

2024

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İhsan Kıvanç GÜRSOY



T.C.

ANKARA YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MATERNAL STRESE MARUZ KALMIŞ FARELERİN HİPOKAMPUS
DOKULARINDA APOPTOZ ile İLİŞKİLİ GENLERİN mRNA
DÜZEYLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İhsan Kıvanç GÜRSOY

TIBBİ GENETİK PROGRAMI

Ankara, 2024

T.C.

ANKARA YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MATERNAL STRESE MARUZ KALMIŞ FARELERİN HİPOKAMPUS
DOKULARINDA APOPTOZ İLE İLİŞKİLİ GENLERİN mRNA
DÜZEYLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İhsan Kıvanç GÜRSOY

Dr.Öğr.Üyesi Keziban KORKMAZ BAYRAM

TIBBİ GENETİK PROGRAMI

**Bu araştırma; Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Bilimsel Araştırma
Projeleri Birimi tarafından TYL-2023-2484 nolu proje ile desteklenmiştir.**

Ankara, 2024

Bu tezi hayatımın anlamı, biricik kızım Beliz'e ithaf ediyorum...

TEŞEKKÜR

En başta, deney ve tez yazım sürecinde bana her zaman destek ve güven veren, bilgisi ve deneyimlerini olabilecek en pozitif şekilde aktaran, vaktini ve ilgisini esirgemeyerek her koşulda yanımda olduğunu hissettiren, manevi desteğiyle zoru başarmamı sağlayan çok sevdiğim, saygı değer danışmanım sayın hocam Dr. Öğr. Üyesi Keziban KORKMAZ BAYRAM'a teşekkür gönül borcumdur.

Yüksek Lisans sürecime başlamamda ve bu aşamaya kadar gelmemde bana verdiği büyük manevi destekle, her zaman yanımda olduğunu bildiğim eşim Zeynep Tuğçe GÖK GÜRSOY'a; hayatım boyunca desteğini hep hissettiğim, her zaman maddi ve manevi açıdan yanımda olduğunu bildiğim, büyük fedakarlıklarla bu konuma gelmemde pay sahibi olan sevgili annem Prof. Dr. Gül GÜRSOY'a teşekkürlerimi sunmak isterim.

Özellikle tez yazım sürecimde istatistiksel ve mental açıdan yardım sağlayan Dr. Arslan BAYRAM'a; Korkmaz Bayram laboratuvarı üyeleri Aida Nurul BAROKAH ve Merve Hilal DÖNMEZ'e deneylerimin yapılmasındaki yardımları, sınırsız sabırları ve sonsuz destekleri için; verdikleri destekle tez sürecimin sonuna gelmemde yardımları bulunan özellikle Prof. Dr. Fatma Ajlan Tükün ve İsmigün Akın olmak üzere Düzen Laboratuvarı Genetik Hastalıklar Değerlendirme Merkezi çalışanlarına teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	iii
ABSTRACT	v
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
TABLolar DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Stres	4
2.1.1. Stres Türleri	4
2.1.2. Erken Yaşam Stresi	7
2.1.3. Anne Stresi.....	8
2.2. Hipokampus.....	9
2.3. Hücre Ölümü	11
2.3.1. Hücre Ölümünün Sınıflandırması.....	12
2.3.2. Programlı Hücre Ölümü: Apoptozis	14
2.3.3. Apoptozis Mekanizmaları.....	15
2.4. Gen Ekspresyonu ve Apoptoz ile İlgili Genler.....	18
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	24
3.1. Veri Toplama Araçları	24
3.1.1. Cihaz ve Aletler	24
3.1.2. Malzeme ve Reaktifler.....	25
3.2. Yöntem	26
3.2.1. Fareler ve Yaşam Koşulları.....	26
3.2.2. Maternal Stres Deneyi	26
3.2.3. Kilo Takibi	30
3.2.4. Farelerden Örneklerin Elde Edilmesi	31
3.2.5. Total RNA İzolasyonu	32
3.2.6. Nükleik Asit Miktar ve Kalite Ölçümü.....	33
3.2.7. cDNA Sentezi	34
3.2.8. qRT-PCR Tekniği ile mRNA Ekspresyonu.....	35
3.2.9. Agaroz Jel Elektroforezi	39
3.2.10. Veri Değerlendirmesi	40
3.2.11. İstatistiksel Analizler	40
4. BULGULAR.....	41
4.1. Farelerdeki Fenotipik Bulgular	41
4.2. Kilo Takibi Bulguları	42
4.2.1. Dişi Farelerin Kilo Takibi Bulguları.....	43
4.2.2. Erkek Farelerin Kilo Takibi Bulguları.....	49
4.3. mRNA Ekspresyon Analizi Bulguları.....	55
4.4. Ekspresyon Korelasyon Bulguları.....	62
5. TARTIŞMA	67
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	79
7. KAYNAKLAR.....	81
8. EKLER.....	99
Ek-1. Etik kurul belgesi	99

Ek-2. Tez intihal raporu	101
Ek-3. Öz Geçmiş	102



ÖZET

Maternal Strese Maruz Kalmış Farelerin Hipokampus Dokularında Apoptoz İle İlişkili Genlerin mRNA Düzeylerinin Araştırılması

Erken yaşam stresi, özellikle anne ayrılığı gibi durumlar, antisosyal davranışlar ve kişilik bozuklukları da dahil olmak üzere yaşam boyu süren psikopatolojik durumların gelişiminde rol oynamaktadır. Kemirgen modellerinde, erken anne ayrılığı nöronal apoptoz ve hipokampal fonksiyon bozukluğu ile ilişkilendirilmiş, bu durum öğrenme ve hafızada eksikliklere, depresyon benzeri davranışlara ve anksiyete benzeri reaksiyonlara yol açmıştır.

Bu çalışmada, erken yaşam stresinin, öngörülme- yen anne ayrılığı (MS) ve öngörülme- yen anne ayrılığı ile birlikte öngörülme- yen anne stresinin (MSUS), *BALB/c* farelerin hipokampal dokularında pro-apoptotik genler *Bax*, *Tp53* ve *Casp3* ile pro-survival gen *Bcl2*'nin mRNA ekspresyonu üzerindeki etkilerini araştırılmıştır. Çalışma üç gruptan oluşmaktadır: Kontrol grubu (n=24), MS grubu (n=24) ve MSUS grubu (n=24).

Total RNA, doğum sonrası 35. günde (PND35) farelerin hipokampal dokularından fenol-kloroform ekstraksiyon yöntemi kullanılarak elde edilmiş ve *Bax*, *Bcl2*, *Tp53* ve *Casp3* genlerinin mRNA ekspresyon seviyeleri gerçek zamanlı PZR kullanılarak ölçülmüştür. PZR verileri, delta delta Ct yöntemiyle analiz edilmiştir. İstatistiksel analizler, GraphPad Prism yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kontrol, MS ve MSUS grupları arasında mRNA ifadesinde önemli farklılıklar tespit edilmiştir. *Bax* mRNA ifadesinin MS grubunda kontrole kıyasla anlamlı ölçüde azaldığı ($p = 0,0464$), hem MS hem de MSUS gruplarında *Bcl2* mRNA ifadesinin kontrol grubuna kıyasla anlamlı şekilde arttığı (sırasıyla $p = 0,0005$, $p = 0,0057$) saptanmıştır. *Tp53* mRNA ifadesinin ise MSUS grubunda kontrole kıyasla anlamlı ölçüde arttığı saptanmıştır ($p = 0,0413$). Gruplar arasında *Casp3* mRNA ifade düzeylerinde anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir.

İki yönlü tekrarlanan ölçümler ANOVA kullanılarak yapılan vücut ağırlığı analizi, MS ve MSUS gruplarındaki yavruların kontrol grubuna kıyasla anlamlı ölçüde

daha düşük vücut ağırlığına sahip olduğu, ayrıca MSUS grubunun MS grubuna kıyasla anlamlı ölçüde daha düşük vücut ağırlığına sahip olduğu gözlemlenmiştir.

Pro-apoptotik gen *Bax*, *Tp53* ve pro-survival gen *Bcl2*'nin mRNA ekspresyon seviyelerindeki önemli değişiklikler ve *Casp3* ekspresyonundaki istikrar, erken yaşam stresine yanıt olarak hipokampusta apoptozun gerçekleşmediğini, ancak hücre hayatta kalımının sağlandığını göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Anne stresi, apoptoz, erken yaşam stresi, hipokampus, hücre sağkalımı, mRNA ekspresyonu.



ABSTRACT

Investigation of mRNA Levels of Genes Associated with Apoptosis in the Hippocampal Tissues of Maternally Stressed Mice

Early life stress, particularly maternal separation (MS), contributes to lifelong psychopathological conditions, including antisocial behaviors and personality disorders. In rodent models, early maternal separation has been associated with neuronal apoptosis and impaired hippocampal function, resulting in learning and memory deficits, depression-like behaviors, and alterations in anxiety-like behaviors.

This study investigated the effects of early life stress, specifically unpredictable maternal separation (MS) and unpredictable maternal separation combined with unpredictable maternal stress (MSUS), on the mRNA expression levels of the pro-apoptotic genes *Bax*, *Tp53* and *Casp3*, and the pro-survival gene *Bcl2* in the hippocampus of *BALB/c* mice. Three groups were studied: a control group (n=24), a group exposed to MS (n=24), and a group exposed to MSUS (n=24).

Total RNA was extracted from hippocampal tissues of mice on postnatal day 35 (PND35) using the phenol chloroform extraction method. Real-time PCR quantified mRNA levels of *Bax*, *Bcl2*, *Tp53*, and *Casp3* genes. The qPCR data was analyzed using the delta delta Ct method, and statistical analyses were performed with GraphPad Prism software. *Bax* mRNA expression decreased significantly in the MS group compared to the control ($p = 0.0464$), while both MS and MSUS groups showed significant increases in *Bcl2* mRNA expression compared to the control ($p = 0.0005$, $p = 0.0057$, respectively). *Tp53* mRNA expression increased significantly in the MSUS group compared to the control ($p = 0.0413$). No significant differences were observed in *Casp3* mRNA expression levels between the groups.

Body weight analysis using two-way repeated measures ANOVA revealed that the offspring in the MS and MSUS groups had significantly lower body weights compared to the control group. Within the stressed groups, the MSUS group exhibited significantly lower body weights than the MS group.

Significant changes in mRNA expression levels of pro-apoptotic genes *Bax* and *Tp53*, and the pro-survival gene *Bcl2*, along with the stable expression of *Casp3*, suggest that apoptosis was prevented in the hippocampus in response to early life stress, ensuring cell survival.

Keywords: Apoptosis, cell survival, early life stress, hippocampus, maternal stress, mRNA expression.



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

%	: Yüzde
°C	: Santigrat derece
mL	: Mikrolitre
Δ	: Delta
<	: Küçüktür
>	: Büyüktür
ACTH	: <i>Adrenocorticotropic Hormone</i>
ANOVA	: <i>Analysis of variance</i>
<i>Bax</i>	: <i>Bcl-2-associated X protein</i>
<i>Bcl2</i>	: <i>B-cell lymphoma 2</i>
<i>bç</i>	: Baz çifti
CA	: <i>Cornu ammonis</i>
<i>Casp3</i>	: <i>Caspase-3</i>
cDNA	: Tamamlayıcı DNA
CNS	: <i>Central nervous system</i> (Merkezi sinir sistemi)
CRH	: <i>Corticotropin-releasing hormone</i>
Ct	: <i>Cycle threshold</i>
DEHB	: Dikkat eksikliği hiperaktivite bozukluğu
DNA	: Deoksiribonukleik asit
ELS	: <i>Early Life Stress</i> (Erken Yaşam Stresi)
FST	: <i>Forced swim test</i> (Zorunlu yüzme testi)
g	: Gram
<i>Gapdh</i>	: <i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
GC	: Glukokortikoid
HPA	: <i>Hypothalamo-pituitary-adrenocortical</i> (Hipotalamus-hipofiz bezi-adrenal bezi)
IEG	: <i>Immediate Early Gene</i>
IS	: <i>Immobilization stress</i> (Kısıtlama stresi)
mL	: Mililitre

mRNA	: Mesajcı ribonukleik asit
MS	: <i>Maternal separation/Unpredictable maternal separation</i> (Öngörülmeven anne ayrılığı)
MSEW	: Erken Sütten Kesmeyle Birlikte Anne Ayrılığı
MSUS	: <i>Maternal separation/Unpredictable maternal separation combined with unpredictable maternal stress</i> (Anne ayrılığa ek olarak öngörülmeven anne stresi)
NFW	: <i>Nuclease-free water</i> (Nükleaz içermeyen su)
OSB	: Otizm spektrum bozukluğu
PND	: <i>Postnatal Day</i> (Doğum sonrası gün)
PVN	: Paraventriküler nukleus
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
qPZR	: Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	: Ribonukleik asit
RT	: <i>Reverse transcriptase</i>
TBE	: Tris-Borate-EDTA
<i>Tp53</i>	: <i>Tumor protein p53</i>
TSSB	: Travma Sonrası Stres Bozukluğu

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1	Fizyolojik ve Psikolojik Stres Tepkileriyle İlgili Devreler.....	5
Şekil 2.2	Hipokampal Koronal Kesit [57].....	10
Şekil 2.3	Fare Hipokampusu (Gunnarsdóttir vd., 2022).....	10
Şekil 2.4	Hücre Ölümünün Sınıflandırılması.....	13
Şekil 2.5	Hücre Ölüm Şekilleri.....	14
Şekil 2.6	Apoptozis Evreleri.....	15
Şekil 2.7	Apoptoz Mekanizmaları.....	16
Şekil 2.8	Bax, Bcl2, Tp53 ve Casp3 Arasındaki Bağlantıyı Yansıtan STRING Çıktısı.....	19
Şekil 2.9	Çalışma Akışı.....	22
Şekil 3.1	Çalışmadaki Grupların Şematik Olarak Gösterimi.....	27
Şekil 3.2	Zorunlu Yüzme Testi (A,B).....	29
Şekil 3.3	Fiziksel Kısıtlama Stresi (A,B).....	30
Şekil 3.4	Jel Görüntüsü.....	39
Şekil 3.5	Delta Delta Ct ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) Yöntemi.....	40
Şekil 4.1	A) Kontrol grubu B) Stres grubu.....	41
Şekil 4.2	Günlere Göre Dişi Yavruların (N = 36) Gruplar Arasındaki Ağırlık Karşılaştırması; Koyu Pembe Kontrol Dişi Fareler, Orta Pembe MS Dişi Fareler ve Açık Pembe MSUS Dişi Fareleri Göstermektedir; Anlamlılık Sembolleri, Kontrol ile Karşılaştırıldığında MSUS İçin Yıldız, MS İçin Kare, MSUS ve MS Arasında Farklılıklar ise Artı İşareti Kullanılmıştır.....	43
Şekil 4.3	Günlere Göre Erkek Yavruların (N = 36) Gruplar Arasındaki Ağırlık Karşılaştırması; Koyu Mavi Kontrol Erkek Fareler, Orta Mavi MS Erkek Fareler ve Açık Mavi MSUS Erkek Fareleri Göstermektedir; Anlamlılık Sembolleri, Kontrol ile Karşılaştırıldığında MSUS İçin Yıldız, MS İçin Kare, MSUS Ve MS Arasında Farklılıklar İse Artı İşareti Kullanılmıştır.....	49
Şekil 4.4.	Gruplar Arası Bax Geni Ekspresyon Kıyaslanması; Median ve Çeyrek Yüzdelikler Gösterilmiştir.....	57
Şekil 4.5	Gruplar Arası Bcl2 Geni Ekspresyon Kıyaslanması; Median ve Çeyrek Yüzdelikler Gösterilmiştir.....	58
Şekil 4.6	Gruplar Arası Casp3 Geni Ekspresyon Kıyaslanması; Median ve Çeyrek Yüzdelikler Gösterilmiştir.....	59
Şekil 4.7	Gruplar Arası Tp53 Geni Ekspresyon Kıyaslanması; Median ve Çeyrek Yüzdelikler Gösterilmiştir.....	61
Şekil 4.8	Heatmap: Kontrol (N=24), Ms (N=24) Ve Msus (N=24) Grupları Arasında mRNA Ekspresyonu.....	62
Şekil 4.9	Hipokampusta Bax Ve Bcl2 mRNA Ekspresyonları Arasında Korelasyon.....	63
Şekil 4.10	Hipokampusta Bax Ve Casp3 mRNA Ekspresyonları Arasında Korelasyon.....	64
Şekil 4.11	Hipokampusta Bcl2 ve Casp3 mRNA Ekspresyonları Arasında Korelasyon.....	64
Şekil 4.12	Hipokampusta Bax ve Tp53 mRNA Ekspresyonları Arasında Korelasyon.....	65

Şekil 4.13	<i>Hipokampusta Bcl2 ve Tp53 mRNA Ekspresyonları Arasında Korelasyon.....</i>	65
Şekil 4.14	<i>Hipokampusta Casp3 ve Tp53 mRNA Ekspresyonları Arasında Korelasyon.....</i>	66



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 3.1	<i>Öngörülmeven Anne Ayrılığı Süresi.....</i>	28
Tablo 3.2	<i>Hipokampustan RNA İzole Edilen Örnekler İçin Karışım Miktarları.....</i>	35
Tablo 3.3	<i>cDNA Sentezi İçin PCR Programı.....</i>	35
Tablo 3.4	<i>qRT-PCR Çalışması İçin Gerekli Malzemeler ve Miktarları.....</i>	36
Tablo 3.5	<i>qRT-PCR İçin Kullanılan Program.....</i>	37
Tablo 3.6	<i>Primerlerin Dizisi ve Çoğaltılan Bölgenin Büyüklüğü.....</i>	38
Tablo 4.1	<i>Farklı Zaman Noktalarında Dişi Fare Grupları Arasındaki Kilo Farklarının Çoklu Karşılaştırma Analiz Sonuçlarının Özeti.....</i>	45
Tablo 4.2	<i>Dişi Fare Grubun Betimleyici İstatistik Detayları.....</i>	48
Tablo 4.3	<i>Farklı Zaman Noktalarında Erkek Fare Grupları Arasındaki Kilo Farklarının Çoklu Karşılaştırma Analiz Sonuçlarının Özeti.....</i>	51
Tablo 4.4	<i>Erkek Fare Grubun Betimleyici İstatistik Detayları.....</i>	55
Tablo 4.5	<i>Gruplar Arası Bax Geni Ekspresyonunun Betimleyici İstatistik Detayları.....</i>	57
Tablo 4.6	<i>Gruplar Arası Bcl2 Geni Ekspresyonunun Betimleyici İstatistik Detayları.....</i>	58
Tablo 4.7	<i>Gruplar Arası Casp3 Geni Ekspresyonunun Betimleyici İstatistik Detayları.....</i>	60
Tablo 4.8	<i>Gruplar Arası Tp53 Geni Ekspresyonunun Betimleyici İstatistik Detayları.....</i>	61
Tablo 4.9	<i>RS Değerine Göre Spearman Korelasyonun Gücünün Yorumlanması (Graphpad Prism).....</i>	63

1. GİRİŞ

Yaşamın erken dönemlerinde maruz kalınan kronik ve/veya aşırı stres, genellikle erken adversite, çocukluk travması veya erken yaşam stresi olarak adlandırılmaktadır. Erken yaşam stresinin, örneğin çocukluk yıllarında anneden ayrılığın, ebeveyn kaybının, istismar veya ihmal nedeniyle yaşanan şiddetli stres deneyiminin, bireyin fizyolojisi ve psikolojisi üzerinde önemli ve uzun süreli etkileri olduğu gösterilmiştir (Möhler ve Resch, 2019; Pesonen ve Räikkönen, 2012). En güncel örnek, COVID-19 pandemisidir. Annelerden bebeklere virüs bulaşmasını ve enfeksiyonun olası fiziksel tehlikelerini önlemek amacıyla, bazı hastaneler cilt teması ve emzirmeyi teşvik etmemiş veya hatta yasaklamıştır (Cimino ve Cerniglia, 2023). Dünya genelinde yaşanan savaş gibi çatışmalar da annelerin ayrılık kaygısının artmasına ve stresin kuşaklar arası etkilerinin sürmesine yol açmıştır (Shachar-Dadon vd., 2017). Sel, yangın, deprem ve kasırga gibi felaketlere maruz kalma, artan zihinsel sağlık sorunlarıyla defalarca ilişkilendirilmiştir (Norris vd., 2002). Birçok afet sırasında ve hemen sonrasında yaşanabilecek potansiyel bir deneyim, yakın aile üyelerinden ve diğer önemli figürlerden ayrı kalmaktır; bu durumda birey, sevdiklerinin yanında olmasının getirdiği güven duygusundan mahrum kalmakta ve bu kişilerin olası kaybı ile karşı karşıya gelmektedir (Gallagher vd., 2016).

Doğum sonrası anne ayrılığının neden olduğu kronik stres, gelişim üzerinde çok çeşitli olumsuz etkilerle ilişkilendirilmiş ve psikopatoloji ile sağlık bozuklukları riskine katkıda bulunmuştur (Bian vd., 2021a; Cotella vd., 2013; Kestering-Ferreira vd., 2021; Smith ve Pollak, 2020). Ancak, erken yaşamdaki doğum sonrası stresin zararlı etkileri bilinmesine rağmen, hipokampal apoptoz üzerindeki etkisinin altında yatan spesifik moleküler mekanizmalar hala belirsizliğini korumaktadır. Anne ayrılığı (MS), erken yaşam stresi modeli olarak sıklıkla çalışılmaktadır ve bu modelin beyin gelişimine ve psikopatolojik adaptasyona etkilerini belirlemek için yaygın olarak kullanılmaktadır (Meng vd., 2023a). Araştırmalar, erken anne ayrılığı ile çeşitli beyin bölgelerinde artmış apoptoz arasında bir ilişki olduğunu göstermiştir (Chocyk vd., 2011; Drastichova vd., 2021; S. Yang vd., 2017). Ergenlik dönemine geçmeden önce

BALB/c farelerde, öğrenme, hafıza ve stres yanıtı için önemli bir beyin bölgesi olan hipokampusta *Bcl-2-associated X protein (Bax)*, *Caspase-3 (Casp3)*, *Tumor protein p53 (Tp53)* ve *B-cell lymphoma 2 (Bcl2)* genlerinin mRNA ekspresyon seviyelerini incelemeyi hedefledik. *Bax/Bcl2* oranı, hücrenin apoptoza duyarlılığını belirleyen bir reostat gibi işlev görebilir (Raisova vd., 2001), bu da onu erken yaşam stresinin apoptoz üzerindeki etkilerini incelemek için potansiyel bir aday haline getirmektedir. Erken yaşam stresi ile ilişkili olarak, *Bax* ekspresyonunu takiben *Casp3* ve *Tp53* aktivasyonundaki eğilim, apoptozun kaskad mekanizmasını daha iyi anlamamıza yardımcı olacaktır.

Kemirgenlerde yapılan çalışmalar, özellikle MS gibi erken postnatal dönem stresinin yavrulardaki nöronal değişiklikler üzerindeki etkisini anlamak için odaklanmıştır (Bian vd., 2021b; Gapp vd., 2014, 2016; Huang vd., 2021; Jiang vd., 2021; Shu vd., 2015; Weiss vd., 2011; Y. Yang vd., 2023; Zalosnik vd., 2014; L. Zhou vd., 2020). Ayrıca, bu çalışma modeli genellikle zorunlu yüzme testi ve kısıtlama stresi gibi fizyolojik stres etkilerini de gözlemlemek amacıyla birleştirilmiştir (Gapp vd., 2014; Weiss vd., 2011).

Bu çalışma, erken yaşam stresiyle ilişkili moleküler değişiklikleri daha iyi anlamak için hipokampusta pro-apoptotik *Bax*, *Tp53*, *Casp3* ve pro-survival *Bcl2* genlerinin mRNA ekspresyon seviyelerini incelemektedir. Bu çalışmanın amaçları şunlardır:

- i. Beş haftalık farelerin hipokampusunda pro-apoptotik *Bax*, *Tp53*, *Casp3* ve pro-survival *Bcl2* genlerinin mRNA ekspresyon seviyelerinin erken yaşam stresi üzerindeki etkisini araştırmak.
- ii. Erken yaşam stresine yanıt olarak *Bax*, *Tp53*, *Casp3* ve *Bcl2* genlerinin ekspresyon paternlerindeki herhangi bir değişiklik veya değişimi incelemek.

