduğu bölgeye ve cinsiyete göre farklı düzeyde etkilenmeler meydana gelebilmektedir.

Tez çalışmamızda, literatürdeki çalışmalardan farklı olarak, strese maruz kalan yavruların dendritik dikensi çıkıntılarının tipolojisinde meydana gelen değişiklikler de incelenmiş ve yavruların anksiyete düzeyleri ile ilişkili olarak belirgin farklılıkların olduğu saptanmıştır. Kontrol grubundaki nöronların

dendritlerindeki dikensi çıkıntılarının yarıya yakınının mantarimsı tipte olduğu ve anksiyete düzeyindeki artış sonucunda bu tipteki çıkıntılarının görülme yüzdesinin azaldığı bulunmuştur. Buna karşılık, anksiyete seviyesi yüksek olan yavrularda, ince tipteki dikensi çıkıntı oranının cinsiyet gözetmeksizin artış gösterdiği bulunmuştur. Dikensi çıkıntılarının baş kısmında lokalize olan postsinaptik kalınlaşma ve glutamat reseptörleri yoğunluğuna orantılı olarak daha stabil bir sinaps oluşumuna aracılık eden mantarimsı tipteki çıkıntılarının YA'lı gruplarda azalmış olması, sinaptik ileti ve plastiste kapasitesindeki azalmayla ilişkili olabilir (128, 135). Dikensi çıkıntılardaki genişleme ve büzüşmenin uzun süreli potansiyasyon (LTP) ve uzun süreli depresyon (LTD) süreçleri ile de ilişkili olduğu gösterilmiştir (136). Prenatal stres, PFK'deki piramidal nöron sayısı ve nöronlar üzerindeki dikensi çıkıntı yoğunluğunu azaltarak, LTP düzeyinde düşüşe yol açmaktadır (106). Bu nedenle çalışmamızda YA'lı gruplarda gözlenen ince tipteki dikensi çıkıntı artışı; kalsiyum iyon geçişindeki azalmaya bağlı olarak sinaptik iletimde ve postsinaptik hücre içi sinyal kaskadlarının aktivasyonunda azalmaya neden olarak LTP-LTD dengesinin de değişiminde rol oynayabilir. Son yıllarda yapılan araştırmalar, nöronların önceden inanılan aksine erişkin dönemde de oldukça fazla plastisite kapasitesine sahip olduğunu ve stres maruziyetinin nöroplastisite kapasitesi üzerinde olumsuz etkilere yol açtığını göstermektedir (137, 138). Bu nedenle, özellikle dendritlerdeki dikensi çıkıntı sayılarında ve yapılarında meydana gelen değişiklikler, dendritlerdeki dallanma sayısında ve yoğunluğundaki değişiklikler, sinapsların yeniden yapılandırılması ve nörotrofik faktör düzeylerindeki değişimler bu süreçte etkin olarak rol oynayan parametreler olarak önem kazanmaktadır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Sinir sistemi perinatal dönem esnasında son derece hızlı bir gelişim sürecinden geçtiği için olumlu ya da olumsuz uyaranlarından kolaylıkla etkilenebilmektedir. Erken dönemde kurulan iletişimlerin kalitesi nöronal bağlantıların ileri dönemlerdeki şekillenme aşamalarında da etkilidir. Bu nedenle prenatal dönemde yaşanan deneyimler bireylerin erişkin dönemlerindeki psikolojik özelliklerinin ve duyarlılıklarının gelişiminde çok önemli rol oynamaktadır.

2. Perinatal dönemde strese maruz kalan yavrularda oluşabilecek bozuklukların düzeyini insanlar üzerinde yapılan çalışmalarla araştırmak oldukça güçtür. Oysa deney hayvanları üzerinde yapılan araştırmalar, stres maruziyetinin süresi ve şiddetine müdahale etmek suretiyle yavrularda oluşabilecek bozuklukları sadece davranış düzeyinde değil, aynı zamanda fizyolojik ve anatomik düzeylerde de incelemeye imkân sağlamaktadır.

3. Prenatal ve postnatal dönemi kapsayacak şekilde erken yaşam stresine maruz kalan yavruların emosyonel göstergelerinde, bireysel yatkınlık düzeylerine bağlı olarak değişkenlik gösteren değişiklikler meydana gelmektedir.

4. Erken yaşam stresine maruz kalan dişi ve erkek sıçanların, tekrarlayan stres karşısında medial PFK'deki *c-Fos* (+) nöronların yoğunlukları ve toplam sayıları, kontrol gruplarına oranla anlamlı derecede artış göstermektedir.

5. Nöronal aktivasyonun bir belirteci olarak kullanılan toplam *c-Fos* (+) nöron sayısı ile anksiyete düzeyleri arasında yapılan korelasyon analizleri, güçlü bir pozitif ilişki olduğunu ortaya çıkarmıştır. Buna göre, hem erkek hem de dişilerde anksiyete düzeyi arttıkça PFK'deki aktivasyon gösteren nöron sayısı da artmaktadır.

6. Depresyona yatkınlık düzeyleri bakımından ise erkeklerde negatif bir korelasyon saptanırken, dişilerde anlamlı bir korelasyon gözlenmemiştir.

7. Erken yaşam stresine maruz kalan dişi ve erkek sıçanlarda, PFK'deki nöronların toplam dendrit uzunluklarının ve distal dendritlerindeki dal sayılarının kontrol gruplarına göre anlamlı derecede düşük olduğu gözlenmiştir.

8. Nöronlardaki dikensi çıkıntı yoğunlukları ve bu dikensi çıkıntıların morfolojik tiplerinde de stres maruziyeti sonrasında değişiklikler gözlenmiştir. Her iki cinsiyette de DA ve YA gruplarında dikensi çıkıntı yoğunluğunun kontrol gruplarına göre anlamlı düzeyde düşük olduğu bulunmuştur. Bu yavrularda anksiyete

düzeyleri ile bağlantılı olarak, mantarimsı tipteki dikensi çıkıntıların görülme olasılığı azalırken, ince tipteki dikensi çıkıntılarının görülme oranının arttığı tespit edilmiştir.

9. Bu sonuçlar, erken yaşam stresine maruz kalan yavruların PFK'deki nöronlarında cinsiyete ve anksiyete düzeyine bağlı olarak meydana gelen yapısal değişikliklerin, sinaptik plastisite kapasitelerini olumsuz yönde etkileyerek psikopatolojik bozuklukların gelişmesine zemin hazırlayabileceğine işaret etmektedir.

10. Bundan sonra yapılacak olan çalışmalarda anksiyete düzeyi yüksek olan deney hayvanlarında gözlenen *c-Fos* ekspresyonu artışının, özellikle erkeklerde hangi genleri aktiveştirerek depresyona yatkınlığı azalttığı araştırılması gerekmektedir. Dişi sıçanlarda anksiyete düzeyinde meydana gelen değişikliklerin depresyona yatkınlık seviyesinde anlamlı bir farklılığa yol açmamasının altında yatan molekül ve mekanizmaların da aydınlatılması gerekmektedir. Bu amaçla depresyona yatkınlıktan koruyucu olduğu kanıtlanan nöroprotektif moleküllerin PFK'deki ekspresyon düzeyleri erkeklerle karşılaştırmalı olarak incelenebilir.

11. İleri dönemde yapılacak çalışmalarda, erken yaşam stresine maruz kalan hayvanlarda gözlenen aşırı nöronal aktivasyon düzeyinin çevresel yetiştirme koşullarında meydana getirilen değişikliklerden etkilenip etkilenmediği araştırılabilir. Örneğin zenginleştirilmiş çevre koşullarının, farklı beslenme çeşitlerinin, egzersizin, ilaçların, anne veya kardeşler ile etkileşim düzeyindeki değişikliklerin ve artırılmış duyu uyaranlar gibi çeşitli etkenlerin nöronların dendritleri üzerinde meydana getirdiği değişiklikler yeni araştırmalara konu olabilir.

12. Prenatal dönem ile postnatal dönemdeki stres maruziyetinin kortikal nöronların dendritlerinde oluşturduğu etkileri karşılaştırmak amacıyla, deneyler gelişimin farklı dönemlerinde ve/veya farklı dozlarda uygulanarak, dikensi çıkıntı tiplerinde gözlediğimiz oranların ne şekilde değişiklik gösterdiği incelenmelidir.

KAYNAKLAR

1. Darnaudery M, Maccari S, Epigenetic programming of the stress response in male and female rats by prenatal restraint stress. *Brain research reviews*. 2008; 57(2): p. 571-85.
2. Rampon C, Enrichment induces structural changes and recovery from nonspatial memory deficits in CA1 NMDAR1-knockout mice. *Nature Neurosci*. 2000; 3: p. 238-44.
3. Ulupinar E, Effects of prenatal stress on developmental anatomy of the brain and adult behavioural pathology. *Anatomy*. 2009; 3(2009): p. 3-13.
4. Weinstock M, The long-term behavioural consequences of prenatal stress. *Neuroscience and biobehavioral reviews*. 2008; 32(6): p. 1073-86.
5. Kolb B, Mychasiuk R, Muhammad A, Li Y, Frost DO, Gibb R, Experience and the developing prefrontal cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012; 109 Suppl 2: p. 17186-93.
6. Usami Y, Matsuda K, Sugano M, Ishimine N, Kurihara Y, Sumida T, Yamauchi K, Tozuka M, Detection of chymase-digested C-terminally truncated apolipoprotein A-I in normal human serum. *Journal of immunological methods*. 2011; 369(1-2): p. 51-8.
7. Chudasama Y, Animal models of prefrontal-executive function. *Behavioral neuroscience*. 2011; 125(3): p. 327-43.
8. Wallace TL, Bertrand D, Importance of the nicotinic acetylcholine receptor system in the prefrontal cortex. *Biochemical pharmacology*. 2013; 85(12): p. 1713-20.
9. Wang YC, Ho UC, Ko MC, Liao CC, Lee LJ, Differential neuronal changes in medial prefrontal cortex, basolateral amygdala and nucleus accumbens

after postweaning social isolation. *Brain structure & function*. 2012; 217(2): p. 337-51.