- iii. Stres grupları ile kontrol grubu arasındaki potansiyel vücut ağırlığı farklarını değerlendirerek, erken yaşam stresinin yavruların gelişimi üzerindeki uzun vadeli etkilerini anlamak.
- iv. Ergenlik dönemine geçmeden önceki zamanda hipokampal apoptoz ile ilişkili biyobelirteçlerin potansiyelini araştırmak.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Stres

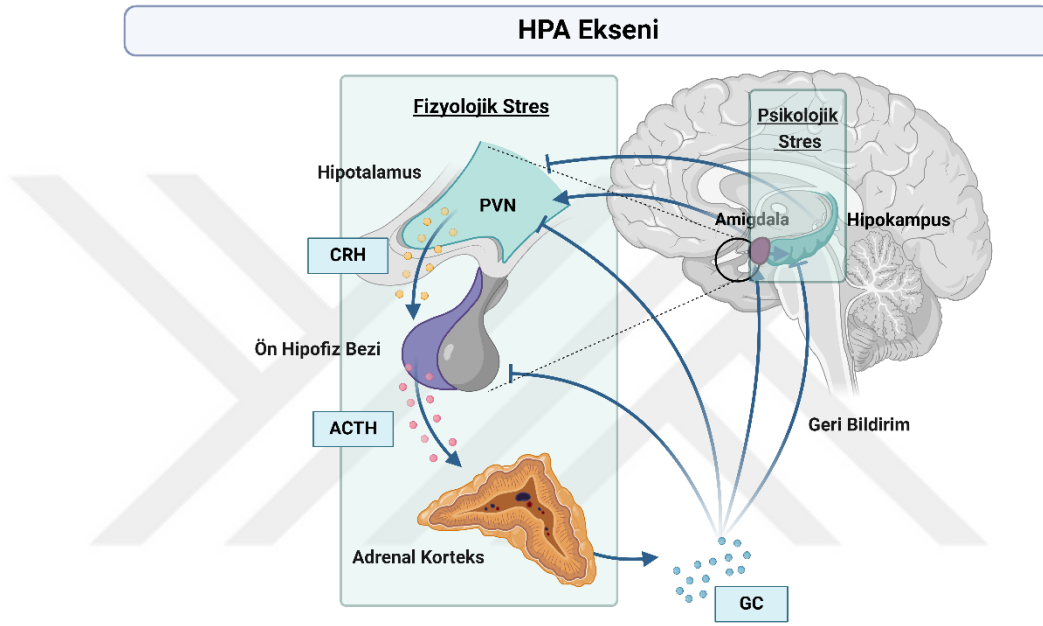
Stres, iç yapıdaki dengenin korunması olarak tarifleyebileceğimiz homeostazise karşı gerçekleşen iç ve dış tehditlere cevap olarak yaşayan organizmanın verdiği adaptasyon reaksiyonudur. Hızlı tempolu dünyamızda, stresten kaçınmak mümkün değildir. Stres, dinamik ve birbiri ile ilişkili çeşitli biyolojik ve psikososyal olayın son noktasını temsil eden kompleks bir koruma mekanizmasıdır (D vd., 2011). Latince germek anlamına gelen "*stringere*" sözcüğünden köken almaktadır (Keil, 2004).

Stres, genellikle bir organizmanın homeostazisini, yani fizyolojik veya psikolojik dengesini bozan herhangi bir durum olarak tanımlanmaktadır (J. J. Kim ve Diamond, 2002). Bu, çevresel faktörlerden etkilenen biyolojik ve psikolojik değişimleri kapsamaktadır ve hastalık riskini artırabilmektedir. Stres, akut veya kronik olarak sınıflandırılabilen ve fizyolojik veya psikolojik bozukluklar olarak ortaya çıkabilmektedir (S. Dai vd., 2020). Stres, farklı insanlar için farklı durumlarda farklı anlamlar taşımaktadır. Stresin ilk ve en genel tanımı Hans Selye tarafından yapılmıştır: "Stress is the nonspecific response of the body to any demand. "Stres, vücudun herhangi bir talebe verdiği spesifik olmayan tepkidir." Daha sonra, farklı durumlar için uyarlanmış başka tanımlar da geliştirilmiştir; örneğin, bilişsel stres (Fink, 2009). Hans Selye, stresi "durumsal talep ile bireyin bu talepleri karşılama yeteneği ve istekliliği arasındaki uyumsuzluktan kaynaklanan psikolojik ve fizyolojik dengesizlik hali" olarak tanımlamaktadır. Günümüzde stres, dışsal bir uyarıcı ve kişinin buna verdiği tepki olarak tanımlanmaktadır. Stresin hastalıkla ve insanların buna verdikleri farklı tepkilerle ilişkisini inceleyen birçok kanıt mevcuttur (Amin, 2018).

2.1.1. Stres Türleri

Stres, bir organizmanın stres yanıt mekanizmalarını harekete geçiren dışsal veya içsel bir tehdit olarak tanımlanmaktadır. Bu, fizyolojik veya psikolojik bir tehdit olarak vücudun stres yanıtını tetikleyen bir durumu ifade etmektedir. Stres, hızlı

davranışsal, otonomik ve bilişsel tepkileri mümkün kılan bir dizi moleküler süreci başlatmakta ve ardından vücudun dengeli durumunu hızla yeniden kurmaktadır. Bu süreç, norepinefrin ve glukokortikoidler gibi etkili moleküllerin hızlı bir şekilde salgılanmasını ve gen ifadesinde daha uzun süreli, koordineli bir değişikliği içermektedir (Fenoglio vd., 2006). Stres, her biri organizmada belirli stres yanıtı süreçlerini başlatan fizyolojik ve psikolojik stres olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır (Şekil 2.1) (Fenoglio vd., 2006).



Şekil 2.1 Fizyolojik ve Psikolojik Stres Tepkileriyle İlgili Devreler

Fizyolojik stres sinyalleri, nöroendokrin HPA eksenini aktive etmektedir. Fizyolojik stres sinyalleri, hipotalamik PVN bölgesinde birleşerek hipotalamo-pitüiter portal sistemine CRH salgılamasına neden olmaktadır. CRH, hipofiz bezinden ACTH salgılanmasını teşvik eder ve ACTH, adrenal bezden GC salgılamasını indüklemektedir. GC'ler kan-beyin bariyerini geçerek hipokampus, PVN ve hipofizdeki tip-2 GR ile etkileşime girer ve stres tepkisine yönelik nöroendokrin yanıtı "kapamaktadır" (küt uçlu çizgilerle belirtilmiştir). Buna karşılık, amigdalanın merkezi çekirdeğindeki GR aktivasyonu bu bölgede CRH ifadesini artırmakta ve genellikle stres tepkilerini teşvik edici olarak kabul edilmektedir. Psikolojik stres, ek beyin bölgelerini ve devreleri devreye sokmakta olup, en azından hipokampal formasyonu içermektedir. Oklar, teşvik edici projeksiyonları göstermektedir (Fenoglio vd., 2006; Herman vd., 2016). (Şekil 2.1 BioRender uygulaması ile yapılmıştır).

Fizyolojik stres, reaktif, gerçek ve fiziksel stres gibi farklı adlarla bilinmektedir. Bu tür stres, organizmanın nöroendokrin, hipotalamik-pitüiter-adrenal (HPA) eksenini üzerinden etkilenmektedir (Herman vd., 2016). Potansiyel bir tehdit algılandığında, beyin bu eksenin hareketine geçirmekte ve stres hormonlarının salınmasını sağlamaktadır. Sinirsel sinyaller, bir tehlike belirtisi olduğunu işaret ederek hipotalamus bölgesindeki paraventriküler nükleus (PVN) kortikotropin salgılatıcı hormon (CRH) salınımını başlatmaktadır. CRH, ardından ön hipofiz bezi tarafından adrenokortikotropin (ACTH) salınımını tetiklemekte ve bu da adrenal bezlerden glukokortikoidlerin salınmasına neden olmaktadır. Glukokortikoidler, hipokampus ve merkezi sinir sisteminin (CNS) diğer bölgelerindeki spesifik reseptörlere bağlanarak hormonal stres yanıtını sonlandırmakta ve vücudun dengeye dönmesine yardımcı olmaktadır. Bu stres tepkisi, doğumdan itibaren insanlarda ve hayvanlarda gözlemlenebilmektedir. Glukokortikoidler, HPA ekseninin temel son ürünleri olup, homeostatik dengeyi korumak için beyin de dahil olmak üzere birçok organ sisteminde etkili olmaktadır (Jankord ve Herman, 2009). Kısa vadeli hayatta kalma için faydalı olmalarına rağmen, glukokortikoidlere uzun süre maruz kalmak metabolizma, bağışıklık fonksiyonu ve psikolojik sağlık ile ilgili çeşitli sorunlara yol açabilir. Bu nedenle, glukokortikoidlerin salgılanmasını sıkı bir şekilde düzenlemek, bu olumsuz etkileri önlemek için çok önemlidir (Jankord ve Herman, 2009). *Psikolojik stres*, öngörülen ve duygusal stres olarak da bilinmektedir. Bu tür stres, merkezi stres devresinin bir parçasını oluşturan üst-düzey limbik yolları aktive etmektedir. Akut stres sırasında, ‘limbik’ veya ‘psikolojik’ stres sinyalleri, özellikle amigdalanın merkezi çekirdeğinde birleşmekte ve burada hemen erken gen (IEG) ekspresyonunu indüklemektedir. Daha sonra bu sinyaller, çeşitli sinaptik yollarla amigdaladan hipokampusa yayılmakta ve burada stres yanıtını daha da güçlendirmektedir. Daha sonra bu sinyaller, çeşitli sinaptik yollar aracılığıyla amigdaladan hipokampusa yayılarak IEG ifadesini daha da uyandırır ve sinaptik etkinliği artırır (Fenoglio vd., 2006). Özetle, fizyolojik stres sadece hipotalamus-hipofiz-adrenal aks (HPA aksı), üzerinden etki gösterirken, psikolojik stres varlığında bu aksa limbik sistem kapsamındaki hipokampus da dahil olmaktadır.

Stres, akut ve kronik olmak üzere de ikiye ayrılabilir (S. Dai vd., 2020). Akut stres, genellikle acil durumlarda ortaya çıkarak vücudun stres ile başa çıkabilmesini sağlarken (S. Dai vd., 2020; Ulrich-Lai ve Herman, 2009), Kronik stres ise rahatlama olmaksızın ağır bir yüke uzun süre dayanma durumudur. Sonuç olarak,

kronik stres uykusuzluk, sindirim sistemi bozuklukları (Alonso vd., 2008), anksiyete, depresyon (Menard vd., 2017), kardiyovasküler hastalıklar, nörodejeneratif hastalıklar (Song vd., 2020) ve hatta kanser gibi çeşitli sağlık sorunlarına yol açabilmektedir (S. Dai vd., 2020). Yaşamın erken safhalarında (doğum sonrası) maruz kalınan kronik stres, kişilik bozukluğu, bipolar depresyon, dikkat eksikliği hiperaktivite bozukluğu ve ailelerdeki anti-sosyal davranışlar gibi psikiyatrik durumların riskini arttırabilmektedir. Ayrıca, hayvan modelleri üzerinde yapılan çalışmalar ile anneden ayrılma gibi erken yaşam stresinin, yetişkinlikte bozulmuş stres tepkileri, artan davranışsal çaresizlik ve bilişsel eksiklikler dahil olmak üzere davranış üzerinde olumsuz sonuçları gösterilmiştir (Gapp vd., 2014, 2016).

2.1.2. Erken Yaşam Stresi

Erken yaşam stresi (ELS), bir çocuğu fiziksel ve/veya psikolojik olarak başarılı bir şekilde başa çıkma kapasitesini aşan herhangi bir olayı ifade etmektedir (Sinnamon, 2019). ELS, depresyon için en büyük çevresel risk faktörlerinden biridir. Potansiyel aracı faktörler olarak bilinen kortizol ve beyin yapı/fonksiyonundaki değişiklikler, özellikle hipokampus, amigdala, medial prefrontal korteks ve anterior singulat korteksin bölgelerinde benzer değişikliklerle ilişkilidir (Pagliaccio ve Barch, 2016). ELS çocuklukta kötü muamele (ihmal; fiziksel, cinsel ve psikolojik istismar) ve stresli yaşam olayları olarak alt gruplara ayrılmaktadır. Yetişkin psikopatolojisi için risk derecesi, çocuklukta kötü muamele şiddeti ve stresli yaşam olaylarının sayısı ile ilişkili olma eğilimindedir. Beyinde, EYS, glukokortikoid salınımında ömür boyu bir artış, sonraki streslere karşı artmış endokrin yanıt ve hipotalamik-hipofiz-adrenal (HPA) ekseninin bozulması ile karakterize edilmektedir; hepsi ruh ve bilişsel bozukluklarda patojenik faktörler olarak kabul edilmektedir (Wenderski ve Maze, 2014). Laboratuvar hayvanları üzerinde yapılan çalışmalar, erken yaşam stresinin CRF içeren sinir devrelerinde kalıcı bir artışa neden olduğunu göstermiştir. Yenidoğan kemirgenler ve insansı primatlar, annelerinden uzun süre ayrıldıklarında (doğal yaşamda avlanma sürelerinden daha uzun süreler boyunca), yetişkinlik dönemine kadar devam eden nörobiyolojik ve davranışsal değişikliklere yol açmaktadır (Pariante ve Nemeroff, 2012).

2.1.3. Anne Stresi

Anne stresi gerçekleştiği döneme bağlı olarak genellikle iki ana tre ayrılabilir: prenatal (doğum öncesi) ve postnatal (doğum sonrası). Prenatal stres, sadece annenin zihinsel sağlığını etkilemekle kalmaz, aynı zamanda çocuğun gelişimine derin etkileri olabilir, bu da dikkat eksikliği hiperaktivite bozukluğu (DEHB) ve otizm spektrum bozukluğu (OSB) gibi nöropsikiyatrik bozuklukların riskini içermektedir (Govindaraj vd., 2017). Ayrıca, nesillerde üreme davranışını ve fizyolojisini bozabilir (HERRENKOHL, 1986), ve doğum sonrası maternal depresyon/anksiyetenin çocuğun içselleştirme davranışı üzerindeki etkilerini şiddetlendirebilir (Hartman vd., 2020).

Doğum sonrası annelik stresi, doğumdan sonra meydana gelen ve hem annede hem de çocukta olumsuz etkilere sebep olabilen bir stres türüdür (Lin vd., 2017). Doğum sonrası annelik stresinin, çocukluk çağındaki gecikmelerle ilişkilendirilmiş olup, stresin yıl boyunca negatif yaşam olaylarına ve algılanan stres düzeylerine bağlı olduğu bilinmektedir (Schmeer vd., 2020). Ayrıca, doğum sonrası annelik stresi, yavruların nrogeleşiminde bozulmalarla ilişkilidir (Koutra vd., 2013). İnsanlarda, primatlarda ve kemirgenlerde sosyal becerilerin gelişimi, annenin sağladığı bakım ve hayatın erken dönemlerinde anne ile yavru arasında kurulan bağa ağırlıklı olarak dayanmaktadır (Franklin vd., 2011). Hayvan modellerinde yapılan kapsamlı araştırmalar, anne ayrılığı gibi erken yaşam stresörlerinin, yetişkinlikte davranışlar üzerinde zararlı etkilere sahip olduğunu tutarlı bir şekilde göstermektedir. Bu etkiler, bozulmuş stres tepkileri ve artmış davranışsal umutsuzluk gibi uygunsuz davranış kalıplarını göstermektedir (Gapp vd., 2014; Weiss vd., 2011).

Anne ayrılığı (MS), erken yaşam stresi modeli olarak geniş çapta tanınmıştır ve erken yaşam zorluklarının uzun vadeli psikolojik ve fizyolojik sonuçlarını araştırmak için sıklıkla kullanılmaktadır. Bu model, erken yaşam stresinin duygusal biliş, HPA eksen fonksiyonu, epigenetik değişiklikler ve bağırsak mikrobiyom dengesizlikleri üzerindeki etkilerini anlamamıza yardımcı olur. Xiaoying Meng, Binghao Bao, and Guangxin Yue (Meng vd., 2023b) (2023) tarafından yapılan bir bibliyometrik analiz, bu araştırma eğilimlerini vurgulamış ve bu uzun vadeli etkilerin altındaki mekanizmaları anlamamıza katkıda bulunmuştur.

Anne ayrılığının, kuşaklar boyunca davranışsal ve epigenetik fenotipleri etkileyebileceği gösterilmiştir, bu da genellikle annenin davranışı ve yavrunun genetik geçmişi tarafından belirlenmektedir. Bu durum, C. Schmauss ve arkadaşlarının (Schmauss vd., 2014) bir araştırmasında ortaya konmuş ve annenin davranışının stres etkilerinin kuşaklar arası iletilmesinde kilit bir rol oynadığını vurgulamıştır. Ayrıca, kişilerin yalnız kendi yaşadıkları değil atalarından kalma tecrübelerinin de yaşamlarına etki ettiği gösterilmiştir (Ambeskovic vd., 2020). Bireylerin yaşam deneyimlerini daha sonraki kuşaklara devredebildikleri, stresle karşılaşmanın çocukları, hatta torunları bile negatif etkilere maruz bırakabileceği gösterilmiştir (Van Steenwyk vd., 2018). Ebebeyn ve çocuklarda oluşan fenotipten sorumlu bu kalıtıma epigenetik kalıtım adı verilir ki tek gen kalıtım modeli olarak bilinen Mendeliyen kalıtım şekline uymaz (Mahurkar-Joshi ve Chang, 2020).

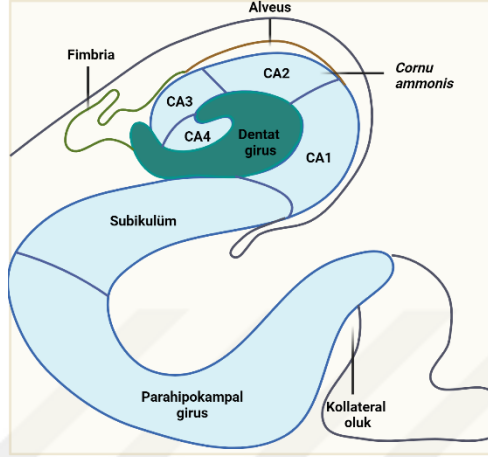
Ek olarak, Erken Sütten Kesmeyle Birlikte Anne Ayrılığı (MSEW) gibi yeni fare modellerinin geliştirilmesi, erken yaşam ihmalinin daha derinlemesine anlaşılmasını sağlamıştır. E. D. George ve arkadaşları (George vd., 2010) tarafından yapılan çalışmada, MSEW modelinin, erken yaşam ihmalinin kalıcı davranışsal etkilerini taklit etmede önemli bir rol oynadığını göstermektedir. Bu durum, bu koşullarla ilişkilendirilen davranışsal anormallikleri tedavi etmek için potansiyel terapötik stratejilere dair değerli bakış açıları sunmaktadır.

2.2. Hipokampus

Hipokampus, her beynin temporal lobu içinde yer alan iki taraflı bir yapıdır. Temporal lobların üst ve iç bölgelerini kaplamakta olup, parahipokampal girusun üst kısmında konumlanmaktadır (**Şekil 2.2**). Her hipokampus, birbirine bağlı iki gri madde kıvrımından oluşmaktadır. Bu kıvrımlardan biri cornu ammonis (CA) veya “Ammon boynuzu” olarak anılmakta ve hipokampusun üst ve dış bölgesinde yer almaktadır. Diğer kıvrım dentat girus olarak adlandırılmakta ve hipokampusun alt ve iç kısmında bulunmaktadır (Hammoud vd., 2019).

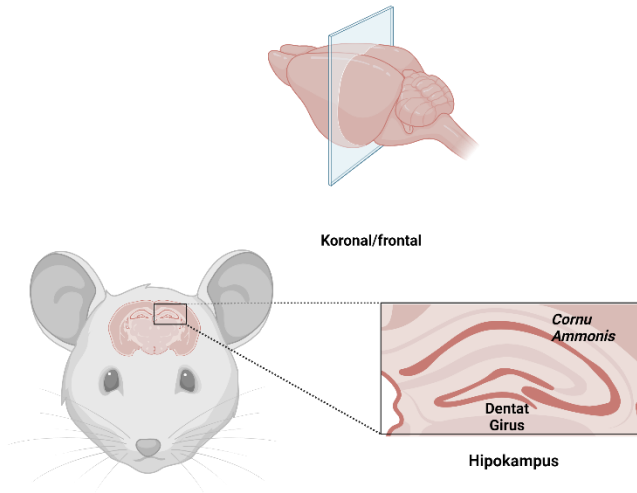
Enine (koronal) bir kesitte gözlemlendiğinde, CA bölgesi dört farklı bölgeye ayrılabilir: CA1, CA2, CA3 ve CA4 (Hammoud vd., 2019). Hipokampusun CA bölgesi esasen piramidal hücrelerden oluşmaktadır. CA bölgesi, glutamat gibi uyarıcı

nörotransmitterleri kullanan piramidal hücrelerden oluşmaktadır (Chauhan vd., 2021). CA1'deki nöronların çoğu (%90), glutamaterjik projeksiyon nöronları olarak görev yapmakta iken, kalan %10'u internöronlardır. Öte yandan, dentat girus genellikle granüler nöronlardan oluşmaktadır (Chauhan vd., 2021).



Şekil 2.2 *Hipokampal Koronal Kesit* (Hammoud vd., 2019) (BioRender ile yapılmıştır)

Şekil 2.3 fare hipokampusunun şematik bir temsilini göstermektedir. Koronal bir kesit sunarak, hipokampusun iç organizasyonunu ayrıntılı bir şekilde göstermektedir.



Şekil 2.3 *Fare Hipokampusu* (Gunnarsdóttir vd., 2022) (BioRender uygulaması ile yapılmıştır)

Çalışmalar, hafıza oluşumunda kritik bir rol oynayan hipokampusun (Hammoud vd., 2019)(Costa vd., 2015), kontrolsüz stres nedeniyle çeşitli yollar tarafından etkilendiğini ortaya koymuştur (E. J. Kim vd., 2015). Stres, hafıza görevlerini bozabilmekte, sinaptik plastisiteyi ve nöronal atış düzenlerini değiştirebilmekte ve hipokampusun yapısında değişikliklere neden olabilmektedir. Hipokampustaki stres kaynaklı bu değişiklikler, travma sonrası stres bozukluğu (TSSB) gibi stresle ilişkili bozukluklarla ilişkilendirilmiştir (E. J. Kim vd., 2015).

Hipokampus, öğrenme ve hafızada çok önemli bir rol oynamaktadır ve hipokampustaki nöronal apoptoz öğrenme eksikliklerine katkıda bulunmaktadır (Kuang vd., 2014). Hayvanlarda stres sonucu glukokortikoid aşırı maruziyeti, hipokampal işlev bozukluğu ve nöron kaybıyla ilişkilendirilmiştir (Lucassen vd., 2001). İnsanlarda ve kemirgenlerde yapılan araştırmalar, erken yaşam stresinin ve anneden ayrılmanın hipokampal işlevi, özellikle de apoptoz ve nöron proliferasyonunu nasıl etkilediğine dair önemli bilgiler sağlamıştır. Anne ayrılığı gibi erken yaşam stresi, CA3 hipokampal bölgesindeki olgun nöronlarda azalma ile bağlantılıdır ve yetişkin dişi farelerde bilişsel işlevleri ve annelik davranışını etkilemektedir (Reshetnikov vd., 2020). Aynı zamanda, araştırmalar erken anne ve sosyal yoksunluğun (MSD) nöral kök hücre popülasyonunu genişletebileceğini, hipokampus ve amigdalada nörogenezi artırabileceğini ve korku hafızasını azaltabileceğini göstermektedir (Daun vd., 2020).

2.3. Hücre Ölümü

Hücre ölümü, "hücreyel bütünlüğün kaybına (kalıcı plazma membranı geçirgenleşmesi veya hücreyel parçalanma) yol açan hayati hücreyel fonksiyonların geri dönüşümsüz bir dejenerasyonu" olarak tanımlanabilir. (Melo vd., 2022). Beyinde, hücre ölümü, nöron sayısını düzenleyen normal bir mekanizmadır. Hücre ölümü için gerekli genlerin silindiği deneysel genetik manipülasyonlar, anormal derecede büyük beyinlere sahip hayvanlara yol açar. Farklılaşmış nöronlar, genellikle beyindeki nöron popülasyonunu yarı yarıya azaltması beklenen hücre ölümüne maruz kalır, ancak öncül hücre sayısının da hücre ölümü tarafından düzenlendiği gösterilmiştir. Hücre ölümünün düzenlenmesi, evrimde farklı boyutlarda beyinlerin oluşumunda olası bir mekanizmadır (Herculano-Houzel, 2009). Hücre ölümü, çeşitli fizyolojik süreçler için

kritik öneme sahiptir ve hücre ölümü mekanizmalarının bozulması, kanser ve nörodejeneratif hastalıklar gibi çeşitli patolojik durumlarla ilişkilendirilmiştir (Ghosh ve Roth, 2014). Hücrelerde mevcut intihar mekanizmaları, tüm hayvanların gelişimi ve varlığını düdürebilmesi için hayati öneme sahiptir. Omurgalılarda sinir sisteminin normal gelişimi, bağışıklık sisteminin düzgün çalışması, insanlarda el ve ayakların, diğer memelilerde pençelerin normal şekilde oluşumu gibi birçok süreçte apoptozis gereklidir (Pérez-Garijo ve Steller, 2015). Parkinson ve Alzheimer gibi dejeneratif sinir sistemi hastalıklarında, apoptozisin rolüne dair önemli kanıtlar bulunmaktadır (Erekat, 2018; Sharma vd., 2021). Kanser gibi durumlarda ise hücre intiharının başarısız olmasıyla ilişkilendirilebilir (Pfeffer ve Singh, 2018b).

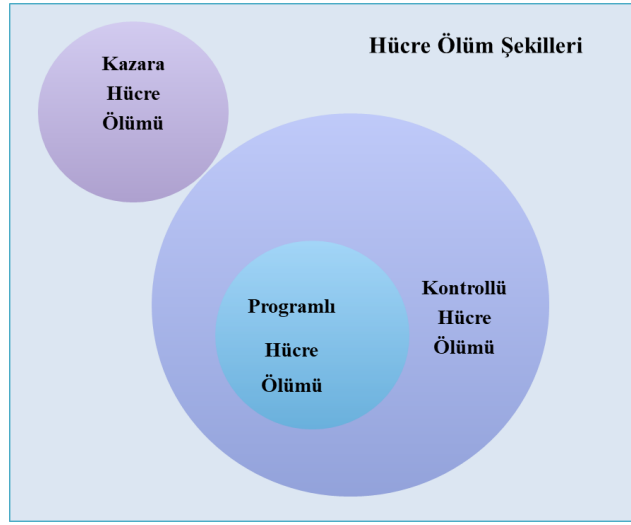
2.3.1. Hücre Ölümünün Sınıflandırması

Hücre ölümü, görülen morfolojik değişikliklerle belirginleşir. Morfolojik görünümüne göre apoptotik (sitolitik olmayan), nekrotik (sitolitik) (Melo vd., 2022), otofajik ve mitoz ile ilişkili olarak sınıflandırılmaktadır (Kroemer vd., 2008). Enzimolojik özelliklerine göre hücre ölümü, nukleazların ve proteazların (kaspaz, katepsin, kalpain, transglutaminaz) aktivitesine bağımlı veya bağımsız olarak sınıflandırılmaktadır (Kroemer vd., 2008). Fonksiyonel durumlarına göre hücre ölümü, programlı hücre ölümü ve hasar ile hücre ölümü olarak ikiye ayrılmaktadır (Kroemer vd., 2008). İmmunojenik özelliklerine göre hücre ölümü, immünogenik veya immünogenik olmama derecesine göre değişmektedir (**Şekil 2.4**) (Kroemer vd., 2008).



Şekil 2.4 Hücre Ölümünün Sınıflandırılması

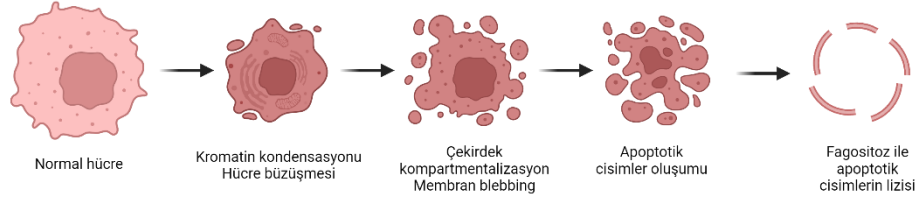
Hücre ölüm şekli, programlı ve kontrollü ya da kaza ile meydana gelebilmektedir (Galluzzi vd., 2014). Programlı ölüm tipi, fizyolojik hücre ölümüdür. Bu tür ölüm, embriyonik veya yetişkin süreçteki doku homeostazı için gerekli olan hücre ölümünü içermektedir. Gelişimsel bir program dahilinde ve/veya fizyolojik doku homeostazının korunması amacıyla gerçekleşmektedir. Kontrollü ölüm tipi ise, işlem fazları tayin edilebilir bir moleküler mekanizma aracılığıyla gerçekleşen programlı veya programlı olmayan hücre ölümünü ifade etmektedir. Bu mekanizmalar, farmakolojik ajanlar veya genetik müdahaleler ile baskılanabilmektedir. Kaza ile ortaya çıkan hücre ölümü ise, aşırı miktarda fiziksel veya kimyasal faktörlerle hücre hasar sonucu gelişmektedir. Çevresel koşullara bağlı olarak kontrol edilemeyen faktörler sonucunda meydana gelmektedir. Bunlar arasında sıcaklık, basınç, kimyasal ajanlar, pH değişiklikleri, travma, yanık gibi etkenler bulunmaktadır. Bu tür ölüm, farmakolojik veya genetik işlemlerle baskılanamaz ve nekrotik görüntüler ortaya çıkmaktadır (Şekil 2.5) (Galluzzi vd., 2014).



Şekil 2.5 Hücre Ölüm Şekilleri

2.3.2. Programlı Hücre Ölümü: Apoptozis

Enfekte olmuş, hasar görmüş, ya da işlevsel ömrünün sonuna gelmiş hücreler, sıklıkla “Programlanmış hücre ölümüne” uğramaktadır. Kontrollü hücre intiharlarından en iyi anlaşılmış olanı apoptozistir. Apoptozis, hem fizyolojik hem de patolojik koşullarda gözlemlenebilmektedir. Apoptozis Yunanca’da “düşme” anlamına gelir ve klasik Yunan şiirinde yaprakların dökülmesi anlamında kullanılmıştır. Bu süreçte (Şekil 2.6), hücresel ajanlar DNA’yı, organelleri ve diğer sitoplazmik bileşenleri parçalar. Hücre küçülür, sitoplazma yoğunlaşır ve büzülür. Ayrıca, komşu hücrelerle olan bağlantılar kopar ve hücre içi kalsiyum konsantrasyonu artar. Hücre iskeleti elemanları parçalanır. Nükleusta kromatin yoğunlaşır ve piknotik bir görüntü oluşturur. DNA, 180-200 baz çifti veya katları şeklinde nukleozomal bölgelerden kırılır. Hücre bileşenleri veziküller içinde paketlenir ve özelleşmiş temizleyici hücreler (komşu hücreler ve makrofajlar) bu vezikülleri içine alarak (fagositoz), geride hiçbir iz bırakmadan parçalarlar. Apoptozis sırasında genellikle enflamasyon gözlenmez (Galluzzi vd., 2014). Apoptozis, komşu hücreleri hasardan korur. Apoptozis olmadığında, ölmekte olan bir hücrenin parçalayıcı enzimleri dahil, bütün içeriği dışarıya çıkacağı için, bu durum çevredeki hücreler üzerinde hasara neden olabilmektedir (Green vd., 2009).



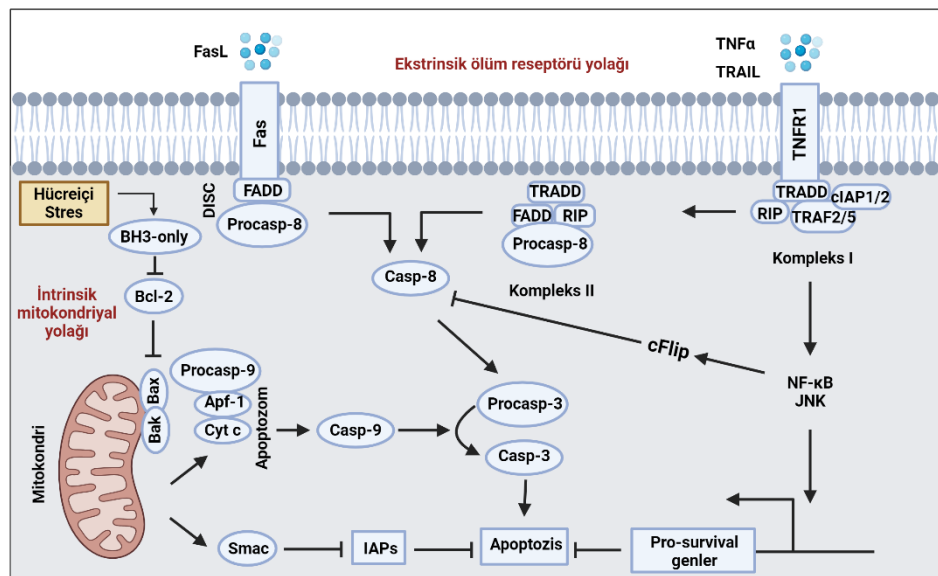
Şekil 2.6 Apoptozis Evreleri. (Bu şekil BioRender uygulaması ile yapılmıştır)

2.3.3. Apoptozis Mekanizmaları

Apoptoz mekanizmaları, hücre ölümünün gerçekleşmesinde rol oynayan farklı yolları içermektedir. İnsanlar ve diğer memelilerde apoptozisi gerçekleştiren çeşitli yollar, 14 farklı kaspaz içermektedir (Shi, 2002). Hangi yolağın kullanılacağı, hücre tipine ve apoptozu tetikleyen spesifik sinyale bağlıdır. Birinci yol, hücre içinde oluşturulan sinyaller ile tetiklenen apoptozdur ve bu yol mitokondriyum yolağı olarak adlandırılmaktadır. Ayrıca, intrinsik yolağı olarak da bilinmektedir (Jan ve Chaudhry, 2019). Bu yolak, belirli mitokondriyal proteinleri içermektedir. Bu proteinler (Bax/Bak), mitokondrinin dış zarında porlar oluşturarak, zardan apoptozu teşvik eden diğer proteinlerin sızmasına neden olacak şekilde tetiklenmektedir. Mitokondriyal yolak uyarıcı ölüm sinyalleri ile hücre içindeki reaktif oksijen türlerinin (ROT) artışı, ATP/ADP ve NADH azalması (Chandra vd., 2006), Bcl-2 transkripsiyon ve translasyon hataları ile hücre DNA hasarları, mitokondri membran permeabilitesinin bozulmasına yol açmaktadır. Bu süreç sonucunda sitokrom-c mitokondri membranından sitoplazmaya geçer. Sızan proteinler arasında sitokrom c'nin bulunması beklenmedik bir durumdur. Sitokrom c, sağlıklı hücrelerde mitokondriyal elektron taşınmasında görev yapmaktadır, ancak mitokondri dışına salındığında hücre ölüm faktörü olarak işlev görmektedir. Sitokrom-c, apoptoz aktive edici faktör-1 (Apaf-1) olarak bilinen başka bir adaptör proteini aktive eder. Bu protein, homooligomerize olarak kaspaz aktive edici bir kompleks oluşturur ve ardından başlatıcı kaspaz-9'u, daha sonra ise efektör kaspaz-3 ve -7'yi sırasıyla işe alır ve aktive eder. Bu kompleks, sitokrom-c, Apaf-1 ve kaspaz-9'un birleşimi olan apoptozom olarak adlandırılmaktadır. Apoptozom, diğer kaspazları aktive ederek hücreyi ölüme götürmektedir (Bratton ve Salvesen, 2010; Chandra vd., 2006). Mitokondriyum veya

intrinsik yolağında yer alan proteinler arasında SMAC/DIABLO (Kaspazların ikinci mitokondriyal aktivatörü/düşük PI ile doğrudan IAP bağlayıcı protein), Kaspaz-9 (Sisteinil aspartik asit-proteaz-9), Bcl-2 (B-hücre lenfoma protein 2), Bcl-w (Bcl-2 benzeri protein), Nox (Forbol-12-miristat-13-asetat tarafından indüklenen protein 1), Aven (Hücre ölümü düzenleyici Aven) ve Myc (Onkogen Myc) yer almaktadır (Jan ve Chaudhry, 2019).

İkinci yolak ise, hücre yüzeyindeki reseptörlere bağlanan ölüm aktivatörleri tarafından tetiklenen apoptozdur; bu yolak, ölüm reseptörleri yolağı ve ekstrinsik yolağı olarak da bilinmektedir (Jan ve Chaudhry, 2019). Apoptotik programa doğru giden anahtar niteliğindeki ana yollarda görev yapan aktarım proteinleri, farklı kaynaklardan gelen sinyalleri entegre eder ve hücreyi apoptotik yola yöneltir. Genellikle hücre dışından kaynaklanan bu sinyal, komşu hücre tarafından salınan bir ölüm sinyali molekülüdür. Bir ölüm-sinyali ligandı, hücre yüzeyindeki bir reseptöre yerleştiğinde, bu bağlanma mitokondriyal yolu işe karıştırmadan, kaspazların ve apoptozisi gerçekleştiren diğer enzimlerin aktivasyonuna yol açar. Transmembran reseptörlerin dış bölgesine, TNF (tümör nekroz faktörü), Fas-L (Fas ligandı) ve TRAIL (TNF ile ilişkili apoptozu tetikleyen ligand) gibi ligandlar bağlanır. Bu ligandlar, TNFR1 (tip 1 TNF reseptörü), Fas (ayrıca CD95/Apo-1 olarak da bilinir) ve TRAIL reseptörlerine tutunurlar (Jan ve Chaudhry, 2019).



Şekil 2.7 Apoptoz Mekanizmaları (Bu şekil BioRender uygulaması ile yapılmıştır).

İntrinsik ölüm reseptörü yolağı, hücre içi stres altında 'BH3-only' protein tarafından başlatılmaktadır; BH3-sadece protein, Bcl-2'yi inaktive edebilmekte ve Bcl-2'nin Bax ve Bak'ı etkili bir şekilde nötralize etmesini engelleyerek Bax ve Bak'ın aktivasyonuna yol açmaktadır. Mitokondriyal membranda aktifleşen Bax ve Bak, mitokondriden sitokrom c ve Smac'ın salınmasına neden olmaktadır. Sitoplazmik sitokrom c, Apaf-1 ve kaspaz-9 ile birleşerek apoptozomu oluşturmakta, bu da kaspaz-9'u ve sonrasında yürütücü kaspazları aktive etmektedir. Smac, apoptoz inhibitör proteinlerini (IAP'ler) inhibe ederek apoptozu düzenleyebilmektedir. Ekstrinsik ölüm reseptörü yolağı, FasL, TNF- α veya TRAIL gibi ölüm reseptörü ligandları tarafından aktive edilmektedir. FasL'nin Fas'a bağlanması, FADD ve kaspaz-8'in DISC kompleksini oluşturmak üzere toplanmasını başlatmakta, bu da kaspaz-8 ve ardından yürütücü kaspazları aktive etmektedir. TNF- α 'nın TNFR1'e bağlanması, TRADD, RIP, TRAF2/5 ve cIAP1/2'nin toplanarak kompleks I'i oluşturmalarını başlatmakta, bu da NF- κ B ve JNK yollarını aktive ederek pro-survival genlerin transkripsiyonunu artırmaktadır. Ancak, RIP'nin modifikasyonu veya cIAP1/2'nin degradasyonu, kompleks I'in dağılmasına yol açabilmektedir. TRADD ve RIP daha sonra FADD ve kaspaz-8 ile birleşerek kompleks II, yani ölüm kompleksini oluşturmaktadır (J. X. Zhou ve Li, 2015).

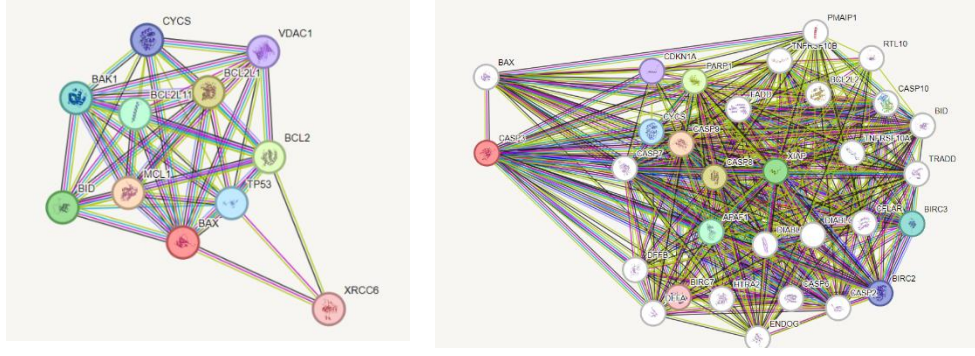
Apoptozun dışsal aşamasındaki olayların sırası, FasL/FasR ve TNF- α /TNFR1 modelleri ile iyi anlaşılmaktadır (**Şekil 2.7**). Belirli ölüm ligandlarının (DL'ler) ölüm reseptörlerini (DR'ler) etkilediği bu süreçte ölüm indüklenme sinyal kompleksi (DISC) adı verilen bir kompleks oluşmaktadır. Bu DISC, içerisinde Fas ile ilişkili ölüm alanı (DD) bulunan bir adaptör molekül, procaspase-8, procaspase-10 ve hücrel FLICE inhibisyon proteinlerini (c-FLIPs) barındırmaktadır. Caspase-8, prodomaininin DISC'te kalmasını sağlayacak şekilde etkinleştirilmekte, aktif caspase-8 ise DISC'ten ayrılarak apoptozun icra aşamasını oluşturan kaspaz aktivasyonu kaskadını başlatmaktadır. Kaspazlar, apoptozun başlatıcıları ve icracıları olarak işlev görmek ve işlevleri, yapıları ve farklı substrat tercihleriyle çok yakından ilişkilidir. Kaspazlar, apoptotik sinyal kaskadındaki konumlarına göre geleneksel olarak başlatıcı ve icracı (efektör) kaspazlar olarak sınıflandırılmaktadır (Jan ve Chaudhry, 2019). Başlatıcı kaspazlar, apoptozun başlatılmasında temel bir rol oynarlar ve bu gruba kaspaz 2, 8, 9 ve 10 dahildir. Etkili (efektör) kaspazlar ise apoptotik sinyalin sonuçlarını yürütürler ve kaspaz 3, 6 ve 7 bu gruba dahildir.

2.4. Gen Ekspresyonu ve Apoptoz ile İlgili Genler

Moleküler biyolojinin Santral Dogması, genetik bilginin DNA'dan RNA'ya ve oradan da proteine akışını tanımlamaktadır. Bu sürecin merkezinde, genetik talimatları çekirdekteki DNA'dan sitozoldeki ribozomlara taşımak için mesajcı RNA (mRNA) moleküllerinin üretildiği mRNA sentezi yer almaktadır. mRNA kimyasal olarak DNA'ya benzer ve tek bir iplikçik olarak sentezlenmektedir (Berdanier ve Freake, 2005). Gen ifadesi, genlerden gelen genetik bilginin mRNA ara basamağı aracılığıyla proteinlere dönüştürülmesini ifade etmektedir. “Gen ifadesi” terimi genellikle mRNA ölçümleri ile birbirinin yerine kullanılmaktadır (Buccitelli ve Selbach, 2020).

mRNA ifadesi, çoklu seviyelerde düzenlenmekte olan karmaşık bir dizi koordineli olayı içermektedir. Bu seviyeler, genlerin başlatma, uzatma ve sonlandırma gibi süreçlerle RNA moleküllerine kopyalandığı transkripsiyonu içermektedir. Transkripsiyonu takiben, RNA hareketini, intronları çıkarmak için splicing'i ve RNA stabilitesini sağlamayı içeren posttranskripsiyonel düzenleme mevcuttur. RNA hazırlandıktan sonra, proteinlerin RNA'yı şablon olarak kullanarak sentezlendiği çeviri gerçekleşmektedir. Bu süreç translasyonun başlatılması, uzatılması ve sonlandırılmasını içermektedir. Son olarak, protein stabilitesini, lokalizasyonunu ve işlevselliğini etkileyen modifikasyonları ve süreçleri kapsayan posttranslasyonel düzenleme bulunmaktadır. Bu düzenleyici mekanizmalar mRNA ifadesini hassas bir şekilde kontrol ederek hücrelerin sinyallere yanıt vermesine ve çevrelerine uyum sağlamasına olanak tanımaktadır (Le Roch ve Winzeler, 2004).

Bu çalışma, başlıca apoptoz ile ilişkili genlerin ifadesini araştırmaktadır. Bu genler, *Bax*, *Bcl2*, *Tp53* ve *Casp3* genlerinden oluşmaktadır. Gen ifade verilerinin doğru karşılaştırmalarını ve normalizasyonunu sağlamak için yaygın olarak kullanılan evrensel referans geni *Gliseralehit-3-Fosfat Dehidrogenaz (Gapdh)* kullanılmıştır. *Gapdh*, mRNA ifade çalışmalarında yaygın olarak kullanılan bir referans genidir (Sikand vd., 2012). STRING veritabanında, **Şekil 2.8** *Bax*, *Bcl2*, *Tp53* ve *Casp3* genleri arasındaki yakın ilişkiyi göstermektedir.



Şekil 2.8 *Bax, Bcl2, Tp53 ve Casp3 Arasındaki Bağlantıyı Yansıtan STRING Çıktısı*

BAX geni, programlı hücre ölümünü regüle eden Bcl-2 gen ailesinin pro-apoptotik üyesidir (Brady ve Gil-Gómez, 1998). *BAX*, insanlarda *BAX* geni tarafından kodlanan bir proteindir. Bu protein, Bcl-2 ile bir heterodimer oluşturur ve apoptotik bir aktivatör olarak işlev görmektedir. *BAX* ekspresyonu apoptotik uyarı sonrası artmaktadır. Öldürme sinyali alındığında sitozolik *BAX* aktive olur ve mitokondriaya yerleşir, burada mitokondriyal dış membran permeabilizasyonu yani MOMP'a neden olarak sonunda hücre ölümüne gidecek hücresel olayları başlatmaktadır (Z. Dai ve Lai, 2019). Multidomain proapoptotik proteinlerden *BAX* ve *BAK*, MOMP'den sorumlu temel proteinlerdir ve hücre ölümünün yanı sıra mitokondriyal/disfonksiyonda da gereklidirler. *BAX*'dan yoksun hücrelerin, sitokrom c salınımına ve apoptoza karşı tamamen dirençli olduğu kanıtlanmıştır (Wei vd., 2001). *BAK* ağırlıklı olarak Bcl-xL, Mcl1 tarafından, ama *BAX* tüm antiapoptotik proteinler tarafından inhibe edilebilmektedir. *BID*, *BIM* ve *PUMA* gibi aktivatör tip BH3-proteinleri, apoptozu indüklemek için *BAX*'ın doğrudan fiziksel bağlanması ve aktivasyonu ile işlev görürken, *BAD*, *NOXA* ve *BIK* gibi sensitize edici BH3-proteinleri, aktivatörleri serbest bırakmak ve *BAX* aktivasyonu aracılı apoptozu indüklemek için antiapoptotik proteinlerini devreye sokar. Birkaç doğrudan *BAX* aktivatörünün, özgülüğün avantajları ve kemo ve radyodirencin üstesinden gelme potansiyeli ile kanser tedavisi için umut vaat ettiği tespit edilmiştir. Bu yeni ilaç adayları sınıfının daha fazla araştırılması, onları kanseri tedavi etmek için yeni bir araç olarak kliniğe sunumunda gerekli olacaktır.

BCL-2 geni, *BCL-2* gen ailesinin antiapoptotik üyesidir. Survival artırıcı birçok sinyal anti-apoptotik Bcl-2 yolağı kaynaklıdır (Siddiqui vd., 2015). Çalışmalar

bu genin ekspresyonunun apoptozisi önlediği ve oksidatif stresi azalttığı gösterilmiştir (Siddiqui vd., 2015). Apoptozisin başlamasının ER'dan Ca^{2+} 'un sitozole geçişi olduğu bilinmektedir (Yamane vd., 2005). İki antiapoptotik protein Bcl-2 ve Bcl-XL'in aşırı ekspresyonu ER içi Ca^{2+} miktarını azaltmaktadır, bunun da ER'dan Ca^{2+} 'un sitozole yavaş yavaş sızması ile olduğu gösterilmiştir (White vd., 2005). Bu iki proteinin aksine apoptotik BAX ve BAK proteinleri dinlenme halindeki ER Ca^{2+} konsantrasyonunu arttırarak stres sırasında sitozole çok miktarda Ca^{2+} çıkışına neden olurlar (White vd., 2005). BH3 only proteinlerinden Bik/Nbk'un BAX ve BAK bağlantılı olarak P53 uyarısı sonrası Ca^{2+} salınımını arttırdığı ile ilgili yayınlar vardır (Mathai vd., 2005). Apoptotik proteinlerden BIM, PUMA ve NOXA'nın da etkin olduğu gösterilmiştir (Rao vd., 2006; Szegezdi vd., 2008). Antiapoptotik Bcl-2 proteinlerinin proapoptotik üyeleri doğrudan heterodimerizasyon yoluyla inaktive ettiği iyi bilinen bir olgudur. Bu dimerizasyon olayları, antiapoptotik Bcl-2 aile üyelerinin BH3 bağlayan hidrofobik ceplerinin ve proapoptotik üyelerin BH3 domainlerinin etkileşimi yoluyla gerçekleşir.