10. Dwivedi Y, Rizavi HS, Conley RR, Roberts RC, Tamminga CA, Pandey GN, Altered gene expression of brain-derived neurotrophic factor and receptor tyrosine kinase B in postmortem brain of suicide subjects. *Archives of general psychiatry*. 2003; 60(8): p. 804-15.
11. Floresco SB, Zhang Y, Enomoto T, Neural circuits subserving behavioral flexibility and their relevance to schizophrenia. *Behavioural brain research*. 2009; 204(2): p. 396-409.
12. Morales M, Pickel VM, Insights to drug addiction derived from ultrastructural views of the mesocorticolimbic system. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2012; 1248: p. 71-88.
13. Tzschentke TM, The medial prefrontal cortex as a part of the brain reward system. *Amino acids*. 2000; 19(1): p. 211-9.
14. Hains AB, Arnsten AF, Molecular mechanisms of stress-induced prefrontal cortical impairment: implications for mental illness. *Learning & memory*. 2008; 15(8): p. 551-64.
15. Pakkenberg B, Gundersen HJ, Total number of neurons and glial cells in human brain nuclei estimated by the disector and the fractionator. *Journal of microscopy*. 1988; 150(Pt 1): p. 1-20.
16. Michelsen KA, van den Hove DL, Schmitz C, Segers O, Prickaerts J, Steinbusch HW, Prenatal stress and subsequent exposure to chronic mild stress influence dendritic spine density and morphology in the rat medial prefrontal cortex. *BMC neuroscience*. 2007; 8: p. 107.

17. Mychasiuk R, Gibb R, Kolb B, Prenatal bystander stress induces neuroanatomical changes in the prefrontal cortex and hippocampus of developing rat offspring. *Brain research*. 2011; 1412: p. 55-62.
18. Genc B, Ulupinar E, Erzurumlu RS, Differential Trk expression in explant and dissociated trigeminal ganglion cell cultures. *Journal of neurobiology*. 2005; 64(2): p. 145-56.
19. Hoffman GE, Lyo D, Anatomical markers of activity in neuroendocrine systems: are we all 'fos-ed out'? *Journal of neuroendocrinology*. 2002; 14(4): p. 259-68.
20. Adamec R, Toth M, Haller J, Halasz J, Blundell J, A comparison of activation patterns of cells in selected prefrontal cortical and amygdala areas of rats which are more or less anxious in response to predator exposure or submersion stress. *Physiology & behavior*. 2012; 105(3): p. 628-38.
21. Lee KF, Soares C, Beique JC, Examining form and function of dendritic spines. *Neural plasticity*. 2012; 2012: p. 704103.
22. Spruston N, Pyramidal neurons: dendritic structure and synaptic integration. *Nature reviews. Neuroscience*. 2008; 9(3): p. 206-21.
23. Koenig JI, Kirkpatrick B, Lee P, Glucocorticoid hormones and early brain development in schizophrenia. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*. 2002; 27(2): p. 309-18.
24. Kofman O, The role of prenatal stress in the etiology of developmental behavioural disorders. *Neuroscience and biobehavioral reviews*. 2002; 26(4): p. 457-70.

25. Weinstock M, Does prenatal stress impair coping and regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis? *Neuroscience and biobehavioral reviews*. 1997; 21(1): p. 1-10.
26. Weinstock M, Alterations induced by gestational stress in brain morphology and behaviour of the offspring. *Progress in neurobiology*. 2001; 65(5): p. 427-51.
27. Weinstock M, The potential influence of maternal stress hormones on development and mental health of the offspring. *Brain, behavior, and immunity*. 2005; 19(4): p. 296-308.
28. Waffarn F, Davis EP, Effects of antenatal corticosteroids on the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis of the fetus and newborn: experimental findings and clinical considerations. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2012; 207(6): p. 446-54.
29. Kvetnansky R, Pacak K, Fukuhara K, Viskupic E, Hiremagalur B, Nankova B, Goldstein DS, Sabban EL, Kopin IJ, Sympathoadrenal system in stress. Interaction with the hypothalamic-pituitary-adrenocortical system. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1995; 771: p. 131-58.
30. Florio P, Severi FM, Ciarmela P, Fiore G, Calonaci G, Merola A, De Felice C, Palumbo M, Petraglia F, Placental stress factors and maternal-fetal adaptive response: the corticotropin-releasing factor family. *Endocrine*. 2002; 19(1): p. 91-102.
31. Bowman ME, Lopata A, Jaffe RB, Golos TG, Wickings J, Smith R, Corticotropin-releasing hormone-binding protein in primates. *American journal of primatology*. 2001; 53(3): p. 123-30.
32. Maccari S, Morley-Fletcher S, Effects of prenatal restraint stress on the hypothalamus-pituitary-adrenal axis and related behavioural and

neurobiological alterations. *Psychoneuroendocrinology*. 2007; 32 Suppl 1: p. S10-5.