Onkogenik strese yanıt olarak apoptozdan kaçınmak, karsinogenezin önemli bir özelliğidir. Ayrıca, hematolojik malignitelerde ve solid kanserlerde antiapoptotik Bcl-2 proteinlerinin aşırı ekspresyonunun, mitokondriyal veya ekstrinsik apoptotik yolların aktivasyonu yoluyla etki eden tedaviler bağlamında kemorezistansa yol açtığı gösterilmiştir (Sarosiek vd., 2013). Karsinogenez sırasında proapoptotik stresin üstesinden gelmek için antiapoptotik Bcl-2 proteinlerinin kanser hücreleri tarafından upregülasyonu, bu hayatta kalma sinyallerine bağımlılıklarına neden olmaktadır. Bu nedenle, antiapoptotik Bcl-2 proteinleri, kanser terapötikleri için önde gelen hedeflerdir (Pfeffer ve Singh, 2018a). Antiapoptotik Bcl-2 proteinleri iki hidrofobik alfa-heliks ve altı veya yedi amfipatik alfa-heliks içerir. Amfipatik alfa-heliksler, proapoptotik BCL-2 proteinlerinin BH3 alanı için bağlanma bölgesi olarak işlev gören hidrofobik oluğu oluşturur. Antiapoptotik BCL-2 proteinlerinin bu BH3 bağlayıcı oluğuna bağlanan küçük moleküller BH3 mimetik olarak tanımlanır. BH3 mimetik kavramı, BH3 only proteinlerini taklit edebilen ve böylece apoptozu indükleyebilen küçük moleküllerin gelişimini tetiklemiş, böylece kanser hastalarında tedavi umudu olmuştur (Timucin vd., 2019).

Sistein proteaz ailesinden olan kaspazlar, inflamasyon ve hücre ölümü gibi süreçleri kontrol eden bir enzim grubudur. Hücre içi ve dışı işlevleri olan bu enzimler

hücrede inaktiftirler, belirli moleküller etkisiyle etkinleştirilirler. Bunun nedeni; regüle olmayan kaspaz aktivitesinin hücre için ölümcül olmasıdır. Bu nedenle hücreler kaspazları zimojen denilen prekürsörler olarak depolamaktadır. Prokaspazlar aktif bölgelerinde katalitik sistein rezidülerinin bulunmasının yanında substratta aspartik asit rezidüsünün bulunması ile aktifleşerek peptit bağlarını hidrolize eden enzimlerdir (McIlwain vd., 2013). Üç farklı tip kaspaz mevcuttur: 1) Başlatıcı kaspazlar 2) İşlemci kaspazlar 3) İnflamatuar kaspazlar.

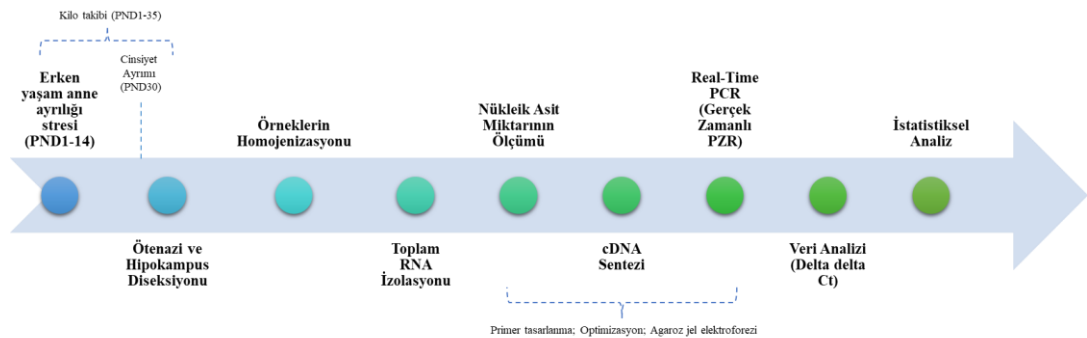
Casp3, hedeflerini aspartik asit kalıntılarından kesen sistein proteaz ailesinin bir üyesidir ve apoptoz yolunun önemli bir bileşenidir (Price vd., 2023). *Casp3*, *Casp6* ve *Casp7* ile beraber işlemci kaspaz olarak işlev yapmaktadır. İşlemci kaspaz türleri, başlatıcı kaspazlar tarafından kesilip prokaspaz monomerleri haline getirilir. İşlemci kaspazların birisi etkinleştiğinde diğer infazcı enzimleri de kesebilir veya etkinleştirebilir. Bu yönüyle infazcı enzimler kendi içlerinde geri besleme işlevleriyle süreci kontrol altında tutarlar.

Tp53, hücre döngüsünde ve apoptozda kontrol noktası proteindir. Bu protein, hücredeki DNA hasarını algılamakta ve hasarın tamir edilemediği durumlarda hücreyi apoptoza yönlendirmektedir. Hem iç hem de dış apoptoz yollarında görev almakta ve hücre ölümü süreçlerini düzenlemektedir. DNA hasarı, özellikle hücre döngüsünün G1 evresinde tespit edildiğinde, *Tp53* DNA sentezini durdurmaktadır. Bu durdurma işlemi, hasarın onarılabilmesi için hücreye zaman tanımaktadır. Eğer hasar onarılamazsa, *Tp53* iç yolda Bax ekspresyonunu artırmaktadır. Bax, Noxa ve Puma proteinlerini aktif hale getirerek Bcl-2 ve BclXL proteinlerini baskılamakta ve hücreyi apoptoza yönlendirmektedir. Bu süreçte sitokrom c (Sit-C), Apaf-1, prokaspaz-9 ve kaspaz 9 aktivasyonu da gerçekleşmektedir. *Tp53*'ün aktivasyonu, Mdm2'nin baskılanmasını ortadan kaldırmaktadır. Normalde Mdm2, *Tp53*'ü ubiquitinleyerek onun yıkımını sağlamakta, ancak *Tp53*'ün artışıyla bu baskılama engellenmektedir. Ayrıca, *Tp53* PTEN artışına neden olmaktadır. PTEN, bir tümör baskılayıcı proteindir ve PI3K-Akt yolunu inhibe etmektedir. Dış yolda ise *Tp53*, Fas ve DR5 reseptör genlerini indüklemektedir. Bu reseptörler, hücre yüzeyinde apoptoz sinyallerinin alınmasında rol oynamakta ve hücre ölümüne katkı sağlamaktadır. Bu şekilde, *Tp53* hem iç hem de dış yollarda apoptoz süreçlerini düzenleyerek hücre sağlığını ve genetik bütünlüğü korumaktadır.

Genlerin mRNA ifade seviyelerini incelemek için, *BALB/c* farelerini kullanan bir hayvan modeli kullanılmıştır. *BALB/c* fareleri albinodur ve beyaz deri tüyleriyle pembe gözlere sahiptirler. Bunlar inbred bir soydan gelir ve biyomedikal araştırmalarda en yaygın kullanılan beş inbred soy arasındadır (Nakamura, 2013). *BALB/c* fare soyunun stres tepkisine hassasiyeti, kronik stresin sağlık üzerindeki etkilerini incelemek için önemli bir model olarak kabul edilmektedir (Okamura vd., 2022).

Bir araştırmada, olgun bir yetişkin C57BL6/J faresi 3-6 ay arasında (bu analizde 20-30 insan yılına eşdeğer), orta yaşlı bir fare 10-14 ay arasında (38-47 insan yılına eşdeğer) ve yaşlı bir fare 18-24 ay arasında (56-69 insan yılına eşdeğer) olarak tanımlanmıştır (Flurkey vd., 2007). Olgun yetişkin fare, gelişimin durduğu ancak yaşlanmanın henüz başlamadığı bir aşamayı temsil eder. Bu yaklaşımı kullanarak, bir yetişkin hastalığı modeli için minimum 12 hafta olmalıdır (Jackson vd., 2017).

Erken yaşam stresi ile psikiyatrik ve fiziksel sonuçları arasındaki ilişkileri araştırmak için en yaygın kullanılan hayvan modeli, tekrarlanan anne ayrımıdır. Bu prosedür, sıçan veya fare yavrularının doğum sonrası gün (PND) 1 veya 2'de başlayıp PND 14 veya 21'e kadar devam edecek şekilde, çoğunlukla her gün 3-6 saat süreyle annelerinden tekrar tekrar ayrılmasını içerir. Bu ayrılma dönemleri sırasında, çalışmaların yaklaşık %35-%40'ı yavruları birbirinden de ayırır; bu birleşik ayrılma bazen erken yoksunluk olarak adlandırılmaktadır (Pryce ve Feldon, 2003). Bu çalışmada anneden ayrılığı (MS) modeli kullanılmıştır. Araştırma bulgularının kapsamlı bir şekilde anlaşılmasını sağlamak ve önemli noktaları vurgulamak için **Şekil 2.9** çalışmanın genel bir özetini sunmaktadır.



Bu çalışmadaki maternal stres prosedürü, maternal ayrılma, maternal zorunlu yüzme testi ve maternal kısıtlama stresi gibi birkaç modeli içermektedir. Kısıtlama stresi, hayvanlarda fizyolojik tepkileri indüklemek için kullanılan bir tekniktir ve hareketlerini sınırlayarak fizyolojik yanıtları indüklemeyi amaçlamaktadır. Kısıtlama stresinin dikkate değer bir yönü, öncelikle psikolojik bir stres unsuru olarak hareket etmektedir; burada kısıtlamanın neden olduğu fiziksel rahatsızlık, organizmanın serbestçe hareket edememe durumunun bilişsel değerlendirmesinin ikincil sonucunu oluşturmaktadır. Bu stres indükleme yönteminin popülerliği, nispeten düşük maliyeti ve teknik gereksinimleri nedeniyle yüksektir. Ayrıca, kısıtlama stresi, kısıtlama süresi, kısıtlama seansı sayısı, seanslar arasındaki aralıkların değiştirilmesi ve kısıtlamadan önce yiyecek alımının veya yoksunluğunun manipüle edilmesi gibi parametrik ayarlamalara izin vermektedir. Ayrıca, çeşitli metodolojiler, nörobilim de dahil olmak üzere farklı disiplinlerden araştırmacıların özel ihtiyaçlarını karşılamak üzere geliştirilmiştir (Servatius vd., 2007).

Zorunlu Yüzme Testi (FST), özellikle depresyonla ilişkili parametreleri değerlendirmek için tasarlanmış yaygın olarak kullanılan bir deneysel paradigmadır (Noland, 2015). Porsolt ve arkadaşları, Zorunlu Yüzme Testi'ni sıçanlarda ve farelerde antidepresan bileşiklerin etkilerini değerlendirmek amacıyla geliştirmiştir. Bu testte, sıçan veya fare, kaçışı olmayan bir su kabına yerleştirilir; genellikle silindirik bir yapı kullanılır. Belli bir süre boyunca kaçmaya çalıştıktan sonra, sıçan veya fare genellikle hareketsiz bir pozisyon alır (Porsolt vd., 1977).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Veri Toplama Araçları

3.1.1. Cihaz ve Aletler

1. Ultrasonik Doku Homojenizatörü (Bandelin SONOPLUS *ultrasonic homogenizer* HD 2070, Berlin, Almanya)
2. Rotor-Gene Q (Qiagen, Almanya)
3. Soğutmalı Santrifüj Microfuge 20R (Beckman Coulter, ABD)
4. T100 Thermal Cycler PCR (Bio-Rad, Kaliforniya, ABD)
5. Vorteks (SciLogex, ABD)
6. Mini Santrifüj (Isolab, Almanya)
7. Soğuk Blok (Qiagen, Almanya)
8. Mikropipet (Gilson, Fransa)
9. NanoDrop 2000c (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, ABD)
10. -20 °C Dondurucu (Uğur, Türkiye)
11. -80 °C Dondurucu (Sanyo, Japonya)
12. Otoklav (Nüve, Türkiye)
13. Hassas Terazî
14. PowerPac™ Temel Elektroforez Güç Kaynağı (Bio-Rad, Kaliforniya, ABD)
15. Owl™ EasyCast™ B2 Mini Jel Elektroforez Sistemleri (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, ABD)
16. Vilber Jel Görüntüleme Sistemi (Vilber Lourmat, France)
17. Cam kavanoz
18. Termometre
19. Köpük Standı
20. Cerrahi makas
21. Azot tankı

3.1.2. Malzeme ve Reaktifler

1. Eppendorf tüp 1,5 mL (Eppendorf AG, Almanya)
2. PCR tüp (0,2 mL)
3. Falcon tüp (50 mL)
4. Cryo tüp (2 mL)
5. Filtreli mikropipet ucu (10-100-1000 µL)
6. Kloroform (Merck, Darmstadt, Almanya)
7. Etanol (Merck, Darmstadt, Almanya)
8. İzopropanol (Merck, Darmstadt, Almanya)
9. Ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA)
10. Nükleaz içermeyen su (Lonza, İsviçre)
11. SeaKem® LE Agaroz (Lonza, İsviçre)
12. NucleoGene Tri Reagent Lizis Reaktif (NucleoGene, Türkiye)
13. HiScript II 1st Strand cDNA Sentez Kiti (Vazyme, Çin)
14. Primer (Gensutek Sağlık Teknolojileri, Türkiye)
15. ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix (Vazyme, Çin)
16. TBE Tamponu (Tris-Borate-EDTA) (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, ABD)
17. DNA Jel Yükleme Boyası (6X) (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, ABD)
18. 50 bç DNA Ladder (BioLabs, ABD)
19. Etidyum bromür (Merck, Almanya)
20. Sodyum hidroksit (NaOH) 1M

3.2. Yöntem

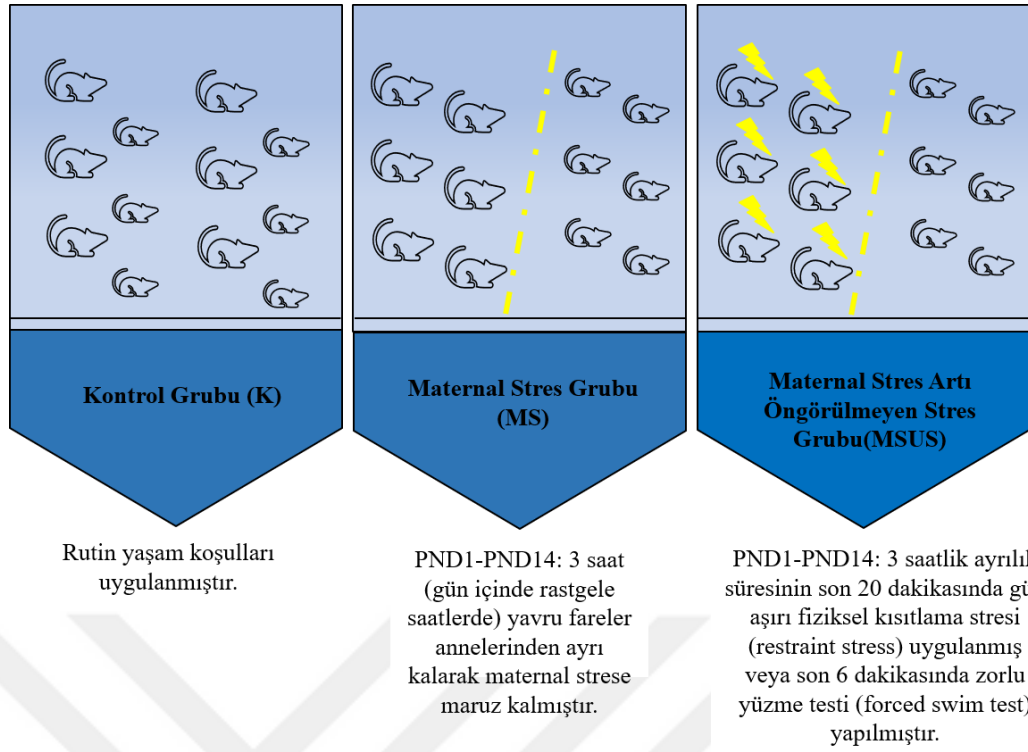
Çalışmamız Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Yetiştirme ve Araştırma Laboratuvarında uygun koşullarda barındırılan *BALB/c* türü fareler ile gerçekleştirilmiştir. mRNA ifadesi çalışmaları, örneklerin homojenizasyonu, total RNA izolasyonu, total RNA ölçümü, cDNA sentezi, qPCR amplifikasyonu ve agaroz jel elektroforezi işlemlerini içermekte olup, bu işlemler Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Merkez Araştırma Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde gerçekleştirilmiştir.

3.2.1. Fareler ve Yaşam Koşulları

Çalışmamızda *BALB/c* ırkı fareler kullanılmıştır. Bu fareler, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Yetiştirme ve Araştırma Laboratuvarı'nda en uygun koşullarda barındırılmıştır. Kullandığımız fareler, minimum 180 cm² kafes alanı ve minimum 12 cm² kafes yüksekliği şartlarında doğumlarından itibaren tüm ihtiyaçları karşılanacak şekilde barındırılmıştır. Farelerin hayatta kalması için en uygun yaşam şartları olan 20-24°C yaşam alanı sıcaklığı ve %45-70 nisbi nem miktarı sağlanmıştır. (Etik Kurul Numarası: 2023-3-20)

3.2.2. Maternal Stres Deneyi

Çalışmaya her grupta 6 adet olmak kaydıyla 8 haftalık *BALB/c* ırkı gebe dişi fareler ile başlanmıştır. Çalışma, kontrol grubu, beklenmeyen zamanda anne ayrılığına maruz kalan grup (MS) ve beklenmeyen zamanda anne ayrılığına ek olarak annesi öngörülme- yen strese maruz kalan grup (MSUS) olmak üzere üç gruptan oluşmaktadır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1 Çalışmadaki Grupların Şematik Olarak Gösterimi

Her dişi fare bireysel olarak bir kafese yerleştirilmiş ve erkek fare ile çiftleştirilmiştir. Çiftleşmeden birkaç gün sonra, erkek fareler kafeslerden çıkarılmış ve dişi fareler gebelik süresince kafeste yalnız bırakılmıştır. Tüm gruplar için kafes temizliği haftada bir kez yapılmıştır. Kontrol grubu, kafes temizliği ve ağırlık takibi dışında minimal bir müdahaleye tabi tutulmuştur. PND1'den PND14'e kadar yaşamın erken döneminde, MS ve MSUS gruplarındaki anne fareler ve yavruları öngörülme anne ayrılığına maruz bırakılmıştır (Franklin vd., 2011; Gapp vd., 2014; Weiss vd., 2011). Yavrularından ayrılan MS grubu anneler, gün içinde rastgele olarak üç saat boyunca temiz bir kafeste yavrularını görebilecekleri şekilde bekletilmiştir. Ancak, yavrularından ayrılan MSUS grubu annelere bu üç saatlik sürenin son 20 dakikasında fiziksel kısıtlama stresi (*restraint stress*) veya üç saatlik sürenin son 6 dakikasında zorunlu yüzme testi (*forced swim test*) uygulanmıştır. MSUS grubu annelere uygulanan öngörülme stres, zorunlu yüzme testi ile başlayıp bir sonraki gün kısıtlama stresi ile devam etmiştir. PND1'den PND14'e kadar gün aşırı olarak öngörülme stres devam etmiştir. Bu süreçte annelere yem ve su kısıtlaması uygulanmamıştır ve yavrular laktasyon döneminde annelerinden süt emmeye devam etmişlerdir. Üç saatlik öngörülme anne ayrılığının saatleri **Tablo 3.1**'de sunulmuştur.

Tablo 3.1 Öngörülmeven Anne Ayrılığı Süresi

PND (<i>Postnatal</i> <i>Days</i>)	Ayrılma Zamanı Başlangıcı	Ayrılma Zamanı Bitişi	Toplam Süre (Saat)
1	13.00	16.00	3
2	13.00	16.00	3
3	11.30	14.30	3
4	11.10	14.10	3
5	10.00	13.00	3
6	08.00	11.00	3
7	08.00	11.00	3
8	12.00	15.00	3
9	10.00	13.00	3
10	11.00	14.00	3
11	08.00	11.00	3
12	12.00	15.00	3
13	08.00	11.00	3
14	13.00	16.00	3

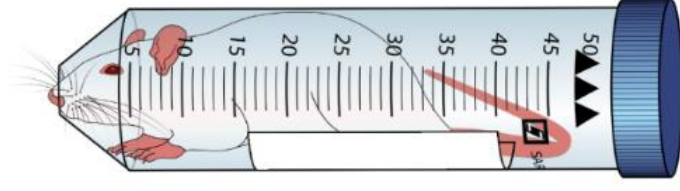
Zorunlu Yüzme Testi (*Forced Swim Test*): MSUS annelere uygulanan öngörülmeven streslerden biri, üç saatlik anne ayrılığı uygulamasından sonra yapılan zorunlu yüzme testidir. MSUS anne fareler, üç saatlik sürenin son altı dakikasında cam kavanoz içinde 18°C'lik suda yüzmeye zorlanmıştır (**Şekil 3.2 A, B**). Cam kavanozdaki su seviyesi, farelerin kapasitesinin yaklaşık dörtte üçü kadar olarak ayarlanmıştır.

A**B**

Şekil 3.2 Zorunlu Yüzme Testi (A, B)

Fiziksel Kısıtlama Stresi (Restraint Stress): MSUS annelere uygulanan öngörülme stresslerinden biri, üç saatlik anne ayrılığı uygulamasından sonra fiziksel kısıtlama stresidir. MSUS anne farelere, üç saatlik sürenin son 20 dakikasında fiziksel kısıtlama stresi uygulanmıştır. MSUS anne fareler hava almasını sağlayacak şekilde delinmiş olan 50 ml hacimli Falcon tüp içinde bekletilmiştir. Falcon tüpleri, sabitleme için özel olarak tasarlanmış köpük standı kullanılarak yerleştirilmiştir (Şekil 3.3 A, B).

A



B



Şekil 3.3 Fiziksel Kısıtlama Stresi (A,B)

3.2.3. Kilo Takibi

Fareler, doğum sonrası 1. günden itibaren (PND1) her beş günde bir olmak üzere PND35'e kadar hassas terazi kullanılarak tartılmıştır. Yavrular için bireysel ağırlık takibi PND10'da başlamıştır. Yavrulara sayısal tanımlayıcılar atamak için tırnakları uygun şekilde kesilmiştir. Özellikle, ilk yavru için sol arka pençedeki beşinci parmağın tırnağı, altıncı yavru için sağ arka pençedeki ilk parmağın tırnağı kesilmiş ve bu sistematik model izlenerek devam edilmiştir.

3.2.4. Farelerden Örneklerin Elde Edilmesi

PND30 günlük yavrularda cinsiyet ayrımı yapılmıştır. Cinsiyet ayrımı yapıldıktan sonra PND35. günde yavrulardan hipokampus örnekleri alınmıştır. Her gruptan 12 dişi ve 12 erkek olmak üzere toplamda 72 yavru fare alınmıştır.

Hipokampusun Çıkarılması ve Homojenizasyonu

1. PND35'te farelere etik kurallara uygun olacak şekilde servikal dislokasyon ile ötenazi uygulanmıştır.
2. Fareler dorsal görünümde konumlandırılmıştır. İki göz arasındaki bölge makas kullanılarak dikkatlice kesilmiş ve kesi kulakların yakınına kadar uzatılmıştır. Kafatası bölgesi ortaya çıkarıldıktan sonra, frontonazal sütür kesilmiş ve parietal bölgenin sonuna kadar başın her iki yanından devam edilmiştir. Bu işlem, beynin tamamına zarar vermemek için titizlikle gerçekleştirilmiştir. Daha sonra, kesilen kafatasının ön kısmı makasla kavranarak nazikçe arkaya doğru kaldırılmıştır.
3. Beynin tamamı dikkatlice kafadan çıkarılmış ve alüminyum folyoya sarılmış bir buz aküsü üzerine yerleştirilmiştir.
4. Beyincik disekte edilmiştir.
5. Daha sonra, ince forsepsler kullanılarak hipokampusu çıkarmak için beyin yarımküreleri nazikçe ön beyne doğru kaldırılmıştır.
6. Fareler arasında doku çapraz kontaminasyonunu en aza indirmek için cerrahi aletler dokular arası her geçişte %75 etanol ile temizlenmiştir.
7. Elde edilen hipokampus dokusu bir Cryo tüpüne yerleştirilmiş ve hemen azot tankına atılmıştır. Total RNA izolasyon gününe kadar -80 °C buz dolabında saklanmıştır.
8. Total RNA izolasyon gününde, örnekler kademeli olarak -80 °C buz dolabından çıkarılmış ve 500 mL NucleoGene Tri Reagent Lizis Reaktif (NucleoGene, Türkiye) içeren Eppendorf tüpüne aktarılmıştır.
9. Doku, ultrasonik doku homojenizatörü (Bandelin SONOPLUS ultrasonik homojenizatör HD 2070, Berlin, Almanya) kullanılarak homojenize edilmiştir. Bu aşamada soğuk blok kullanılmıştır.
10. Örnekler arasındaki çapraz kontaminasyonu engellemek için, homojenizatörün uç kısmı, her numune arasında 0,5M Sodyum Hidroksit (NaOH), %75 etanol (iki

kez), otoklavlanmış su ve nükleaz içermeyen su bulunan Eppendorf tüplerden seri şekilde geçirilerek ve beraberinde bir kaç atış yapılarak temizlenmiştir.

3.2.5. Total RNA İzolasyonu

Total RNA izolasyonu, NucleoGene Tri Reagent Lizis Reaktifi (NucleoGene, Türkiye) kullanılarak Fenol-kloroform yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. İzolasyon yapılırken aşağıdaki prosedür takip edilmiştir.

Örnek Homojenizasyonu ve Faz Ayrımı

1. Doku parçalanması aşamasında NucleoGene Tri Reaktifi (NucleoGene, Türkiye) içinde homojen bir şekilde dağılan örnekler iyice vortekslenmiştir.
2. İyice vorteks yapıldıktan sonra, 100 µL Kloroform eklenip 15 sn vorteks yapılmıştır.
3. Örnekler oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edilmiştir.
4. Örnekler 12,000 x g'de 15 dakika boyunca 4 °C'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminden sonra üst aköz faz ile alt organik faz arasında belirgin sarımsı-beyaz bir ara faz görülür. RNA, bu arafazın üstündeki şeffaf aköz fazında yer almaktadır.
5. Aköz faz dikkatlice mikropipetle yeni bir 1,5 mL'lik Eppendorf tüpüne transfer edilmiştir.

RNA Presipitasyonu

6. Aköz fazın üzerine 500 µL izopropanol eklenmiştir. Kısa vorteks yapıldıktan sonra -20 °C'de 10 dakika boyunca inkübe edilmiştir. Tüpler, her 3 dakikada bir alt-üst edilmiştir.
7. Örnekler 12,000 x g'de 10 dakika boyunca 4 °C'de santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra çökelmiş RNA'yı temsil eden beyaz bir pellet oluşmuştur. Pelletin büyüklüğü ve görünürlüğü, RNA'nın konsantrasyonuna bağlı olarak değişiklik gösterebilir. Süpernatant daha sonra dikkatlice atılmıştır.

RNA Yıkama

8. Pellete 1 mL %75 Etanol eklenmiştir. Pelletin alt kısmından kalkmasını sağlamak için kısa vorteks yapılmıştır.
9. Örnekler 7,500 x g'de 5 dakika boyunca 4 °C'de santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılmıştır.
10. Tekrar pellete 1 mL %75 Etanol eklenip kısa vorteks yapılmıştır.
11. 7,500 x g'de 5 dakika boyunca 4 °C'de santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılmıştır.
12. Tüpler, kapakları açık olacak şekilde, alkol uçana kadar oda sıcaklığında 5 dakika boyunca inkübe edilmiştir.

RNA Çözünmesi

13. Pellet 50 µL of nükleaz içermeyen su (NFW) ile çözülmüştür ve ardından tüpler soğuk bloğa alınmıştır. Pellet homojen bir şekilde çözünmesini beklenmiştir.
14. NanoDrop 2000c (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, ABD) kullanılarak RNA konsantrasyon ölçümü yapılmıştır.

3.2.6. Nükleik Asit Miktar ve Kalite Ölçümü

RNA saflığı ve konsantrasyonu, NanoDrop 2000c spektrofotometre (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, ABD) kullanılarak aşağıdaki prosedüre göre ölçülmüştür:

1. Ölçüm ekipmanı, mikropipet ve bench, %75 Etanol ile sterilize edilmiştir.
2. Cihaza bağlı bilgisayarda bulunan NanoDrop 2000c spektrofotometre yazılımı başlatılmıştır.
3. Ana menüden Nükleik Asit seçeneği seçilmiştir. Bu süreçte, cihazın numune yüklenen kolunun kapalı durumda olduğundan emin olunmuştur. Rutin verifikasyon başlatılmıştır.
4. Ölçülecek numunenin RNA tipi “Type” seçeneğinden belirlenerek, ng/µL konsantrasyon birimi seçilmiştir.
5. Bikromat normalizasyonunda 340 nm dalga boyu kullanılmıştır. Baseline koreksiyonu seçeneği işaretlenmiştir.

6. "Add to report" kutusu işaretlenmiştir.
7. Cihazı temizledikten sonra, alt kaide üzerine 1,5 µL NFW damlatılmıştır. Kaide kolu kapatıp kör ölçümü (*Blank*) yapılmıştır.
8. Ölçüm sonucu belirlenen klasöre kaydedilmiştir. Kör ölçümü işleminden sonra kaideleri kuru ve tüy bırakmayan laboratuvar havlusuyla silerek ilk örneğin RNA ölçümü için hazırlanmıştır.
9. Her bir örnek için "*Sample ID*" belirlenmiştir. Örneğin homojen ve iyi karıştırılmış olduğundan emin olunmuştur. Alt kaide üzerine 1,5 µL numune damlatıp kaide kolu kapatılmıştır. Ardından ölç seçeneği seçilmiştir. Sonuç çıktıktan sonra, bir sonraki örnek eklenmeden önce hem üst hem de alt kaideler saf su ile temizlenerek önceki numunelerdeki kalıntılar uzaklaştırılmıştır. Yaklaşık 30 dakika ölçüm süresinden sonra bir kör ölçümü yapılmıştır.
10. Hipokampus örneklerinin RNA konsantrasyonu 1 pg ile 1 µg arasında değişmektedir ve bu aralıkta cDNA sentezi için uygun oldukları gösterilmiştir.
11. Örneklerimizde 260/280 oranı genel olarak 2,0 veya daha yüksek bulunmuştur. 260/230 oranı ise genel olarak 1,8-2,2 aralığında bulunmuştur. Protein kontaminasyonu tespit etmek için 260/280 oranı hesaplanmıştır. Tuzlar, EDTA, iyonik olmayan deterjanlar, proteinler ve fenol kontaminasyonu tespit etmek için 260/230 oranı hesaplanmıştır.

3.2.7. cDNA Sentezi

cDNA sentezi, HiScript II 1st Strand cDNA Sentez Kiti (Vazyme, Çin) kullanılarak firmanın önerdiği protokole göre yapılmıştır. Her örnek için toplam 1 µg RNA kullanılmıştır. Hipokampustan RNA izole edilen örnekler için reaksiyon karışımı **Tablo 3.2**'ye göre hazırlanmıştır.

Tablo 3.2 *Hipokampustan RNA İzole Edilen Örnekler İçin Karışım Miktarları*

İçindekiler	Her bir örnek için
2x RT Mix	10 µL
HiScript II Enzyme Mix	2 µL
Oligo-(dT)23 VN (50 µM)	1 µL
Random hexamers (50 ng/µl)	1 µL
Total RNA	4 µL
Nükleaz içermeyen su	2 µL
Son hacim	20 µL

Tüm hazırlık işlemleri soğuk blok üzerinde gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon karışımı hazırlandıktan sonra örnekler, T100 Thermal Cycler PCR (Bio-Rad, Kaliforniya, ABD) cihazına yerleştirilmiştir ve **Tablo 3.3**'te belirtilen programa göre cihazda inkübe edilmiştir. Elde edilen cDNA örnekleri, seyreltme işlemi uygulanmadan -20°C'de muhafaza edilmiştir.

Tablo 3.3 *cDNA Sentezi İçin PCR Programı*

Sıcaklık	Süre
25 °C	5 dk
50 °C	15 dk
85 °C	2 dk
4 °C	∞

3.2.8. qRT-PCR Tekniği ile mRNA Ekspresyonu

qRT-PCR analizi, Rotor-Gene Q (Qiagen, Almanya) ve 2x ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix (Vazyme, Çin) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon karışımı, cDNA eklenmeden **Tablo 3.4**'e göre hazırlanmıştır. Reaksiyon karışımı 0.2 mL'lik PCR tüplere dağıtıldıktan sonra üzerine NFW ile 5 kat seyreltilmiş cDNA eklenmiştir. Hazırlanan örnekler Rotor-Gene Q (Qiagen, Almanya) cihazına yerleştirilip **Tablo 3.5**'te bulunan programa göre çalışma başlatılmıştır. Amplifikasyon için **Tablo 3.6**'da listelenen gen-spesifik primer çiftleri kullanılmıştır. qRT-PCR

deneylerinde kullanılan primer çiftleri, primer tasarlama yazılımları ve çeşitli moleküler veritabanları kullanılarak tasarlanmıştır.

Primerlerin büyüklüğünü doğrulamak için, bölüm 3.2.9.'da (**Agaroz Jel Elektroforezi**) belirtildiği gibi elektroforez gerçekleştirilmiştir. Elektroforez sonucu **Şekil 3.4**'te gösterilmiştir.

Tablo 3.4 *qRT-PCR Çalışması İçin Gerekli Malzemeler Ve Miktarları*

İçindekiler	Her bir örnek için
2 × ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix	10 µL
Forward and Reverse Primer Mix (10 µM)	0,8 µL
Nükleaz içermeyen su	6,2 µL

Öncelikle, her bir tüpe 17 µL reaksiyon karışımı dağıtılmıştır ve sonrasında reaksiyon karışımı üzerine 3 µL 1:5 oranında seyreltilmiş cDNA eklenerek toplamda 20 µL qPCR karışımı hazırlanmıştır. Rotor-Gene Q cihazına **Tablo 3.5**'teki program kurulmuştur ve çalışma başlatılmıştır. Her bir örnek çift çalışılmıştır. *Housekeeping* gen olarak *Gapdh* kullanılmıştır. Real-time PCR çalışması bitince Rotor-Gene Q Series Software kullanılarak hem *Quantification* (Miktar ölçümü) hem de *Melting Curve* (Erime eğrisi) analizi yapılmıştır. Uygun eşik değeri tespiti yapıldıktan sonra örneklerle ilişkin *Cycle Threshold* (Ct) değerleri alınmıştır.

Tablo 3.5 *qRT-PCR İçin Kullanılan Program*

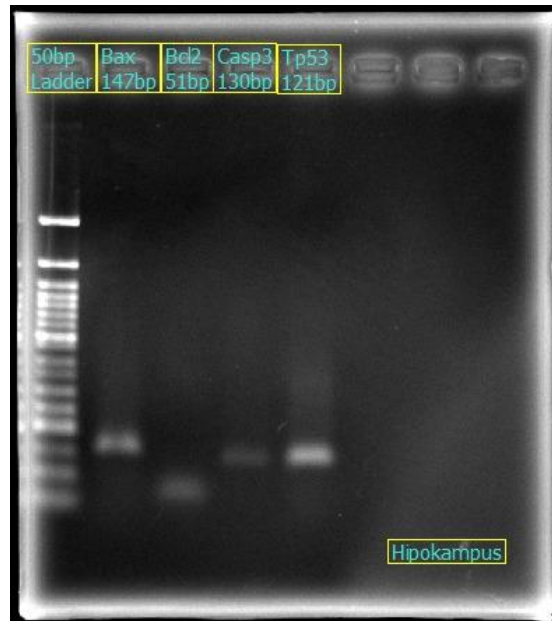
Parametreler		Değerler				
Run	Two Steps with Melt					
Örnek hacmi	20 µL					
Termal döngü profilleri	Step	Hold	Cycling			Melt
			45 döngü			
			Denaturation	Annealing, Extension		
				Gapdh	Bax, Bcl2, Casp3, Tp53	
	Süre	30 s	10 s	30 s	30 s	90 s (First step) 5 s (next steps)
	Sıcaklık (°C)	95	95	60	58	Ramp from 65 °C to 95 °C

Tablo 3.6 Primerlerin Dizisi ve Çoğaltılan Bölgenin Büyüklüğü

Gen Adı	Gen ID	Forward Primer	Reverse Primer	Ürün Büyüklüğü (baz çifti)
<i>Gapdh</i>	14433	CTCTCTGCTCCTCCCTGTTC	TACGGCCAAATCCGTTTACA	105 bç
<i>Bax</i>	12028	TTTGCTACAGGGTTTCATCCA	ATATTGCTGTCCAGTTCATCTCC	147 bç
<i>Bcl2</i>	12043	CTGGGATGCCTTTGTGGAAC	TCAAACAGAGGTCGCATGCT	51 bç
<i>Casp3</i>	12367	CAGCACCTGGTTACTATTCTG	TTCCTGTTAACGCGAGTGAG	130 bç
<i>Tp53</i>	22059	CAACAGCTCCTGCATGGGGGGC	AGGACAGGCACAAACACGAACC	121 bç

3.2.9. Agaroz Jel Elektroforezi

1. 1x TBE (Tris-Borate-EDTA) tamponu ve 2 g agaroz tozu kullanılarak %2'lik agaroz jel hazırlanmıştır.
Jeli hazırlamak için, 2 g agaroz tozu hassas terazide tartılmış ve behere aktarılmıştır. Üzerine 100 mL 1x TBE tamponu eklenerek karıştırılmıştır.
2. Karışım, agaroz tamamen çözülene kadar (yaklaşık 4 dakika) ara sıra karıştırılarak mikrodalga fırında ısıtılmıştır.
3. Agaroz çözeltisi yaklaşık 60 °C'ye kadar soğuduktan sonra, taraklı bir jel kalıp tepsisine dökülmüştür. Baloncuk oluşumunu önlemek için özen gösterilmiştir.
4. Jel, oda sıcaklığında yaklaşık 20-30 dakika boyunca katılaşmaya bırakılmıştır.
5. Katılaşma tamamlandıktan sonra, tarak nazikçe çıkarılmış ve jel, 1x TBE tamponu içeren elektroforez tankına yerleştirilmiştir.
6. Örnekler, 6x DNA yükleme boyası ile karıştırılmıştır. 50 bç DNA Ladder ile kuyucuklara yüklenmiştir.
7. Örnekler 120 V'da koşturulmuştur.
8. 45 dakika sonra elektroforez sonlandırılmış ve UV görüntüleme cihazı kullanılarak görüntüleme yapılmıştır. Bantların büyüklükleri **Şekil 3.4**'te sunulmuştur.



Şekil 3.4 *Jel Görüntüsü*

3.2.10. Veri Değerlendirmesi

Örneklerin qPCR cihazından elde edilmiş Ct (cycle threshold) değerleri Excel formatına taşınmıştır. Normalizasyon için kontrol grubunun Ct değerlerinin geometrik ortalaması alınarak elde edilen değer kalibratör olarak seçilmiştir. Delta delta Ct ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) yöntemi (Şekil 3.5) kullanılarak veriler analiz edilmiştir.

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-(Ct_{target} - Ct_{ref}) - (Kontrol\ Grubu\ Ct_{target}\ Ortalaması - Kontrol\ Grubu\ Ct_{ref}\ Ortalaması)}$$

Şekil 3.5 Delta-delta Ct ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) Yöntemi

3.2.11. İstatistiksel Analizler

Veri analizi GraphPad Prism 9.1.0 (GraphPad Software, Kaliforniya, ABD) yazılımı ile yapılmıştır. Verilerin dağılımına histogram, q-q plot, and Shapiro-Wilk testi ile bakılmıştır. Uç noktalar (*Outliers*) varsa David C. Hoaglin ve Boris Iglewicz (Hoaglin ve Iglewicz, 1987) çalışmasına esasen çalışmadan çıkarılmıştır. İki grup arası verilerin karşılaştırılmasında bağımsız t-testi ve Mann-Whitney U testleri kullanılmıştır. Üç ve daha çok gruptan oluşan kıyaslamalarda ANOVA veya Kruskal-Wallis testi kullanılmıştır. Anlamlı olma durumunda Tukey HSD veya Dunn's çoklu karşılaştırma testi kullanılmıştır. Ağırlığı üzerindeki stres uygulaması ve zaman etkisini değerlendirmek için iki yönlü tekrarlı ölçümlü varyans analizi (ANOVA) kullanılmıştır. Veriler arası ilişki Pearson veya Spearman korelasyon ile değerlendirilmiştir. Özet istatistik olarak birim sayısı (n), yüzde (%), ortalama, ortanca, IQR (*interquartile range*) ve standart sapma değerleri verilmiştir. $p < 0,05$ anlamlılık düzeyi kabul edilmiştir. Grafiklerin yapımında GraphPad Prism 9.1.0 software (GraphPad Software, Kaliforniya, ABD) yazılımları kullanılmıştır.

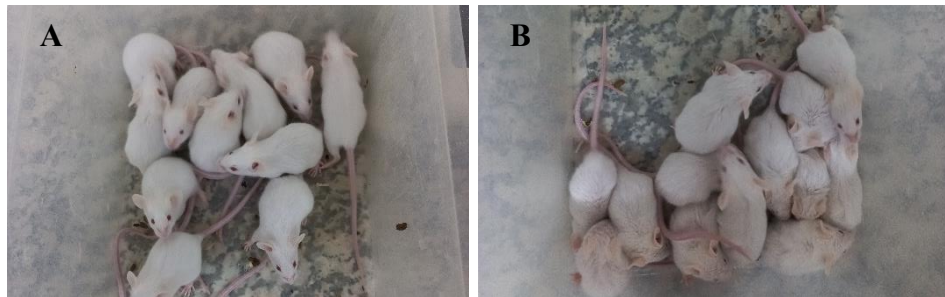
4. BULGULAR

Kontrol grubu (n=6), MS grubu (n=6) ve MSUS grubu (n=6) gebe *BALB/c* ırkı fare kullanılarak deneye başlanmıştır. Her bir gruptan 12 erkek ve 12 dişi yavru olmak üzere toplamda 24 yavru kullanılmıştır. Anneler çalışmaya dahil edilmemiştir. Toplam 72 yavru fare mRNA ekspresyon çalışması için kullanılmıştır. Her grubun yavruları doğumdan sonra 5'şer gün ara ile 35 gün boyunca tartılarak kilo takibi verileri elde edilmiştir. Fareler PND35. günde sakrifiye edilmiştir. Strese maruz kalmış farelerde gözlemlenen tüy yapısındaki bozukluk ve kafa tasındaki kemikleşme gecikmesi gibi fenotipik bulgular değerlendirilmiştir.

4.1. Farelerdeki Fenotipik Bulgular

MS ve MSUS gruplarındaki yavruların gelişim açısından kontrol grubuna göre daha geride olduğu gözlemlenmiştir. Kontrol grubuna kıyasla öngörülmeven anne ayrılığı stresine maruz kalan farelerde fenotipik farklılıklarla ilgili aşağıdaki gözlemler yapılmıştır.

Genel Tüy Yapısı: Stres grubundaki farelerde, kontrol grubuna kıyasla tüy gelişiminde belirgin farklılıklar gözlenmiştir. Strese maruz kalan farelerde tüy yapısının daha seyrek olduğu ve tüy renginin kontrol grubundaki farelere (Şekil 4.1 A) kıyasla daha soluk olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.1 B).



Şekil 4.1 A) Kontrol grubu B) Stres grubu

Kafatası Kemik Yapısı: Fareler sakrifiye edildikten sonra, kontrol grubuna ait farelerin kafatasları makasla kesildiğinde sertlik gösterdiği gözlenmiştir. Bu durum,

kemikleşmenin yeterli olduğunu düşündürmüştür. Öte yandan, MS ve MSUS gruplarındaki farelerin kafataslarının daha elastik olduğu ve tam kemikleşmediği gözlemlenmiştir.

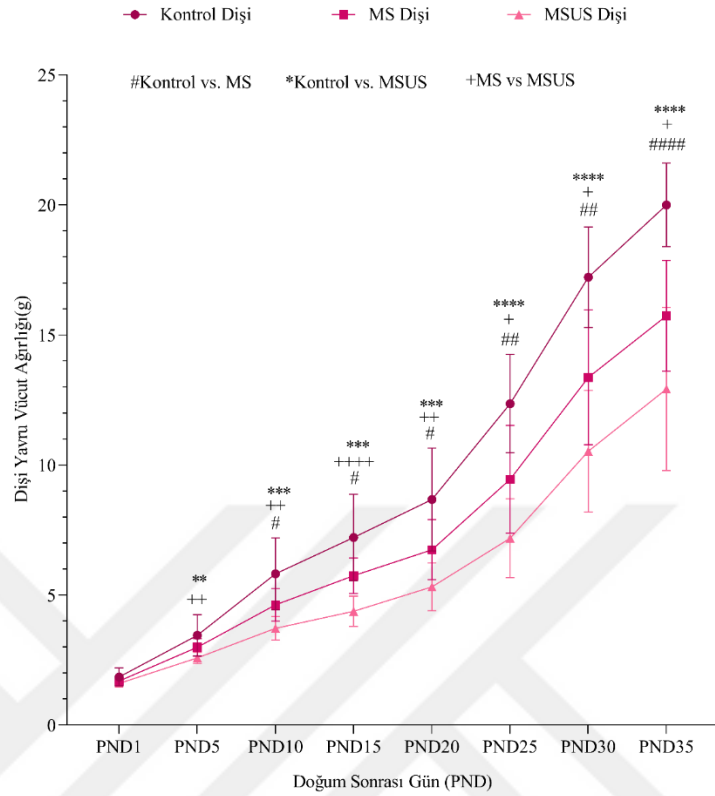
4.2. Kilo Takibi Bulguları

Kontrol, MS ve MSUS grubundaki fareler ilk olarak PND1. günde tartıldıktan sonra PND5, PND10, PND15, PND20, PND25, PND30 ve PND35. günde tartılmışlardır. Fare yavrularının ağırlığı üzerindeki stres uygulaması ve zaman etkisini değerlendirmek için iki yönlü tekrarlı ölçümlü varyans analizi (Two-way Repeated Measure ANOVA) kullanılmıştır. Anlamlı olma durumunda Tukey HSD çoklu karşılaştırma testi kullanılmıştır. Burada iki temel etken ve bir etkileşim etkisi söz konusudur:

1. Stres uygulaması (grup) etkisi.
2. Zaman (PND1, PND5 ve devamı) etkisi.
3. Grup x Zaman etkileşim etkisi (etkileşim etkisi).

Farelerde stres müdahalesinin (MS ve MSUS) ağırlık üzerindeki etkisinin, kontrol grubundaki farelerin (stres uygulaması olmayanlar) ağırlığıyla aynı olduğu hipotezi test edilmiştir. Buna ek olarak, zamanın (stres maruz kalma zamanı) etkisi için, tüm zaman seviyelerinin ağırlığının aynı olduğu hipotezi test edilmiştir. Ayrıca, bu modelde, bir faktörün (stres uygulaması) etkisinin, diğer bir faktörün (strese maruz kalma zamanı) etkisine bağlı olduğu için etkileşim terimi dahil edilmiştir. “*Full model*” uygulanmıştır. Deney tasarımı tekrarlı ölçümler üzerine kurulu olduğu için Küresellik testi (*Sphericity*) varsayılmamıştır ve Greenhouse-Geisser düzeltmesi (Greenhouse-Geisser *correction*) uygulanmıştır (Maxwell vd., 2017). Dişi fare için Epsilon (ϵ) değeri 0,2170, erkek fare için ise 0,1818 olarak bulunmuştur. Çoklu karşılaştırma için Tukey HSD testi kullanılmıştır.