33. Buhl ES, Neschen S, Yonemitsu S, Rossbacher J, Zhang D, Morino K, Flyvbjerg A, Perret P, Samuel V, Kim J, Cline GW, Petersen KF, Increased hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity and hepatic insulin resistance in low-birth-weight rats. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*. 2007; 293(5): p. E1451-8.
34. Weinstock M, Poltyrev T, Schorer-Apelbaum D, Men D, McCarty R, Effect of prenatal stress on plasma corticosterone and catecholamines in response to footshock in rats. *Physiology & behavior*. 1998; 64(4): p. 439-44.
35. Caldji C, Francis D, Sharma S, Plotsky PM, Meaney MJ, The effects of early rearing environment on the development of GABAA and central benzodiazepine receptor levels and novelty-induced fearfulness in the rat. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*. 2000; 22(3): p. 219-29.
36. Dennis RL, Fahey AG, Cheng HW, Alterations to embryonic serotonin change aggression and fearfulness. *Aggressive behavior*. 2013; 39(2): p. 91-8.
37. Ansorge MS, Morelli E, Gingrich JA, Inhibition of serotonin but not norepinephrine transport during development produces delayed, persistent perturbations of emotional behaviors in mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2008; 28(1): p. 199-207.
38. Blazevic S, Colic L, Culig L, Hranilovic D, Anxiety-like behavior and cognitive flexibility in adult rats perinatally exposed to increased serotonin concentrations. *Behavioural brain research*. 2012; 230(1): p. 175-81.
39. Muneoka K, Mikuni M, Ogawa T, Kitera K, Kamei K, Takigawa M, Takahashi K, Prenatal dexamethasone exposure alters brain monoamine

metabolism and adrenocortical response in rat offspring. *The American journal of physiology*. 1997; 273(5 Pt 2): p. R1669-75.

40. Converse AK, Moore CF, Moirano JM, Ahlers EO, Larson JA, Engle JW, Barnhart TE, Murali D, Christian BT, Dejesus OT, Holden JE, Nickles RJ, Schneider ML, Prenatal Stress Induces Increased Striatal Dopamine Transporter Binding in Adult Nonhuman Primates. *Biological psychiatry*. 2013.
41. Deslauriers J, Larouche A, Sarret P, Grignon S, Combination of prenatal immune challenge and restraint stress affects prepulse inhibition and dopaminergic/GABAergic markers. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*. 2013; 45: p. 156-64.
42. Carboni E, Barros VG, Ibba M, Silvagni A, Mura C, Antonelli MC, Prenatal restraint stress: an in vivo microdialysis study on catecholamine release in the rat prefrontal cortex. *Neuroscience*. 2010; 168(1): p. 156-66.
43. Talge NM, Neal C, Glover V, Early Stress TR, Prevention Science Network F, Neonatal Experience on C, Adolescent Mental H, Antenatal maternal stress and long-term effects on child neurodevelopment: how and why? *Journal of child psychology and psychiatry, and allied disciplines*. 2007; 48(3-4): p. 245-61.
44. de Weerth C, Buitelaar JK, Physiological stress reactivity in human pregnancy--a review. *Neuroscience and biobehavioral reviews*. 2005; 29(2): p. 295-312.
45. O'Regan D, Kenyon CJ, Seckl JR, Holmes MC, Prenatal dexamethasone 'programmes' hypotension, but stress-induced hypertension in adult offspring. *The Journal of endocrinology*. 2008; 196(2): p. 343-52.

46. Slattery DA, Neumann ID, No stress please! Mechanisms of stress hyporesponsiveness of the maternal brain. *The Journal of physiology*. 2008; 586(2): p. 377-85.
47. Fumagalli F, Molteni R, Racagni G, Riva MA, Stress during development: Impact on neuroplasticity and relevance to psychopathology. *Progress in neurobiology*. 2007; 81(4): p. 197-217.
48. Ehler U, Gaab J, Heinrichs M, Psychoneuroendocrinological contributions to the etiology of depression, posttraumatic stress disorder, and stress-related bodily disorders: the role of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis. *Biological psychology*. 2001; 57(1-3): p. 141-52.
49. Barros VG, Rodriguez P, Martijena ID, Perez A, Molina VA, Antonelli MC, Prenatal stress and early adoption effects on benzodiazepine receptors and anxiogenic behavior in the adult rat brain. *Synapse*. 2006; 60(8): p. 609-18.
50. Charil A, Laplante DP, Vaillancourt C, King S, Prenatal stress and brain development. *Brain research reviews*. 2010; 65(1): p. 56-79.
51. Yeterian EH, Pandya DN, Prefrontostriatal connections in relation to cortical architectonic organization in rhesus monkeys. *The Journal of comparative neurology*. 1991; 312(1): p. 43-67.
52. Ray RD, Zald DH, Anatomical insights into the interaction of emotion and cognition in the prefrontal cortex. *Neuroscience and biobehavioral reviews*. 2012; 36(1): p. 479-501.
53. Ongur D, Ferry AT, Price JL, Architectonic subdivision of the human orbital and medial prefrontal cortex. *The Journal of comparative neurology*. 2003; 460(3): p. 425-49.