4.2.1. Dişi Farelerin Kilo Takibi Bulguları



Şekil 4.2 Günlere Göre Dişi Yavruların (N = 36) Gruplar Arasındaki Ağırlık Karşılaştırması; Koyu Pembe Kontrol Dişi Fareler, Orta Pembe MS Dişi Fareler ve Açık Pembe MSUS Dişi Fareleri Göstermektedir; Anlamlılık Sembolleri, Kontrol ile Karşılaştırıldığında MSUS İçin Yıldız, MS İçin Kare, MSUS ve MS Arasında Farklılıklar ise Artı İşareti Kullanılmıştır

Yapılan tartımlar sonucunda, MSUS grubunda yer alan yavruların MS grubu ve kontrol grubu yavrulardan daha zayıf oldukları tespit edilmiştir (Şekil 4.2). Vücut ağırlığı üzerine yapılan iki yönlü tekrarlı ölçümler ANOVA analizinin sonuçlarına göre, strese maruz kalma zamanının vücut ağırlığı üzerinde anlamlı bir etkisi olduğu belirlenmiştir, $F(1,519; 50,12) = 958,5$, $p < 0.0001$, $\eta^2 = 81,49$. Bu da vücut ağırlığının strese maruz kalma süresine bağlı olarak değiştiği anlamına gelmektedir. Aynı şekilde, stres uygulamasının da vücut ağırlığı üzerinde anlamlı bir etkisi olduğu bulunmuştur, $F(2, 33) = 25,73$, $p < 0.0001$, $\eta^2 = 7,48$. Yani, vücut ağırlığının stres uygulamasına bağlı olarak değiştiği anlamına gelmektedir. Bununla birlikte, strese maruz kalma zamanı ile stres uygulaması arasında vücut ağırlığı üzerinde anlamlı bir

etkileşim olduğu bulunmuştur, $F(14, 231) = 20,16$, $p < 0,0001$, $\eta^2 = 3,43$. Bu, stres uygulamasının vücut ağırlığı üzerindeki etkisinin her bir strese maruz kalma süresi için farklı olduğunu göstermektedir.

Post hoc testi için Tukey's çoklu karşılaştırmalar uygulanmıştır. Sonuçlar **Tablo 4.1**'de sunulmuştur. Betimleyici istatistik **Tablo 4.2**'de gösterilmiştir.

Fareler, 5 günlük olduklarında MSUS dişilerin kontrol dişilerden ve MS dişilerden daha zayıf oldukları fark edilmiştir ($p = 0,0076$, $p = 0,0055$).

Fareler, 10. güne ulaştıklarında ise MSUS ve MS dişilerin kontrol grubu dişilerinden daha zayıf olduğu saptanmıştır ($p = 0,0006$, $p = 0,0393$). Aynı zamanda, MSUS dişilerin de MS dişilerinden daha zayıf oldukları da 10. günün bulguları arasındadır ($p = 0,0018$).

Farelerin 15 günlük olduklarında hem MSUS dişilerin hem de MS dişilerin kontrol dişilerden daha zayıf oldukları saptanmıştır ($p = 0,0002$, $p = 0,0321$). Aynı zamanda, 5 ve 10 günlük bulgulara benzer şekilde, MSUS dişiler MS dişilerden daha zayıf oldukları tespit edilmiştir ($p < 0,0001$). Özetle, 5 ve 10 günlük bulguları gibi, MSUS grubu annelerin maruz kaldıkları öngörülme stresin, MSUS dişilerin MS dişilerinden daha zayıf olmalarının üçüncü kez kanıtıdır. 15 günlükteki farkın 5 ve 10 günlükte aynı olmasının sebebi, maternal stres uygulamasının PND1-PND14 arasında gerçekleştirilmiş olmasıdır. Bu süreçteki strese maruz kalma zamanının, ağırlık farklarına neden olduğu bir kanıttır.

Fareler 20 günlük olduklarında, MSUS ve MS dişilerin kontrol dişilerden daha zayıf olduğu saptanırken ($p = 0,0002$, $p = 0,0238$), MSUS dişilerin de MS grubu dişilerinden daha zayıf olduğu ($p = 0,0081$), ancak bir önceki tartım zamanından ortalama farkın çok değişmediği saptanmıştır.

Fareler 25 günlük olduklarında, MSUS ve MS dişilerin tıpkı 5, 10, 15, ve 20. günlerde olduğu gibi kontrol grubu dişilerinden daha zayıf oldukları göze çarpmaktadır ($p < 0,0001$, $p = 0,0045$). Bu durum, kontrol grubu dişilere kıyasla stres grubundaki dişilerin ağırlık düşüşünü istikrarlı şekilde sürdürdüğünü göstermektedir.

Ayrıca, MSUS dişilerin MS dişilerden daha zayıf olmasına rağmen anlamlılık düzeyi bir önceki tartımdan daha düşük olduğu saptanmıştır ($p = 0,0163$).

Fareler 30 günlük olduklarında, MSUS ve MS dişiler ile kontrol grubu dişileri kıyaslandığında MSUS ve MS dişilerin kontrol grubu dişilerinden daha zayıf oldukları saptanmıştır ($p < 0,0001$, $p = 0,0014$). Bununla birlikte, MSUS dişilerin tıpkı 25 günlerde olduğu gibi MS dişilerden daha zayıf oldukları saptanmıştır ($p = 0,0262$).

MSUS ve MS dişi farelerinin 35. günde, tıpkı diğer günlerde olduğu gibi kontrol grubu dişilerinden daha zayıf oldukları durumu sürdürdükleri görülmektedir ($p < 0,0001$, $p < 0,0001$). Ayrıca, MSUS dişiler ile MS grubu dişileri ile kıyaslandığında MSUS dişilerin MS dişilerinden daha zayıf oldukları saptanmıştır ($p = 0,0462$).

Tablo 4.1 *Farklı Zaman Noktalarında Dişi Fare Grupları Arasındaki Kilo Farklarının Çoklu Karşılaştırma Analiz Sonuçlarının Özeti*

Zaman	Gruplar	Ortalama	%95.00	p -değeri	Karşılaştırma
		Farkı (Mean difference)	Güven Aralığı (CI)		
PND1	Kontrol Dişi vs MS Dişi	0,15	-0,13, 0,43	0,3632	-
	Kontrol Dişi vs MSUS Dişi	0,25	-0,03, 0,52	0,0809	-
	MS Dişi vs MSUS Dişi	0,09	-0,02, 0,21	0,1244	-

Tablo 4.1 (devam)

PND5	Kontrol Dişi vs MS Dişi	0,46	-0,19, 1,10	0,1879	-
	Kontrol Dişi vs MSUS Dişi	0,87	0,24, 1,49	0,0076 (**)	Kontrol Dişi > MSUS Dişi
	MS Dişi vs MSUS Dişi	0,41	0,12, 0,70	0,0055 (**)	MS Dişi > MSUS Dişi
PND10	Kontrol Dişi vs MS Dişi	1,19	0,06, 2,33	0,0393 (*)	Kontrol Dişi > MS Dişi
	Kontrol Dişi vs MSUS Dişi	2,09	0,99, 3,20	0,0006 (***)	Kontrol Dişi > MSUS Dişi
	MS Dişi vs MSUS Dişi	0,90	0,34, 1,47	0,0018 (**)	MS Dişi > MSUS Dişi
PND15	Kontrol Dişi vs MS Dişi	1,47	0,12, 2,82	0,0321 (*)	Kontrol Dişi > MS Dişi
	Kontrol Dişi vs MSUS Dişi	2,83	1,50, 4,16	0,0002 (***)	Kontrol Dişi > MSUS Dişi
	MS Dişi vs MSUS Dişi	1,37	0,72, 2,02	<0,0001 (****)	MS Dişi > MSUS Dişi
PND20	Kontrol Dişi vs MS Dişi	1,93	0,24, 3,62	0,0238 (*)	Kontrol Dişi > MS Dişi
	Kontrol Dişi vs MSUS Dişi	3,36	1,73, 4,98	0,0002 (***)	Kontrol Dişi > MSUS Dişi
	MS Dişi vs MSUS Dişi	1,43	0,35, 2,50	0,0081 (**)	MS Dişi > MSUS Dişi

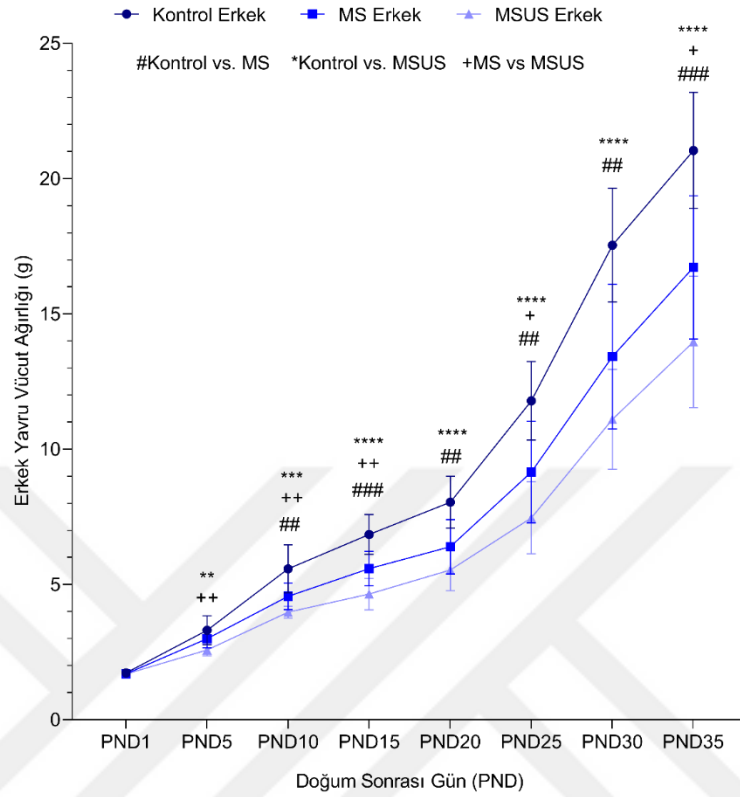
Tablo 4.1 (devam)

PND25	Kontrol	2,91	0,87, 4,94	0,0045 (**)	Kontrol
	Dişi vs MS				Dişi > MS
	Dişi				Dişi
	Kontrol	5,17	3,41, 6,94	<0,0001	Kontrol
	Dişi vs MSUS Dişi			(****)	Dişi > MSUS Dişi
PND30	MS Dişi vs MSUS Dişi	2,27	0,39, 4,14	0,0163 (*)	MS Dişi > MSUS Dişi
	Kontrol	3,85	1,50, 6,21	0,0014 (**)	Kontrol
	Dişi vs MS				Dişi > MS
	Dişi				Dişi
	Kontrol	6,69	4,49, 8,90	<0,0001	Kontrol
PND35	Dişi vs MSUS Dişi			(****)	Dişi > MSUS Dişi
	MS Dişi vs MSUS Dişi	2,84	0,31, 5,37	0,0262 (*)	MS Dişi > MSUS Dişi
	Kontrol	4,26	2,32, 6,21	<0,0001	Kontrol
	Dişi vs MS			(****)	Dişi > MS
	Dişi				Dişi
PND35	Kontrol	7,08	4,47, 9,69	<0,0001	Kontrol
	Dişi vs MSUS Dişi			(****)	Dişi > MSUS Dişi
	MS Dişi vs MSUS Dişi	2,82	0,04, 5,59	0,0462 (*)	MS Dişi > MSUS Dişi

Tablo 4.2 *Dişi Fare Grubun Betimleyici İstatistik Detayları*

Zaman	Grup	Ortalama	Minimum	Maksimum	Standart Sapma	N
PND1	Kontrol	1,85	1,61	2,58	0,35	12
	MS	1,70	1,49	1,91	0,14	12
	MSUS	1,61	1,51	1,72	0,07	12
PND5	Kontrol	3,45	2,72	4,86	0,79	12
	MS	3,00	2,68	3,62	0,34	12
	MSUS	2,58	2,32	2,94	0,21	12
PND10	Kontrol	5,82	4,50	8,71	1,38	12
	MS	4,62	3,61	5,69	0,63	12
	MSUS	3,72	2,57	4,17	0,45	12
PND15	Kontrol	7,21	5,86	10,90	1,66	12
	MS	5,74	4,64	6,65	0,68	12
	MSUS	4,38	3,52	5,26	0,58	12
PND20	Kontrol	8,67	6,79	13,14	1,98	12
	MS	6,75	5,04	8,63	1,15	12
	MSUS	5,32	3,90	6,64	0,92	12
PND25	Kontrol	12,36	10,24	16,50	1,89	12
	MS	9,45	6,47	13,16	2,07	12
	MSUS	7,19	4,32	9,34	1,52	12
PND30	Kontrol	17,22	14,84	20,67	1,93	12
	MS	13,37	9,54	18,68	2,59	12
	MSUS	10,53	6,53	14,02	2,34	12
PND35	Kontrol	20,00	17,96	23,14	1,60	12
	MS	15,74	12,42	19,41	2,13	12
	MSUS	12,92	8,16	17,96	3,13	12

4.2.2. Erkek Farelerin Kilo Takibi Bulguları



Şekil 4.3 Günlere Göre Erkek Yavruların (N = 36) Gruplar Arasındaki Ağırlık Karşılaştırması; Koyu Mavi Kontrol Erkek Fareler, Orta Mavi MS Erkek Fareler ve Açık Mavi MSUS Erkek Fareleri Göstermektedir; Anlamlılık Sembolleri, Kontrolü ile Karşılaştırıldığında MSUS İçin Yıldız, MS İçin Kare, MSUS Ve MS Arasında Farklılıklar İse Artı İşareti Kullanılmıştır

Yapılan tartımlar sonucunda, MSUS grubunda yer alan yavruların MS grubu ve kontrol grubu yavrulardan daha zayıf oldukları tespit edilmiştir (Şekil 4.3). Vücut ağırlığı üzerine yapılan iki yönlü tekrarlı ölçümler ANOVA analizinin sonuçlarına göre, strese maruz kalma zamanının vücut ağırlığı üzerinde anlamlı bir etkisi olduğu belirlenmiştir, $F(1,273, 41,99) = 1129$, $p < 0,0001$, $\eta^2 = 85,52$. Bu da vücut ağırlığının strese maruz kalma süresine bağlı olarak değiştiği anlamına gelmektedir. Aynı şekilde, stres uygulamasının da vücut ağırlığı üzerinde anlamlı bir etkisi olduğu bulunmuştur, $F(2, 33) = 27,96$, $p < 0.0001$, $\eta^2 = 5,45$. Yani, vücut ağırlığının stres uygulamasına bağlı olarak değiştiği anlamına gelmektedir. Bununla birlikte, strese maruz kalma

zamanı ile stres uygulaması arasında vücut ağırlığı üzerinde anlamlı bir etkileşim olduğu bulunmuştur, $F(14, 231) = 21,84$, $p < 0,0001$, $\eta^2 = 3,31$. Bu, stres uygulamasının vücut ağırlığı üzerindeki etkisinin her bir strese maruz kalma süresi için farklı olduğunu göstermektedir.

Post hoc testi için Tukey's çoklu karşılaştırmalar uygulanmıştır. Sonuçlar **Tablo 4.3**'te sunulmuştur. Betimleyici istatistik **Tablo 4.4**'te gösterilmiştir.

Fareler, 5 günlük olduklarında MSUS erkeklerin kontrol erkeklerden ve MS erkeklerden daha zayıf oldukları fark edilmiştir ($p = 0,0016$, $p = 0,0051$).

Fareler, 10. güne ulaştıklarında ise MSUS ve MS erkeklerin kontrol grubu erkeklerinden daha zayıf olduğu saptanmıştır ($p = 0,0001$, $p = 0,0080$). Aynı zamanda, MSUS erkeklerin de MS erkeklerinden daha zayıf oldukları da 10. günün bulguları arasındadır ($p = 0,0050$).

Farelerin 15 günlük olduklarında hem MSUS erkeklerin hem de MS erkeklerin kontrol erkeklerden daha zayıf oldukları saptanmıştır ($p < 0,0001$, $p = 0,0005$). Aynı zamanda, 5 ve 10 günlük bulgulara benzer şekilde, MSUS erkekler MS erkeklerden daha zayıf oldukları tespit edilmiştir ($p = 0,0028$). Özetle, 5 ve 10 günlük bulguları gibi, MSUS grubu annelerin maruz kaldıkları öngörülme stresin, MSUS erkeklerin MS erkeklerinden daha zayıf olmalarının üçüncü kez kanıtıdır. 15 günlükteki farkın 5 ve 10 günlükle aynı olmasının sebebi, maternal stres uygulamasının PND1-PND14 arasında gerçekleştirilmiş olmasıdır. Bu süreçteki strese maruz kalma zamanının, ağırlık farklarına neden olduğu bir kanıttır.

Fareler 20. güne ulaştıklarında ise MSUS ve MS erkeklerin ağırlıklarındaki düşüşün devam ettiği ve kontrol erkeklerden daha zayıf oldukları saptanmıştır ($p < 0,0001$, $p = 0,0013$). Fakat MSUS erkekler ile MS grubu erkekleri arasında istatistiksel bir farklılık bulunmamıştır.

Fareler 25 günlük olduklarında, MSUS ve MS erkeklerin tıpkı 5, 10, 15, ve 20. günlerde olduğu gibi kontrol grubu erkeklerinden daha zayıf oldukları göze çarpmaktadır ($p < 0,0001$, $p = 0,0026$). Bu durum, kontrol grubu erkeklere kıyasla stres

grubundaki erkeklerin ağırlık düşüşünü istikrarlı şekilde sürdürdüğünü göstermektedir. Ayrıca, MSUS erkekler MS erkeklerden anlamlı olarak daha zayıf olduğu tespit edilmiştir ($p = 0,0483$).

Fareler 30 günlük olduklarında, MSUS ve MS erkekler ile kontrol grubu erkekleri kıyaslandığında MSUS ve MS erkeklerin kontrol grubu erkeklerinden daha zayıf oldukları saptanmıştır ($p < 0,0001$, $p = 0,0011$). Bununla birlikte, MSUS erkeklerin tıpkı 20. günde olduğu gibi MS erkeklerden daha zayıf olduğu, ancak aralarında anlamlılık saptanmamıştır.

MSUS ve MS erkek farelerinin 35. günde, tıpkı diğer günlerde olduğu gibi kontrol grubu erkeklerinden daha zayıf oldukları durumu sürdürdükleri görülmektedir ($p < 0,0001$, $p = 0,0007$). Ayrıca, MSUS erkekler ile MS grubu erkekleri ile kıyaslandığında MSUS erkeklerin MS erkeklerinden daha zayıf oldukları saptanmıştır ($p = 0,0369$).

Tablo 4.3 *Farklı Zaman Noktalarında Erkek Fare Grupları Arasındaki Kilo Farklarının Çoklu Karşılaştırma Analiz Sonuçlarının Özeti*

Zaman	Gruplar	Ortalama	%95.00	p-değeri	Karşılaştırma
		Farkı (Mean difference)	Güven Aralığı (CI)		
PND1	Kontrol Erkek vs MS Erkek	0,03	-0,09 , 0,15	0,7995	-
	Kontrol Erkek vs MSUS Erkek	0,04	-0,05 , 0,12	0,5127	-
	MS Erkek vs MSUS Erkek	0,01	-0,11 , 0,12	0,9865	-

Tablo 4.3 (devam)

PND5	Kontrol Erkek vs MS Erkek	0,31	-0,15 , 0,78	0,2314	-
	Kontrol Erkek vs MSUS Erkek	0,73	0,29 , 1,16	0,0016	Kontrol Erkek > MSUS Erkek
	MS Erkek vs MSUS Erkek	0,42	0,12 , 0,71	0,0051	MS Erkek > MSUS Erkek
PND10	Kontrol Erkek vs MS Erkek	1,01	0,26 , 1,77	0,008	Kontrol Erkek > MS Erkek
	Kontrol Erkek vs MSUS Erkek	1,60	0,90 , 2,30	0,0001	Kontrol Erkek > MSUS Erkek
	MS Erkek vs MSUS Erkek	0,59	0,18 , 0,99	0,005	MS Erkek > MSUS Erkek
PND15	Kontrol Erkek vs MS Erkek	1,26	0,56 , 1,97	0,0005	Kontrol Erkek > MS Erkek
	Kontrol Erkek vs MSUS Erkek	2,20	1,52 , 2,88	<0,0001	Kontrol Erkek > MSUS Erkek
	MS Erkek vs MSUS Erkek	0,94	0,32 , 1,56	0,0028	MS Erkek > MSUS Erkek

Tablo 4.3 (devam)

PND20	Kontrol Erkek vs MS Erkek	1,65	0,64 , 2,66	0,0013	Kontrol Erkek > MS Erkek
	Kontrol Erkek vs MSUS Erkek	2,51	1,62 , 3,40	<0,0001	Kontrol Erkek > MSUS Erkek
	MS Erkek vs MSUS Erkek	0,86	-0,06 , 1,78	0,0701	-
PND25	Kontrol Erkek vs MS Erkek	2,64	0,91 , 4,36	0,0026	Kontrol Erkek > MS Erkek
	Kontrol Erkek vs MSUS Erkek	4,33	2,90 , 5,76	<0,0001	Kontrol Erkek > MSUS Erkek
	MS Erkek vs MSUS Erkek	1,69	0,01 , 3,37	0,0483	MS Erkek > MSUS Erkek
PND30	Kontrol Erkek vs MS Erkek	4,12	1,65 , 6,59	0,0011	Kontrol Erkek > MS Erkek
	Kontrol Erkek vs MSUS Erkek	6,44	4,41 , 8,47	<0,0001	Kontrol Erkek > MSUS Erkek
	MS Erkek vs MSUS Erkek	2,32	-0,06 , 4,69	0,0571	-

Tablo 4.3 (devam)

PND35	Kontrol Erkek vs MS Erkek	4,32	1,84 , 6,80	0,0007	Kontrol Erkek > MS Erkek
	Kontrol Erkek vs MSUS Erkek	7,07	4,72 , 9,43	<0,0001	Kontrol Erkek > MSUS Erkek
	MS Erkek vs MSUS Erkek	2,75	0,15 , 5,36	0,0369	MS Erkek > MSUS Erkek

Tablo 4.4 Erkek Fare Grubun Betimleyici İstatistik Detayları

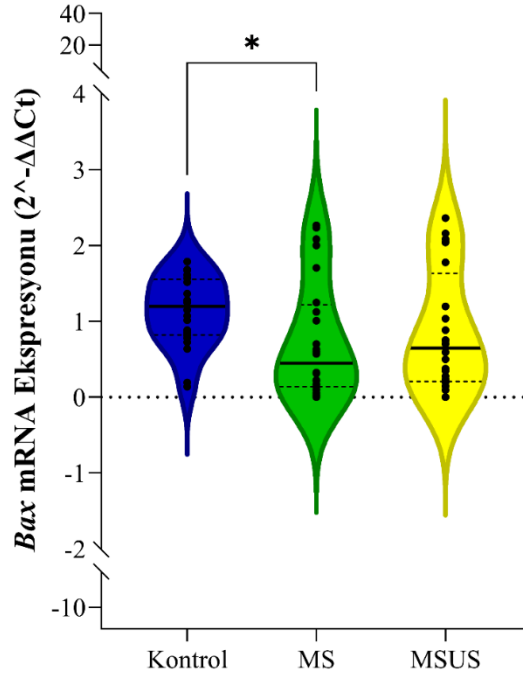
Zaman	Grup	Ortalama	Minimum	Maksimum	Standart Sapma	N
PND1	Kontrol	1,73	1,61	1,85	0,10	12
	MS	1,70	1,49	1,91	0,14	12
	MSUS	1,69	1,61	1,81	0,07	12
PND5	Kontrol	3,31	2,72	3,98	0,54	12
	MS	3,00	2,68	3,62	0,34	12
	MSUS	2,58	2,32	2,94	0,22	12
PND10	Kontrol	5,58	4,12	6,76	0,89	12
	MS	4,56	3,81	5,37	0,49	12
	MSUS	3,98	3,50	4,24	0,22	12
PND15	Kontrol	6,85	5,75	7,82	0,73	12
	MS	5,59	4,65	6,34	0,63	12
	MSUS	4,64	3,62	5,29	0,58	12
PND20	Kontrol	8,04	6,49	9,33	0,96	12
	MS	6,39	4,73	7,86	1,01	12
	MSUS	5,54	4,27	6,51	0,76	12
PND25	Kontrol	11,79	8,97	13,36	1,45	12
	MS	9,15	6,20	11,66	1,87	12
	MSUS	7,46	5,93	10,22	1,33	12
	Kontrol	17,54	13,94	20,66	2,10	12
	MS	13,42	9,31	17,61	2,67	12
	MSUS	11,11	8,88	14,52	1,85	12
PND35	Kontrol	21,04	17,36	23,49	2,15	12
	MS	16,72	12,17	20,20	2,65	12
	MSUS	13,97	10,78	18,61	2,43	12

4.3. mRNA Ekspresyon Analizi Bulguları

Dişi (n=36) ve erkek (n=36) fareler arasında *Bax*, *Bcl2*, *Tp53* ve *Casp3* genlerinin mRNA ekspresyonlarına bağımsız t-testi veya Mann-Whitney U testi uygulanmış, ancak anlamlılık saptanmamıştır. Bu nedenle, mRNA ekspresyon

analizleri için yapılan Kruskal-Wallis veya tek yönlü ANOVA testleri cinsiyet ayrımı yapılmaksızın gerçekleştirilmiştir. mRNA ekspresyon değerleri, *housekeeping* geni olan *Gapdh* geni kullanılarak normalize edilmiştir. Fareler, kontrol grubu, MS grubu ve MSUS grubu olmak üzere üç gruba ayrılmıştır. *Bax*, *Bcl2*, *TP53* ve *Casp3* genlerinin mRNA düzeyinde ekspresyon seviyeleri bu grupların kendi aralarında ve strese maruz kalmayan kontrol grubu ile Kruskal-Wallis veya tek yönlü ANOVA testi kullanılarak kıyaslanmıştır. Kruskal-Wallis testinin null hipotezi olarak, grupların sıra numaralarının ortalamaları aynı olduğu varsayılmıştır. Alternatif hipotez olarak grupların sıra numaralarının ortalamaları farklı olduğu varsayılmıştır. Tek yönlü ANOVA testinin null hipotezi olarak grupların ortalamaları aynı olduğu varsayılmıştır. Alternatif hipotez olarak grupların ortalamaları farklı olduğu varsayılmıştır.