54. Petanjek Z, Judas M, Simic G, Rasin MR, Uylings HB, Rakic P, Kostovic I, Extraordinary neoteny of synaptic spines in the human prefrontal cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011; 108(32): p. 13281-6.
55. Tsujimoto S, The prefrontal cortex: functional neural development during early childhood. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry*. 2008; 14(4): p. 345-58.
56. Yeterian EH, Pandya DN, Tomaiuolo F, Petrides M, The cortical connectivity of the prefrontal cortex in the monkey brain. *Cortex; a journal devoted to the study of the nervous system and behavior*. 2012; 48(1): p. 58-81.
57. Uylings HB, Groenewegen HJ, Kolb B, Do rats have a prefrontal cortex? *Behavioural brain research*. 2003; 146(1-2): p. 3-17.
58. Miller EK, Cohen JD, An integrative theory of prefrontal cortex function. *Annual review of neuroscience*. 2001; 24: p. 167-202.
59. Hoover WB, Vertes RP, Anatomical analysis of afferent projections to the medial prefrontal cortex in the rat. *Brain structure & function*. 2007; 212(2): p. 149-79.
60. Thiebaut de Schotten M, Dell'Acqua F, Valabregue R, Catani M, Monkey to human comparative anatomy of the frontal lobe association tracts. *Cortex; a journal devoted to the study of the nervous system and behavior*. 2012; 48(1): p. 82-96.
61. Heidbreder CA, Groenewegen HJ, The medial prefrontal cortex in the rat: evidence for a dorso-ventral distinction based upon functional and anatomical characteristics. *Neuroscience and biobehavioral reviews*. 2003; 27(6): p. 555-79.

62. Petanjek Z, Judas M, Kostovic I, Uylings HB, Lifespan alterations of basal dendritic trees of pyramidal neurons in the human prefrontal cortex: a layer-specific pattern. *Cerebral cortex*. 2008; 18(4): p. 915-29.
63. Del Arco A, Segovia G, Garrido P, de Blas M, Mora F, Stress, prefrontal cortex and environmental enrichment: studies on dopamine and acetylcholine release and working memory performance in rats. *Behavioural brain research*. 2007; 176(2): p. 267-73.
64. Laplante F, Stevenson CW, Gratton A, Srivastava LK, Quirion R, Effects of neonatal ventral hippocampal lesion in rats on stress-induced acetylcholine release in the prefrontal cortex. *Journal of neurochemistry*. 2004; 91(6): p. 1473-82.
65. Donkelaar HJT, Lammens M, Hori A, *Clinical Neuro-embryology, Development and Developmental Disorders of the Human Central Nervous System*, R. Lange, Editor. 2006, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Aalmany. p. 447-51.
66. Engert F, Bonhoeffer T, Dendritic spine changes associated with hippocampal long-term synaptic plasticity. *Nature*. 1999; 399: p. 66-70.
67. Kolb B, Gibb R, Tactile stimulation after frontal or parietal cortical injury in infant rats facilitates functional recovery and produces synaptic changes in adjacent cortex. *Behavioural brain research*. 2010; 214(1): p. 115-20.
68. Richards S, Mychasiuk R, Kolb B, Gibb R, Tactile stimulation during development alters behaviour and neuroanatomical organization of normal rats. *Behavioural brain research*. 2012; 231(1): p. 86-91.
69. Kolb B, Gibb R, Gorny G, Experience-dependent changes in dendritic arbor and spine density in neocortex vary qualitatively with age and sex. *Neurobiology of learning and memory*. 2003; 79(1): p. 1-10.

70. Anda RF, Felitti VJ, Bremner JD, Walker JD, Whitfield C, Perry BD, Dube SR, Giles WH, The enduring effects of abuse and related adverse experiences in childhood. A convergence of evidence from neurobiology and epidemiology. *European archives of psychiatry and clinical neuroscience*. 2006; 256(3): p. 174-86.
71. Comeau WL, McDonald RJ, Kolb BE, Learning-induced alterations in prefrontal cortical dendritic morphology. *Behavioural brain research*. 2010; 214(1): p. 91-101.
72. Kolb B, Gorny G, Soderpalm AH, Robinson TE, Environmental complexity has different effects on the structure of neurons in the prefrontal cortex versus the parietal cortex or nucleus accumbens. *Synapse*. 2003; 48(3): p. 149-53.
73. Helmeke C, Seidel K, Poeggel G, Bredy TW, Abraham A, Braun K, Paternal deprivation during infancy results in dendrite- and time-specific changes of dendritic development and spine formation in the orbitofrontal cortex of the biparental rodent *Octodon degus*. *Neuroscience*. 2009; 163(3): p. 790-8.
74. Fisch TM, Prywes R, Roeder RG, c-fos sequence necessary for basal expression and induction by epidermal growth factor, 12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate and the calcium ionophore. *Molecular and cellular biology*. 1987; 7(10): p. 3490-502.
75. Susini S, Roche E, Prentki M, Schlegel W, Glucose and glucagon-like peptide-1 synergize to induce c-fos, c-jun, junB, zif-268, and nur-77 gene expression in pancreatic beta(INS-1) cells. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 1998; 12(12): p. 1173-82.
76. Foletta VC, Transcription factor AP-1, and the role of Fra-2. *Immunology and cell biology*. 1996; 74(2): p. 121-33.

77. Kool J, Hamdi M, Cornelissen-Steijger P, van der Eb AJ, Terleth C, van Dam H, Induction of ATF3 by ionizing radiation is mediated via a signaling pathway that includes ATM, Nibrin1, stress-induced MAPkinases and ATF-2. *Oncogene*. 2003; 22(27): p. 4235-42.
78. Chan RK, Brown ER, Ericsson A, Kovacs KJ, Sawchenko PE, A comparison of two immediate-early genes, c-fos and NGFI-B, as markers for functional activation in stress-related neuroendocrine circuitry. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1993; 13(12): p. 5126-38.
79. Dorph-Petersen KA, Nyengaard JR, Gundersen HJ, Tissue shrinkage and unbiased stereological estimation of particle number and size. *Journal of microscopy*. 2001; 204(Pt 3): p. 232-46.
80. King MA, Scotty N, Klein RL, Meyer EM, Particle detection, number estimation, and feature measurement in gene transfer studies: optical fractionator stereology integrated with digital image processing and analysis. *Methods (San Diego, Calif.)*. 2002; 28(2): p. 293-9.
81. Mayhew TM, Gundersen HJ, If you assume, you can make an ass out of u and me': a decade of the disector for stereological counting of particles in 3D space. *Journal of anatomy*. 1996; 188 (Pt 1): p. 1-15.
82. Canan S, Bahadır A, Yildirim S, Odaci E, Sahin B, Bas O, Colakoglu S, Bilgic S, Kaplan S, Stereolojik Uygulamalarda Kullanılan Pratik Gereçler ve Bilgisayar Destekli Stereolojik Analiz Cihazları. *Türkiye Klinikleri J Med Sci*. 2004; 6(24): p. 672-80.
83. Canan S, Sahin B, Ünal B, Aslan H, Bilgic S, Kaplan S, Parçacıkların toplam sayısının hesaplanması için bir metot: Parçalama. *Türkiye Klinikleri J Med Sci*. 2002; 1(22): p. 30-46.

84. Vetter P, Roth A, Hausser M, Propagation of action potentials in dendrites depends on dendritic morphology. *Journal of neurophysiology*. 2001; 85(2): p. 926-37.
85. Harris KM, Jensen FE, Tsao B, Three-dimensional structure of dendritic spines and synapses in rat hippocampus (CA1) at postnatal day 15 and adult ages: implications for the maturation of synaptic physiology and long-term potentiation. *J. Neurosci*. 1992; 12: p. 2685-705.
86. Polsky A, Mel BW, Schiller J, Computational subunits in thin dendrites of pyramidal cells. *Nature neuroscience*. 2004; 7(6): p. 621-7.
87. Sabatini BL, Maravall M, Svoboda K, Ca^{2+} signaling in dendritic spines. *Current opinion in neurobiology*. 2001; 11(3): p. 349-56.
88. Rodriguez A, Ehlenberger DB, Dickstein DL, Hof PR, Wearne SL, Automated three-dimensional detection and shape classification of dendritic spines from fluorescence microscopy images. *PloS one*. 2008; 3(4): p. e1997.
89. Bourne JN, Harris KM, Balancing structure and function at hippocampal dendritic spines. *Annual review of neuroscience*. 2008; 31: p. 47-67.
90. Conn PJ, Pin JP, Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annual review of pharmacology and toxicology*. 1997; 37: p. 205-37.
91. Takumi Y, Matsubara A, Rinvik E, Ottersen OP, The arrangement of glutamate receptors in excitatory synapses. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1999; 868: p. 474-82.
92. Noguchi J, Matsuzaki M, Ellis-Davies GC, Kasai H, Spine-neck geometry determines NMDA receptor-dependent Ca^{2+} signaling in dendrites. *Neuron*. 2005; 46(4): p. 609-22.

93. Lee YA, Goto Y, Chronic stress modulation of prefrontal cortical NMDA receptor expression disrupts limbic structure-prefrontal cortex interaction. *The European journal of neuroscience*. 2011; 34(3): p. 426-36.
94. Moghaddam B, Bolinao ML, Stein-Behrens B, Sapolsky R, Glucocorticoids mediate the stress-induced extracellular accumulation of glutamate. *Brain research*. 1994; 655(1-2): p. 251-4.
95. Paxinos G, *The rat brain in stereotaxic coordinates* / George Paxinos, Charles Watson, ed. C. Watson. 2007, Amsterdam:: Elsevier.
96. Wilson CA, Vazdarjanova A, Terry AV, Jr., Exposure to variable prenatal stress in rats: effects on anxiety-related behaviors, innate and contextual fear, and fear extinction. *Behavioural brain research*. 2013; 238: p. 279-88.
97. Lynch JJ, 3rd, Castagne V, Moser PC, Mittelstadt SW, Comparison of methods for the assessment of locomotor activity in rodent safety pharmacology studies. *Journal of pharmacological and toxicological methods*. 2011; 64(1): p. 74-80.
98. Emack J, Matthews SG, Effects of chronic maternal stress on hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) function and behavior: no reversal by environmental enrichment. *Hormones and behavior*. 2011; 60(5): p. 589-98.
99. Billack B, Serio R, Silva I, Kinsley CH, Epigenetic changes brought about by perinatal stressors: a brief review of the literature. *Journal of pharmacological and toxicological methods*. 2012; 66(3): p. 221-31.
100. Branchi I, D'Andrea I, Sietzema J, Fiore M, Di Fausto V, Aloe L, Alleva E, Early social enrichment augments adult hippocampal BDNF levels and survival of BrdU-positive cells while increasing anxiety- and "depression"-like behavior. *Journal of neuroscience research*. 2006; 83(6): p. 965-73.