Bax mRNA ekspresyon sonuçları **Şekil 4.4**'te ve **Tablo 4.5**'te verilmiştir. Verilerin normal dağılımına uymadığı normallik testi ile belirlenmiştir. *Bax*, *Bcl2* ve *Casp3* mRNA ekspresyon analizi için Kruskal-Wallis testi yapılmıştır. Sıra numaralarının toplamaları (*rank totals*) arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur: 45,06 (Kontrol), 30,44 (MS) ve 34,00 (MSUS); $H(2, n = 72) = 6,38, p = 0,0413$. Post hoc testi olarak Dunn's çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır. Analiz sonucuna göre, MS grubun sıra numaralarının ortalamaları kontrol grubuna kıyasla anlamlı fark bulunmuştur ($p = 0,0464$). Diğer farklar istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptanmıştır. İstatistiksel olarak anlamlılık saptanamamış olmasına rağmen, kontrol grubuna kıyasla MSUS grubun *Bax* ekspresyon seviyesinin azaldığı dikkat çekmektedir.



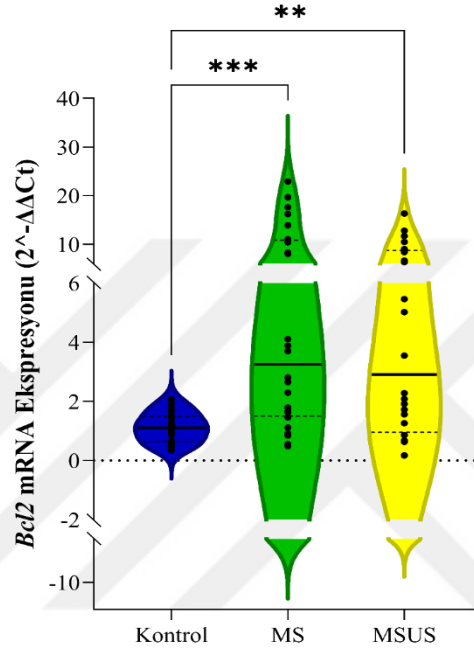
Şekil 4.4 Gruplar Arası Bax Geni Ekspresyon Kıyaslanması; Median ve Çeyrek Yüzdelikler Gösterilmiştir

Tablo 4.5 Gruplar Arası Bax Geni Ekspresyonunun Betimleyici İstatistik Detayları

Grup	Fare Sayısı	Ortanca (IQR)	Sıra Numaralarının Ortalaması± Standart Sapma
Kontrol	24	1,20 (0,74)	45,06 ± 0,46
MS	24	0,45 (1,08)	30,44 ± 0,77
MSUS	24	0,65 (1,43)	34,00 ± 0,79

Bcl2 mRNA ekspresyon sonuçları **Şekil 4.5**'te ve **Tablo 4.6**'da verilmiştir. Verilerin normal dağılımına uymadığı normallik testi ile belirlenmiştir. mRNA ekspresyon analizi için Kruskal-Wallis testi yapılmıştır. Sıra numaralarının toplamaları (*rank totals*) arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur: 22,65 (Kontrol), 45,44 (MS) ve 41,42 (MSUS); $H(2, n = 72) = 16,22, p = 0,0003$. Post hoc

testi olarak Dunn's çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır. Analiz sonucuna göre hem MS grubun hem de MSUS grubun sıra numaralarının ortalamaları kontrol grubuna kıyasla anlamlı fark bulunmuştur ($p = 0,0005$, $p = 0,0057$). Kontrol grubuna kıyasla hem MS hem de MSUS gruplarında *Bcl2* mRNA ekspresyon seviyelerinin arttığı tespit edilmiştir. MS ve MSUS grubun arasındaki fark ise istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptanmıştır.

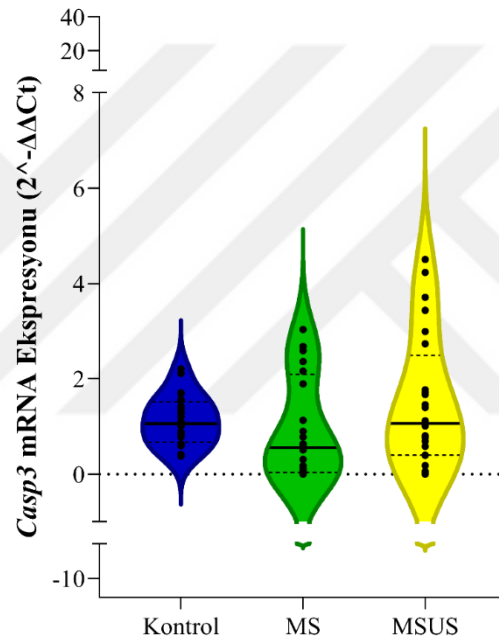


Şekil 4.5 Gruplar Arası *Bcl2* Geni Ekspresyon Kıyaslanması; Median ve Çeyrek Yüzdelikler Gösterilmiştir

Tablo 4.6 Gruplar Arası *Bcl2* Geni Ekspresyonunun Betimleyici İstatistik Detayları

Grup	Fare Sayısı	Ortanca (IQR)	Sıra Numaralarının Ortalaması ± Standart Sapma
Kontrol	24	1,11 (0,85)	22,65 ± 0,49
MS	24	3,26 (9,35)	45,44 ± 6,86
MSUS	24	2,92 (7,79)	41,42 ± 4,64

Casp3 mRNA ekspresyon sonuçları **Şekil 4.6**'da ve **Tablo 4.7**'de verilmiştir. Verilerin normal dağılımına uymadığı normallik testi ile belirlenmiştir. mRNA ekspresyon analizi için Kruskal-Wallis testi yapılmıştır. Sıra numaralarının toplamaları (*rank totals*) arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır: 39,67 (Kontrol), 30,04 (MS) ve 39,79 (MSUS); $H(2, n = 72) = 3,429, p = 0,18$. İstatistiksel anlamlılık saptanamamış olmasına rağmen, kontrol grubuna kıyasla, MS grubunda *Casp3* mRNA ekspresyon seviyesinin azaldığı tespit edilmiştir. Ayrıca, kontrol grubu ile MSUS grubu kıyaslandığında, MSUS grubunun sıra numaralarının ortalamaları kontrol grubunkine hemen hemen aynı seviyede olduğu gözlemlenmiştir.

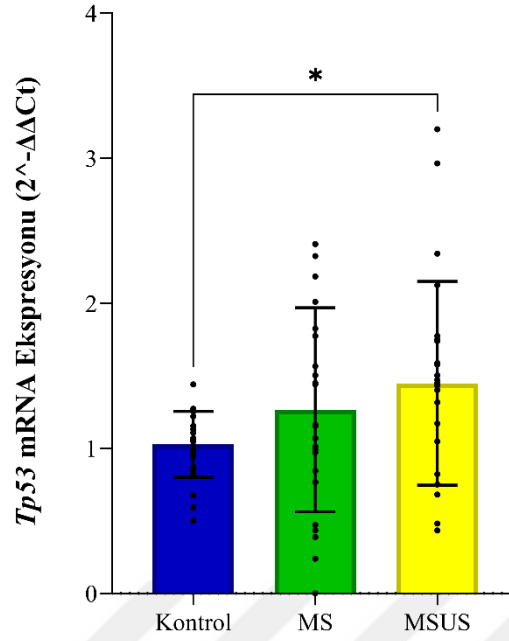


Şekil 4.6 Gruplar Arası *Casp3* Geni Ekspresyon Kıyaslanması; Median ve Çeyrek Yüzdelikler Gösterilmiştir

Tablo 4.7 Gruplar Arası Casp3 Geni Ekspresyonunun Betimleyici İstatistik Detayları

Grup	Fare Sayısı	Ortanca (IQR)	Sıra Numaralarının Ortalaması $\pm$ Standart Sapma
Kontrol	24	1,06 (0,85)	39,67 $\pm$ 0,52
MS	24	0,55 (2,06)	30,04 $\pm$ 1,07
MSUS	24	1,06 (2,1)	39,79 $\pm$ 1,4

Tp53 mRNA ekspresyon sonuçları **Şekil 4.7**'de ve **Tablo 4.8**'de verilmiştir. Verilerin normal dağılımına uyduğu normallik testi ile belirlenmiştir. mRNA ekspresyon analizi için tek yönlü ANOVA testi yapılmıştır. gruplar arasında anlamlı bir fark saptanamıştır ($F(2, 69) = 3,081$, $p = 0,0523$). Ana etki anlamlı olmasa bile, Tukey'in çoklu karşılaştırma testi kullanılarak yapılan post-hoc analiz, kontrol grubu ($M = 1,028$, $SD = 0,2272$) ile MSUS grubu ($M = 1,449$, $SD = 0,7030$) arasında anlamlı bir fark olduğunu göstermiştir ($p = 0,0413$). Genel ANOVA anlamlı olmadığında bile, çoklu karşılaştırma testinden 'anlamlı' bir sonuç elde etmek mümkündür. Genel tek yönlü ANOVA, tüm grupların (kontrol, MS ve MSUS) aynı ortalama değerlere sahip olduğu H_0 'ını test eder, bu nedenle gözlemlediğimiz herhangi bir farkın rastgele örneklemeyle ilgili olduğu varsayılır. Post-test, belirli iki grubun aynı ortalama değerlere sahip olduğu H_0 'ını test eder. Post-testler daha odaklıdır, bu nedenle genel ANOVA anlamlı bir etki göstermediğinde bile belirli gruplar arasındaki farkları bulma gücüne sahiptirler (Motulsky, b.t.).

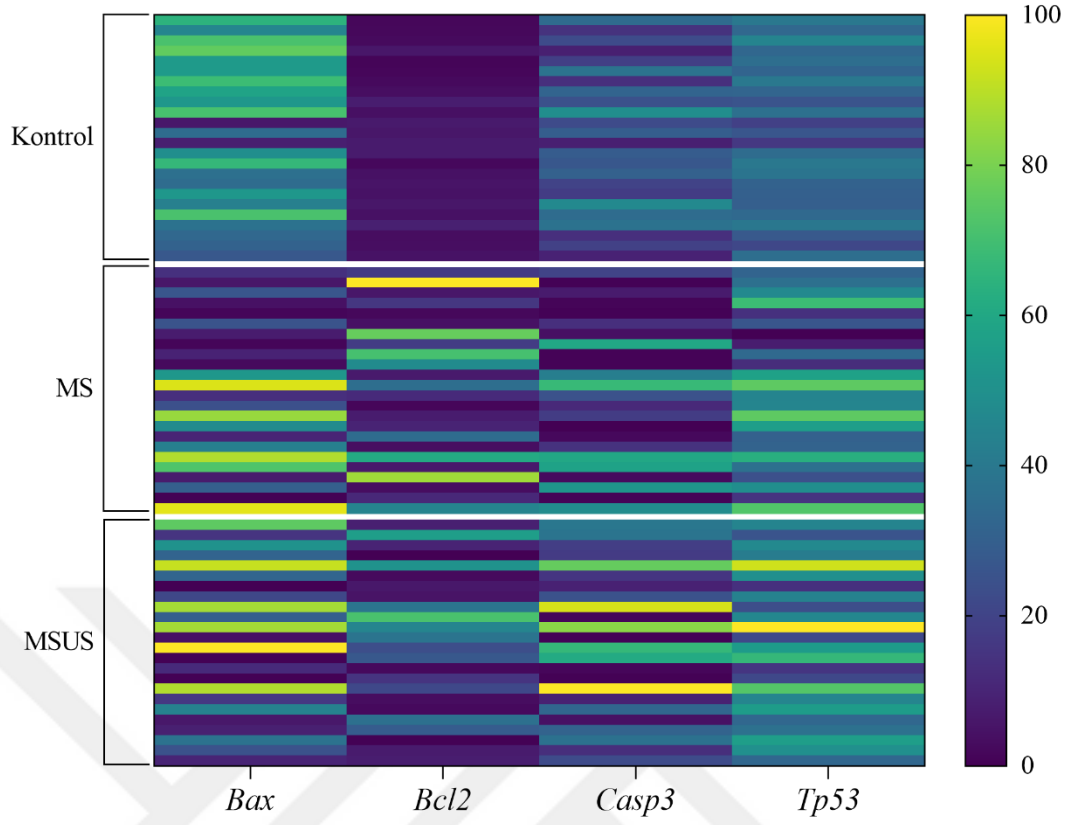


Şekil 4.7 Gruplar Arası *Tp53* Geni Ekspresyon Kıyaslanması; Median ve Çeyrek Yüzdelikler Gösterilmiştir

Tablo 4.8 Gruplar Arası *Tp53* Geni Ekspresyonunun Betimleyici İstatistik Detayları

Grup	Fare Sayısı	Minimum-Maksimum (Ortalama ± Standart Sapma)
Kontrol	24	0,5027- 1,442 (1,028±0,2272)
MS	24	0,000-2,408 (1,267±0,7032)
MSUS	24	0,4346-3,199 (1,449±0,7030)

Kontrol, MS ve MSUS grubu aralarında *Bax*, *Bcl2*, *Tp53* ve *Casp3* mRNA ekspresyon değerleri karşılaştırılmıştır. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, *Bax* ekspresyon seviyelerinde stres gruplarında azalma gözlemlenmiştir. *Bcl2* ve *Tp53* ekspresyon seviyeleri ise stres gruplarında artmıştır. *Casp3* ekspresyon seviyeleri ise MS grubunda azalırken, MSUS grubunda benzer düzeylerde kalmıştır (Şekil 4.8).



Şekil 4.8 Heatmap: Kontrol (N=24), Ms (N=24) Ve Msus (N=24) Grupları Arasında mRNA Ekspresyonu

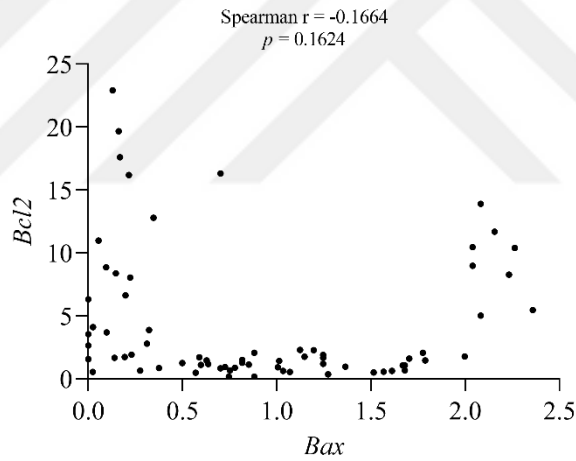
4.4. Ekspresyon Korelasyon Bulguları

Genler arası ekspresyon Spearman korelasyon testi bulguları **Şekil 4.9, 4.10, 4.11, 4.12, 4.13** ve **Şekil 4.14**'te verilmiştir. Korelasyon gücü **Tablo 4.9**'a göre yorumlanmıştır.

Tablo 4.9 *RS Değerine Göre Spearman Korelasyonun Gücünün Yorumlanması*
(Graphpad Prism)

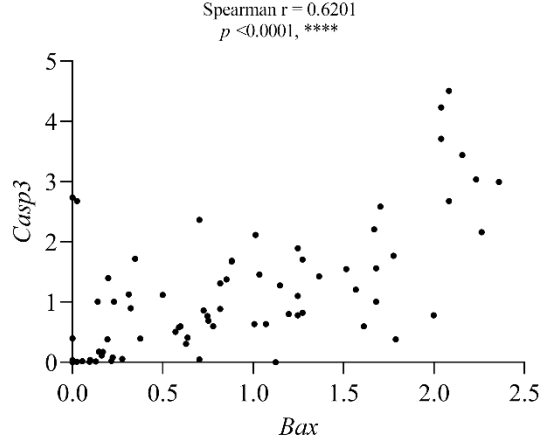
Spearman ρ (rs)	Yorumlama
1,0	Tam korelasyon
0 ve 1 arası	İki değişken birlikte artma veya azalma eğilimindedir
0,0	İki değişken hiçbir şekilde birlikte değişmez
-1 ve 0 arası	Bir değişken artarken diğeri azalır
-1,0	Tam negatif veya ters korelasyon

Spearman'ın sıra korelasyonu, hipokampus *Bax* ve *Bcl2* ekspresyonu arasındaki ilişkiyi değerlendirmek amacıyla hesaplanmıştır. *Bax* ve *Bcl2* ekspresyonları arasında korelasyon olmadığı saptanmıştır ($r = -0,1664$, $p = 0,1624$) (Şekil 4.9).



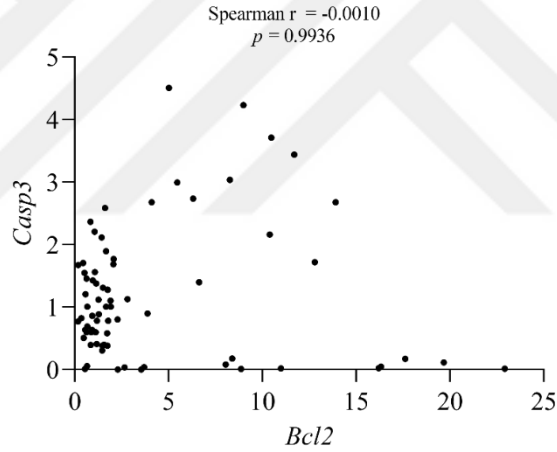
Şekil 4.9 *Hipokampusta Bax ve Bcl2 mRNA Ekspresyonları Arasında Korelasyon*

Hipokampusta *Bax* ve *Casp3* mRNA ekspresyonları arasında anlamlı korelasyon saptanmıştır ($r=0,6201$, $p<0,0001$). Bu durum, *Bax* ekspresyonundaki artış ile *Casp3* ekspresyonunun da arttığına işaret etmektedir (Şekil 4.10).



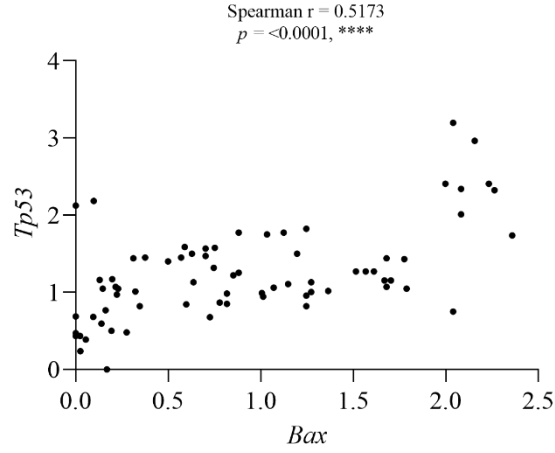
Şekil 4.10 *Hipokampusta Bax ve Casp3 mRNA Ekspresyonları Arasında Korelasyon*

Casp3 ve *Bcl2* ekspresyonları arasında korelasyon olmadığı saptanmıştır ($r = -0,001$, $p = 0,9936$) (Şekil 4.11).



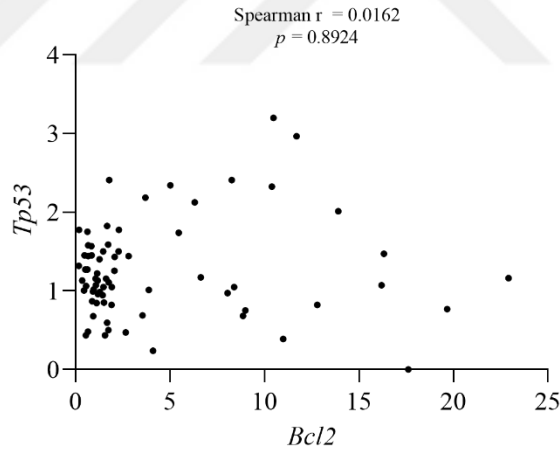
Şekil 4.11 *Hipokampusta Bcl2 ve Casp3 mRNA Ekspresyonları Arasında Korelasyon*

Hipokampusta *Bax* ve *TP53* mRNA ekspresyonları arasında anlamlı korelasyon saptanmıştır ($r=0,5173$, $p<0,0001$). Bu durum, *Bax* ekspresyonundaki artış ile *TP53* ekspresyonunun da arttığına işaret etmektedir (Şekil 4.12),



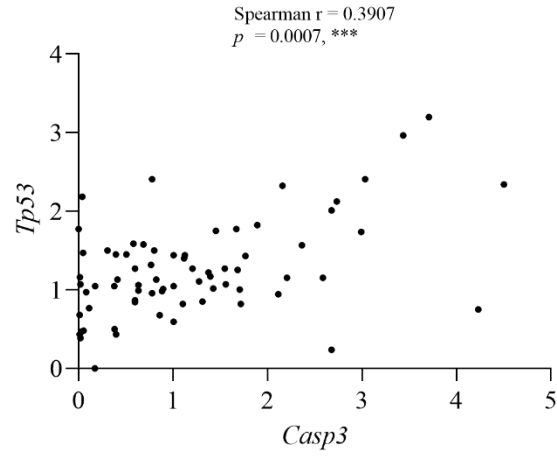
Şekil 4.12 *Hipokampusta Bax ve Tp53 mRNA Ekspresyonları Arasında Korelasyon*

Tp53 ve *Bcl2* ekspresyonları arasında korelasyon olmadığı saptanmıştır ($r = -0,0162$, $p = 0,8924$) (Şekil 4.13).



Şekil 4.13 *Hipokampusta Bcl2 ve Tp53 mRNA Ekspresyonları Arasında Korelasyon*

Hipokampusta *Casp3* ve *Tp53* mRNA ekspresyonları arasında anlamlı korelasyon saptanmıştır ($r=0,3907$, $p=0,0007$). Bu durum, *Casp3* ekspresyonundaki artış ile *Tp53* ekspresyonunun da arttığına işaret etmektedir (Şekil 4.14).



Şekil 4.14. *Hipokampusta Casp3 ve Tp53 mRNA Ekspresyonları Arasında Korelasyon*

5. TARTIŞMA

İnsanların güvenlikleri ve yaşamları için tehdit oluşturarak kitlesel göçlere neden olan savaşlar sonucunda insanlar, başka ülkelere sığınarak sığınmacı konumuna düşebilirler. Bu ve bunun gibi (depremler vb.) travmatik olaylar sonucu ortaya çıkabilen erken dönem anne-yavru ayrılığı, hem anne hem de yavru üzerinde uzun süreli ve derin etkiler bırakabilir (Möhler ve Resch, 2019; Pesonen ve Räikkönen, 2012). Bu tür travmatik olaylar, annelerde ve çocuklarda yoğun stres, kaygı bozukluğu ve depresyon gibi psikolojik sorunlara yol açabilir. Maternal stres olarak adlandırılan bu durum, annenin yavrusuyla olan ilişkisini ve yavrunun gelişimini olumsuz etkileyebilir. Maternal stresle ilgili yapılan bilimsel çalışmalar; toplumsal açıdan farkındalık yaratmak, anne ve bebek sağlığını korumak için psikolojik destek ve tedavi programlarının geliştirilmesi, travma sonrası toplumların iyileşme sürecine katkıda sağlamak ve sağlıklı nesiller yetiştirmek için anne ve bebek sağlığının korunmasına yönelik politikaların oluşturulmasına katkı sağlamaktadır. Bu çalışmaya ilişkin başlıca amacımız, erken dönemde maruz kalınan kronik stres sonucunda, öğrenme sürecinde yeni bilgilerin işlenmesi ve depolanması, duygusal deneyimlerin hafızaya kodlanması ve stres tepkisi gibi süreçlerde rol oynayan, beyinin yeni nöronlar üretebilen kısmı olan hipokampus bölgesindeki programlı hücre ölümü olarak da bilinen 'apoptozis' mekanizmasını, bu mekanizmanın önemli genlerinden *Bax*, *Bcl2*, *Tp53* ve *Casp3* genlerinin mRNA ifade düzeylerini ölçerek araştırmaktır. Erken dönem maternal stres söz konusu olduğunda, bu stres sonucunda kişilerin nörodejeneratif hastalıklar, epilepsi depresyon ve anksiyete gibi önemli ruh sağlığı bozukluklarına yatkınlıklarının olabilmesi ihtimali göz önüne alındığında hipokampusta apoptozisi araştırmak, bu yatkınlıkların önüne geçmek anlamında yeni çözümler bulma potansiyeli taşımaktadır.