101. Bell JA, Livesey PJ, Meyer JF, Environmental enrichment influences survival rate and enhances exploration and learning but produces variable responses to the radial maze in old rats. *Developmental psychobiology*. 2009; 51(7): p. 564-78.
102. Brenes JC, Rodriguez O, Fornaguera J, Differential effect of environment enrichment and social isolation on depressive-like behavior, spontaneous activity and serotonin and norepinephrine concentration in prefrontal cortex and ventral striatum. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*. 2008; 89(1): p. 85-93.
103. Schmitz C, Hof PR, Design-based stereology in neuroscience. *Neuroscience*. 2005; 130(4): p. 813-31.
104. Roche E, Buteau J, Aniento I, Reig JA, Soria B, Prentki M, Palmitate and oleate induce the immediate-early response genes c-fos and nur-77 in the pancreatic beta-cell line INS-1. *Diabetes*. 1999; 48(10): p. 2007-14.
105. Schofl C, Waring M, Bergwitz C, Arseniev L, von zur Muhlen A, Brabant G, Cyclic-adenosine 3',5'-monophosphate-stimulated c-fos gene transcription involves distinct calcium pathways in single beta-cells. *Molecular and cellular endocrinology*. 2002; 186(1): p. 121-31.
106. Zhu YS, Brodsky M, Franklin SO, Huang T, Inturrisi CE, Metrazole induces the sequential activation of c-fos, proenkephalin, and tyrosine hydroxylase gene expression in the rat adrenal gland: modulation by glucocorticoid and adrenocorticotrophic hormone. *Molecular pharmacology*. 1993; 44(2): p. 328-35.
107. Siegan JB, Herzberg U, Frydel BR, Sagen J, Adrenal medullary transplants reduce formalin-evoked c-fos expression in the rat spinal cord. *Brain research*. 2002; 944(1-2): p. 174-83.

108. Zheng H, Li YF, Weiss M, Mayhan WG, Patel KP, Neuronal expression of fos protein in the forebrain of diabetic rats. *Brain research*. 2002; 956(2): p. 268-75.
109. Schecterson LC, Bothwell M, Neurotrophin receptors: Old friends with new partners. *Developmental neurobiology*. 2010; 70(5): p. 332-8.
110. Cowansage KK, LeDoux JE, Monfils MH, Brain-derived neurotrophic factor: a dynamic gatekeeper of neural plasticity. *Current molecular pharmacology*. 2010; 3(1): p. 12-29.
111. Castren E, Rantamaki T, The role of BDNF and its receptors in depression and antidepressant drug action: Reactivation of developmental plasticity. *Developmental neurobiology*. 2010; 70(5): p. 289-97.
112. Nikolaou KE, Malamitsi-Puchner A, Boutsikou T, Economou E, Boutsikou M, Puchner KP, Baka S, Hassiakos D, The varying patterns of neurotrophin changes in the perinatal period. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2006; 1092: p. 426-33.
113. Gourley SL, Kedves AT, Olausson P, Taylor JR, A history of corticosterone exposure regulates fear extinction and cortical NR2B, GluR2/3, and BDNF. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*. 2009; 34(3): p. 707-16.
114. Kawashima H, Numakawa T, Kumamaru E, Adachi N, Mizuno H, Ninomiya M, Kunugi H, Hashido K, Glucocorticoid attenuates brain-derived neurotrophic factor-dependent upregulation of glutamate receptors via the suppression of microRNA-132 expression. *Neuroscience*. 2010; 165(4): p. 1301-11.

115. McEwen BS, Central effects of stress hormones in health and disease: Understanding the protective and damaging effects of stress and stress mediators. *European journal of pharmacology*. 2008; 583(2-3): p. 174-85.
116. Chen YC, Tan QR, Dang W, Wang HN, Zhang RB, Li ZY, Lin H, Liu R, The effect of citalopram on chronic stress-induced depressive-like behavior in rats through GSK3 β /beta-catenin activation in the medial prefrontal cortex. *Brain research bulletin*. 2012; 88(4): p. 338-44.
117. Mayanil CS, Knepper PA, Synaptic vesicle and synaptic membrane glycoproteins during pre- and postnatal development of mouse cerebral cortex, cerebellum and spinal cord. *Developmental neuroscience*. 1993; 15(2): p. 133-45.
118. Ulupinar E, Yucel F, Prenatal stress reduces interneuronal connectivity in the rat cerebellar granular layer. *Neurotoxicology and teratology*. 2005; 27(3): p. 475-84.
119. Xu J, Yang B, Yan C, Hu H, Cai S, Liu J, Wu M, Ouyang F, Shen X, Effects of duration and timing of prenatal stress on hippocampal myelination and synaptophysin expression. *Brain research*. 2013; 1527: p. 57-66.
120. Marrocco J, Mairesse J, Ngomba RT, Silletti V, Van Camp G, Bouwalerh H, Summa M, Pittaluga A, Nicoletti F, Maccari S, Morley-Fletcher S, Anxiety-like behavior of prenatally stressed rats is associated with a selective reduction of glutamate release in the ventral hippocampus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2012; 32(48): p. 17143-54.
121. Afadl S, Polaboon N, Surakul P, Govitrapong P, Jutapakdeegul N, Prenatal stress alters presynaptic marker proteins in the hippocampus of rat pups. *Neuroscience letters*. 2010; 470(1): p. 24-7.

122. Aloe L, Alleva E, Fiore M, Stress and nerve growth factor: findings in animal models and humans. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*. 2002; 73(1): p. 159-66.
123. Glover V, Hill J, Sex differences in the programming effects of prenatal stress on psychopathology and stress responses: an evolutionary perspective. *Physiology & behavior*. 2012; 106(5): p. 736-40.
124. Walf AA, Frye CA, Estradiol decreases anxiety behavior and enhances inhibitory avoidance and gestational stress produces opposite effects. *Stress*. 2007; 10(3): p. 251-60.
125. Kaiser S, Sachser N, The effects of prenatal social stress on behaviour: mechanisms and function. *Neuroscience and biobehavioral reviews*. 2005; 29(2): p. 283-94.
126. Biala YN, Bogoch Y, Bejar C, Linial M, Weinstock M, Prenatal stress diminishes gender differences in behavior and in expression of hippocampal synaptic genes and proteins in rats. *Hippocampus*. 2011; 21(10): p. 1114-25.
127. Gudsnuik K, Champagne FA, Epigenetic influence of stress and the social environment. *ILAR journal / National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources*. 2012; 53(3-4): p. 279-88.
128. Okamura M, Matsumoto W, Seike F, Tanaka Y, Teratani C, Tozuka M, Kashimoto T, Takehara K, Nakamura M, Yoshikawa Y, Efficacy of soluble recombinant FliC protein from *Salmonella enterica* serovar enteritidis as a potential vaccine candidate against homologous challenge in chickens. *Avian diseases*. 2012; 56(2): p. 354-8.
129. Vega E, Gomez-Villalobos Mde J, Flores G, Alteration in dendritic morphology of pyramidal neurons from the prefrontal cortex of rats with renovascular hypertension. *Brain research*. 2004; 1021(1): p. 112-8.

130. Solis O, Limon DI, Flores-Hernandez J, Flores G, Alterations in dendritic morphology of the prefrontal cortical and striatum neurons in the unilateral 6-OHDA-rat model of Parkinson's disease. *Synapse*. 2007; 61(6): p. 450-8.
131. Silva-Gomez AB, Rojas D, Juarez I, Flores G, Decreased dendritic spine density on prefrontal cortical and hippocampal pyramidal neurons in postweaning social isolation rats. *Brain research*. 2003; 983(1-2): p. 128-36.
132. Martinez-Tellez R, Gomez-Villalobos Mde J, Flores G, Alteration in dendritic morphology of cortical neurons in rats with diabetes mellitus induced by streptozotocin. *Brain research*. 2005; 1048(1-2): p. 108-15.
133. Mychasiuk R, Zahir S, Schmold N, Ilnytskyy S, Kovalchuk O, Gibb R, Parental enrichment and offspring development: modifications to brain, behavior and the epigenome. *Behavioural brain research*. 2012; 228(2): p. 294-8.
134. Radley JJ, Rocher AB, Miller M, Janssen WG, Liston C, Hof PR, McEwen BS, Morrison JH, Repeated stress induces dendritic spine loss in the rat medial prefrontal cortex. *Cerebral cortex*. 2006; 16(3): p. 313-20.
135. Matsuzaki M, Factors critical for the plasticity of dendritic spines and memory storage. *Neuroscience research*. 2007; 57(1): p. 1-9.
136. Bosch M, Hayashi Y, Structural plasticity of dendritic spines. *Current opinion in neurobiology*. 2012; 22(3): p. 383-8.
137. Tavosanis G, Dendritic structural plasticity. *Developmental neurobiology*. 2012; 72(1): p. 73-86.
138. Markham JA, Mullins SE, Koenig JI, Periadolescent maturation of the prefrontal cortex is sex-specific and is disrupted by prenatal stress. *The Journal of comparative neurology*. 2013; 521(8): p. 1828-43.