Yaşamın erken safhalarında (PND1-PND14), öngörülemeyen anne ayrılığına maruz kalan MS grubu ile birlikte, öngörülemeyen anne ayrılığına ek olarak anneleri öngörülmeleyen strese (fiziksel kısıtlama stresi ve zorunlu yüzme testi) maruz bırakılan MSUS grubu ve kontrol grubu farelerin hipokampus örneklerinde *Bax*, *Bcl2*, *Tp53* ve *Casp3* mRNA ekspresyon düzeyleri araştırılmıştır; Bu çalışma, her beş günde bir 35 gün boyunca yapılan ağırlık tartımlarıyla desteklenmiştir. Ek olarak, farelerin fenotipik değişiklikleri de yorumlanmıştır.

Bu çalışmada, kullanılan maternal stresli fare modelinin etkinliğini değerlendirmek amacıyla üç farklı gruptaki farelerin ağırlıkları detaylı bir şekilde karşılaştırılmıştır (Şekil 4.2, 4.3). Yavruların vücut ağırlıkları PND1'den başlayarak PND35'e kadar her beş günde bir olmak üzere hassas terazi ile tartılmıştır. Bu sayede, yavruların ağırlıkları, PND1'den PND14'e kadar süren tüm maternal stres prosedürü boyunca ve stres prosedüründen sonra ötenazi yapılan güne kadar (PND15-PND35) izlenmiştir.

Çalışmanın erken aşamalarında (PND1-PND16), yavrular beslenme ihtiyaçlarını yalnızca anne sütüyle karşılıyordu. İlk 16 günde yavrular, beslenme açısından tamamen anne sütüne bağımlıdır (König ve Markl, 1987). Kemirgen yavruları ilk doğduklarında görme, işitme veya vücut ısını düzenleme yeteneklerine sahip değildir ve motor koordinasyonları kısıtlıdır (Yılmaz vd., 2023). Bu da doğal olarak annenin bakımına olan bağımlılıklarını göstermektedir. PND16'dan itibaren, dişlerin çıkmasıyla birlikte yavrular kendi kendilerine yemek yeme davranışını geliştirmeye başlamaktadır (Londei vd., 1988; Yılmaz vd., 2023). Bu süreç genellikle PND17 ile PND22 arasındaki süttten kesme döneminde gerçekleşmektedir (König ve Markl, 1987).

Doğum sonrası erken yaşam dönemi, laktasyon dönemi olarak tanımlanabilmektedir. Genel olarak, laboratuvar koşullarda laktasyon üç döneme ayrılmaktadır: erken, orta ve geç. Erken dönemi doğumdan PND6'ya kadar devam ederken, en yüksek maksimum süt üretimi dönemi olarak kabul edilen orta dönem PND7'den PND14'e kadar sürmektedir; geç dönem, PND15'ten başlayarak süt arzının azaldığı laktasyon dönemin sonuna kadar sürmektedir (Yılmaz vd., 2023). Laktasyon döneminin erken ve orta dönemi denk gelen dönemde (PND1-PND14) uyguladığımız öngörülme-yen anne ayrılığı stresinin, ağırlık takibi bulgularımızla desteklendiği ve hem erkek hem de dişi farelerin kilo almasına olumsuz yönde etkilediğini düşünmekteyiz.

Kontrol grubuna kıyasla hem MS grubu hem de MSUS grubu yavruların daha zayıf oldukları tespit edilmiştir. Hem MS grubu hem de MSUS grubu yavru fareler laktasyon dönemi boyunca her gün 3 saat annesinden ayrı kalmıştır. Beslenme

açısından anne sütüne bağımlı oldukları bu dönemde maruz kalınan anne ayrılığı stresine ek olarak bu yavrular anne sütünden de mahrum kaldıkları için MS ve MSUS grubu yavru fareler kontrol grubu farelerden daha zayıf olduklarını düşünmekteyiz.

Anne sütü miktarı, anne sütündeki besin içeriği veya emme sürecindeki anne-yavru bağı değişiklikleri, beslenmeye bağlı kilo değişikliklerinin faktörleri arasında yer almaktadır. Dr. Keziban KORKMAZ BAYRAM'ın yrtclğndeki önceki maternal stres çalışmasında, PND14'te, en yüksek sütü üretim dönemi olarak kabul edilen günde, stres grubundaki farelerin kontrol grubuna kıyasla anne sütü miktarında azalma gözlemlenmiştir (Yayımlanmamış veri). PND1, PND5, PND15'e kadar ağırlık takibi bulgularımıza baktığımızda, kontrole kıyasla MS ve MSUS grubunda PND15'te zayıflık gözlemlenmiştir (**şekil 4.2, şekil 4.3**). Bu duruma yol açan faktörler arasında, stres grubu yavruların aldıkları az sütü miktarı yanı sıra, anne sütünün içeriğinde de değişiklikler olabileceği de gelmektedir. Çalışmamızda, anne farelerdeki sütü bileşimi, laktasyonun erken dönemlerinde sütü bileşiminin analiz edilmesindeki zorluklar nedeniyle tam olarak belirtilmemiştir. İnsan sütünde olduğu gibi (Ballard ve Morrow, 2013) farelerde de fonksiyona bağlı olarak gün içinde ve laktasyon süresince bileşim değişiklik göstermektedir (Grs vd., 2009). PND1'den PND14'de kadar, gün içinde farklı zamanlarda uygulanan anne ayrılığının, yavruların alması gereken besin içeriklerini alamamasına neden olduğunu düşünmekteyiz. Ayrıca, anne sütünde stresle ilişkilendirilen biyomoleküllerin (taurin gibi) anneden yavruya geçmesinin mümkün olduğunu da bilinmektedir (Hu vd., 2000).

şıcanlar üzerinde yapılan bir çalışmada, normal yaşamlarında anne fareler, PND1 ile PND8 arasında günün %82'si yavrularıyla geçirirken, PND9 ile PND18 arasında ise günün %65'ini yavrularıyla geçirmektedirler. PND19'dan sonra ise, anne fareler yaklaşık olarak günün üçte birini yavrularıyla geçirmektedirler (Yılmaz vd., 2023). Bu bulgulara göre, PND9'dan itibaren anne fareler yavrularına daha az zaman ayırmıştır. Bizim de uyguladığımız anne ayrılığı, bu zamanın azalmasına ek olarak ekstra bir zaman düşüşüne neden olmuştur. Ancak, bu zaman azalışının anne farelerin yavrularına verdiği bakım açısından değişikliğe yol amadığı belirtilmiştir (Orso vd., 2019). Bulgularımıza göre, stres gruplarında anne ayrılığına bağlı olarak vücut ağırlığında azalma gözlemlenmiştir. Anne farelerin yavrularına verdikleri bakım zamanının azalmasının bu zayıflık ile ilişkili olabileceği akla gelebilir. Ancak, daha

önce kemirgenler üzerinde yapılan çalışmalar, anne ayrılığının, anne farelerin yavrularına verdiği bakımı azaltmadığını, aksine arttırdığını göstermiştir (Orso vd., 2019).

PND20, PND25, PND30 ve PND35 günlerinde yapılan vücut ağırlığı takibi bulgularına göre, MS grubu ve MSUS grubundaki yavrularda kontrol grubuna kıyasla düşük vücut ağırlığı gözlenmektedir. Bu farklılıklar, farklı anlamlılık düzeyleri ile, istikrarlı bir şekilde devam etmektedir (**Şekil 4.2, Şekil 4.3**). Eğer stres gruplarının düşük vücut ağırlığı sadece anne sütü miktarına bağlı olsaydı, PND15'ten sonra yapılan tartımlarda, yavrular kendi kendilerine yemeyi (*Self-feeding behaviour*) başlattıklarında, bu davranış düşük vücut ağırlığını telafi etmiş olmalı ve sonuç olarak daha ağır vücut ağırlığına neden olmuş olmalıydı. Ancak, bulgularımız, stres gruplarında düşük vücut ağırlığının, yavruların katı gıdaları tüketmeye başladıktan sonra bile kontrol grubuna kıyasla önemli düzeyde devam ettiğini göstermektedir. Bu durum, gözlenen zayıflığın sadece anne sütünden yoksun kalma faktörlerine bağlı olmadığını göstermektedir.

Çalışmamıza ilham veren I. Weiss ve arkadaşlarının (2011) *C57Bl/6J* farelerle yaptığı çalışmada, hem MS hem de MSUS grubundaki farelerin yavrularının normal şekilde büyüdüğü ve yetişkin olduklarında normal vücut ağırlığına sahip olduğu gözlemlenmiştir. Bu fareler annelerinden ayrılmış ve düzensiz anne bakımı almış olmalarına rağmen normal bir gelişim göstermişlerdir (Weiss vd., 2011). Onların çalışmasında, yavruların PND21, iki aylık ve üç aylık ağırlık verileri sunulmuştur. PND21'den önceki tartım verileri bulunmamaktadır. Kontrol ile stres grubu arasında ağırlık bulgularında herhangi bir anlamlılık saptanmamıştır (Weiss vd., 2011). Bizim çalışmamızda ise PND20 ve sonrasında stres gruplarında vücut ağırlığının kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak daha düşük olduğunu gözlemledik (**Şekil 4.2, Şekil 4.3**). S. Maghami ve arkadaşları (2018), PND1-PND21 boyunca her gün aynı saatte 3 saatlik anne ayrılığı uyguladıkları Wistar erkek sıçanlarda stres grubunun kontrol grubundan daha düşük kiloya sahip olduğunu tespit etmişlerdir. Stres grubundaki bu kilo farkı, PND13'ten itibaren PND21'e kadar istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde devam etmiştir (Maghami vd., 2018). T. de Almeida Magalhães ve arkadaşlarının (2018) çalışmasında, *C57BL* farelerde anne ayrılığı PND5 ile PND21 arasında günde altı saat boyunca, sabah 8 ile öğleden sonra 2 arasında yapılmıştır. MS grubundaki

yavru farelerin daha düşük kilo artışı gösterdiği tespit edilmiştir (de Almeida Magalhães vd., 2018). X. Wang ve arkadaşlarının (2022) çalışmasında, *C57BL* farelerde PND2'den PND15'e kadar her gün 3 saat boyunca anne ayrılığı yapıldığında, yavruların PND13'ten sonra önemli ölçüde kilo kaybı yaşadığı bulunmuştur (Wang vd., 2022). Wuertz-Kozak ve arkadaşları (2020), fare yavrularında PND7'den itibaren kontrol grubuna kıyasla MSUS grubunda düşük vücut ağırlığı tespit etmişlerdir (Wuertz-Kozak vd., 2020). Biz de literatürle uyumlu şekilde, MS ve MSUS grubu yavru farelerin vücut ağırlığında azalma olduğunu tespit etmiş bulunmaktayız (**Şekil 4.2, 4.3**).

MSUS grubu yavru farelerin MS grubundan çok daha zayıf oldukları da bulgularımız arasındadır (**Şekil 4.2, Şekil 4.3**). PND15'ten sonra arasındaki farklılıkların anlamlılık düzeyinde azalmasına rağmen, PND35'e kadar MSUS grubu farelerin MS grubundan daha zayıf oldukları gözlemlenmiştir. Görünen o ki, bu farelerin daha zayıf olmasının sebebi sadece anne ayrılığı değil, beraberinde MSUS grubu anne farelerin maruz kaldığı fiziksel kısıtlama stresi ve/veya zorunlu yüzme testidir. Doğumdan sonra erken dönemde anne farelere uygulanan fiziksel kısıtlama stresi üzerine yapılan çalışma, emzirme döneminde bu stres testinin erkek fare yavrularında yetersiz beslenmeden kaynaklanan düşük vücut ağırlığına neden olduğunu göstermiştir (Gao vd., 2011). Ayrıca, emziren farelerin yaşadığı kısıtlama stresinin yavrularına sağladıkları anne bakımını azalttığı tespit edilmiştir. Anne bakımındaki bu azalmanın, yavruların vücut ağırlığındaki zayıflıkla ilişkilendirildiği gözlemlenmiştir (Nishigawa vd., 2018). Çalışmamızda, anneye uyguladığımız zorunlu yüzme testinin etkisi tek başına incelenmemiş olsa da, MSUS annelerinde fiziksel kısıtlama stresi ve zorunlu yüzme testinin birleşik etkisinin yavrularında vücut ağırlığın azalmasına katkıda bulunduğunu düşünmekteyiz.

Bu çalışmada elde edilen vücut ağırlığı ile ilgili sonuçlar, hayvan stres modelinin etkinliğini gösterirken, fareler arasındaki fenotipik farklılıkların varlığı (**Şekil 4.1**) modelin geçerliliğini ve başarısını daha da desteklemektedir. Bu çalışmada yavruların kortikosteron seviyesinin ölçülmemiş olması çalışmamızın limitasyonlarından biridir. Ancak, kemirgenlerde erken yaşam safhasında maternal stresin yavruların serum ve plazma kortikosteron seviyesinin arttırabileceğine dair literatürde kanıtlar bulunmaktadır (Burenkova vd., 2020; Endo vd., 2021; Gareau vd., 2006).

Stresin doku homeostazisinde özellikle tüy büyümesinin ger ekle mesindeki etkileri bilinmektedir. İnsanlarda kortizol gibi farelerde de kortikosteron kıl follikülü kök hücrelerinin (HFSC) gelişiminde etkilidir. Kronik stres altında, artan kortikosteron seviyeleri HFSC'lerin dinlenme durumunu uzatarak kıl foliküllerinin dinlenme fazının uzamasına neden olabilmektedir (Choi vd., 2021). Kortikosteronun kıl follik l ndeki dermal papillaya etki ederek Growth arrest-specific 6 (*Gas6*) geninin ekspresyonunu baskıladığı ve bu sayede HFSC'lerin aktivasyonunu ve dolayısıyla kıl büyümesi inhibe ettiği gösterilmiştir (Choi vd., 2021). Özetle, kronik stres yanıtında kortikosteronun yükselmesi ile gözlenen kıl büyümesindeki azalma ve kıl fenotiplerindeki değişiklikler ilişkilidir. Bu durum, kortikosteronun normal kıl büyüme döngüsü üzerinde olumsuz bir etkiye sahip olabileceğini ve potansiyel olarak kıl folikül kök hücrelerinin aktivasyonunu engelleyebilece ini düşündürmektedir.

Tüy de i ikliklerine ek olarak, MS ve MSUS grubu farelerin sakrifikasyon gününde kafataslarının kontrol grubuna kıyasla daha elastik olduğu tespit edilmiştir.  nceki  alı malar, erken yaşam döneminde stresin kemik belirteçlerinde anormalliklere ve iskelet büyümesinde sorunlara yol açabileceğini vurgulamıştır (Pappalardo vd., 2023). Karin Wuertz-Kozak ve arkadaşları (2020), *C57BL/6J* fare ile erken yaşam stresinin kemik sağlığı üzerindeki etkilerini incelemiştir.  alı masında PND1-PND14 anne ayrılığı uygulanmış ve yavru fareler 8–10 aylık olduklarında farelerin kemiklerinde nöronal reseptörlerin (neuropeptide Y receptor Y1, *Npy1r*; vasoactive intestinal peptide receptor 1, *Vipr1*; tachykinin receptor 1, *Tacr1*) gen ekspresyonunun MSUS grubunda düşük olduğu, nöronal ligandların (Nerve growth factor, *Ngf*) gen ekspresyonunun MSUS grubunda düşük olduğu bulunmuştur. Bu durumun yüksek kemik dönüşümünü (*bone turnover*) teşvik edip düşük kemik yo unlu una (*bone density*) neden olabileceği vurgulanmıştır. Bununla birlikte, kemik metabolizmasındaki değişiklikleri de incelenmiştir. Kemik rezorpsiyonun bir belirtici olan c-terminal telopeptide of type I collagen (CTX-1) MSUS serumda yüksek bulunmuştur (Wuertz-Kozak vd., 2020). Kemik rezorpsiyonu, hem kemik mineralinin erimesini hem de organik kemik matrisinin parçalanmasını içeren bir süreçtir (Maes ve Kronenberg, 2016). Çalışmamızdaki *BALB/c* fareler, cinsel olarak olgunla madan önce, PND35 gününde (be  haftalıkken) sakrifiye edilmiştir. MSUS grubu farelerin kafatasında gözlenen fenotipik değişiklikler, Karin Wuertz-Kozak ve ekibinin çalışmasında belirtilenden çok daha erken bir zamanda gözlemlenmiştir.

Çalışmamızda, erken yaşam aşamasında beklenmeyen anne ayrılığı ve beklenmeyen anne stresinin neden olduğu kronik stresin, yavruların yetişkinlik dönemine ulaşırken hipokampus dokusundaki apoptozis ile ilgili genler üzerindeki etkilerini araştırmayı amaçladık. Bu amaçla, *Bax* (Şekil 4.4), *Bcl2* (Şekil 4.5), *TP53* (Şekil 4.7) ve *Casp3* (Şekil 4.6) mRNA ekspresyon düzeylerini inceledik. Daha önce yapılan çalışmalarda, çeşitli zaman aralıklarında anne ayrılığına maruz kalan sıçanlar ve farelerde, hipokampusta artmış apoptotik hücre ölümüne neden olduğu sıkça rapor edilmiştir (Baek vd., 2011; Fabricius vd., 2008; Lee vd., 2001; S. Yang vd., 2017). Şu anda, çalışmamıza benzer bir maternal stres modelini kullanan ve hem proapoptotik *Bax*'ın azalması hem de pro-survival *Bcl2*'nin artması bulgusunu gösteren bir çalışma mevcut değildir. Bununla birlikte, kısa süreli ancak tekrarlanan neonatal anne ayrılığı yaşayan farelerin, yetişkin farelerde artan *Bcl2* mRNA ekspresyonu ile hipokampal komplekste proapoptotik sinyale karşı daha az duyarlı olduğunu gösteren bir çalışma vardır (Coccurello vd., 2014). Erken yaşamda maternal stres, kronik stresi tetikleyerek yüksek kortikosteron seviyelerine yol açmaktadır. Hayvanlarda aşırı kortikosteron maruziyeti, hipokampal disfonksiyon ve nöron kaybı ile bağlantılıdır. Kortikosteron tarafından tetiklenen apoptozu beklerken, şaşırtıcı bir şekilde bulgularımız apoptozun düşük olduğunu göstermiştir. Çalışmamızda, erken yaşta anne ayrılığı yaşayan 5 haftalık fareler (MS, $p = 0,0005$) ve anne ayrılığına ek olarak dolaylı olarak anne stresi yaşayan fareler (MSUS, $p = 0,0057$) kontrol grubundakilere kıyasla hipokampal antiapoptotik *Bcl2* ekspresyonunda artış göstermiştir. Bununla birlikte, proapoptotik *Bax* ekspresyonu MS grubunda belirgin bir şekilde azalırken ($p = 0,0464$), MSUS grubunda azalma eğilimi görülmüş, ancak istatistiksel olarak anlamlılık tespit edilmemiştir. *TP53* ekspresyonu kontrol ile kıyasla MSUS grubunda anlamlı olarak artarken ($p = 0,0413$), MS grubunda ise istatistiksel olarak anlamlı olmamasına rağmen artış saptanmıştır. *Casp3* mRNA ekspresyonunda ise gruplar arasında belirgin bir fark gözlenmemiştir.

Normal koşullar altında (stres olmadan), yeni nöronlar oluşarak nörojenik beyin bölgelerine eklenmektedir, ancak aynı zamanda elimine etme mekanizmaları da bulunmaktadır. Apoptoz, postnatal ve yetişkin beyinlerdeki nörojenik bölgelerde gözlemlenmiştir. Dentat girusta apoptoz gözlemlenmiş olup, yeni nöronların oluşumu ile yakından bağlantılıdır (Kuhn, 2015). Dentat girusta, çoğu apoptotik hücre

olgunlaşmamış olup, bölünen progenitörlerin bulunduğu subgranüler bölgede (SGZ) yer almakta ve doublecortin (DCX) gibi belirteçlerle birlikte boyanarak gösterilmektedir (Kuhn, 2015). Postnatal dönemde dentat girusta oluşan nöronlar, daha yüksek eliminasyon frekanslarına maruz kalmaktadır. Kaspaz-bağımlı apoptozun, nörojenik nişlerde hücre ölümüne büyük ölçüde katkıda bulunduğu düşünülmektedir. *In vivo* kaspaz inhibitörleri ile tedavi, yeni oluşturulan nöronların hayatta kalma oranını artırmaktadır. Bax eksikliği olan fareler, dentat girusta daha yüksek sayıda nöronal progenitör hücreye ve daha yüksek nörogenez oranına sahip olup, daha az hücre ölümü göstermektedir. Bax eksikliği olan farelerin dentat girusunda, eliminasyon süreçlerinin yokluğunda, biriken granüler hücreler somatik atrofi, azalmış dendritik karmaşıklık ve bozulmuş sinaptik bağlantılar sergilemektedir. Bu durum, programlanmış hücre ölümünün normal hipokampal olgunlaşmayı sağlamak için önemli olduğunu vurgulamaktadır. Bcl-2 ekspresyonu da yetişkin beyinde nörogenezle yakından ilişkilidir ve SVZ ve dentat girusta yüksek seviyelerde bulunmaktadır. Bax eksikliğine benzer şekilde, Bcl-2'nin nöronal hücrelerde transgenik aşırı ekspresyonu, nöronal progenitör hücrelerin azalan hücre ölümü nedeniyle hipokampal nörogenezde artışa neden olmaktadır (Kuhn, 2015).

Bcl2 artışı, nöroproteksiyon sağlayabilir ve erken yaşta anne ayrılığı stresinin yol açtığı stresin bir savunma ve telafi mekanizmasını temsil edebilir. *Bcl2*'nin apoptotik ölüm kaskadında rol aldığı çeşitli mekanizmalara karşı koruma sağladığı bilinmektedir. Apoptoz yaşayan hücrelerde, sitozolde sitokrom c'nin arttığı ve mitokondride buna karşılık gelen bir azalma olduğu belirlenmiştir. Bcl-2'nin fazla ifade edilmesi, mitokondriden sitokrom c'nin salınımını engelleyerek ve apoptozun başlamasını önleyerek koruyucu bir rol oynayabilir. Bu nedenle, Bcl-2'nin apoptozu engellemedeki potansiyel rolü, mitokondriden sitokrom c salınımını durdurmak olabilmektedir (Schwarz vd., 2001; J. Yang vd., 1997). Bu durumda, BAX gibi hücre ölümünü tetikleyen faktörlerin etkinleşimini engelleyerek, *Bax*'ın gen ifadesi düzeylerinde azalma meydana gelebilir; bu da *Casp3* gibi hücre ölümünü hızlandıran faktörlerin aktive olmasını engeliyor olabilir. *Casp3* gen ifadesinde gruplar arasında bir farklılık olmamasına rağmen, bulgularımız, *Bax* ifadesinin hem *Casp3* hem de *Tp53* ifadeleri ile birlikte artma eğiliminde olduğunu göstermiştir (sırasıyla $p<0,0001$, $p<0,0001$) (**Şekil XXX**). Ayrıca, *Tp53* ifadesinin *Casp3* ifadesi ile birlikte arta

eğiliminde saptanmıştır ($p=0,0007$). *Bax*, *Tp53* ve *Casp3* genlerinin birlikte artması, hücre ölümünün gerçekleştiğini gösteren bir belirtidir.

Sonuçlarımızın *Bcl2*, *Bax*, *Tp53* ve *Casp3* gen ekspresyon profilleriyle ilgili olası apoptoz yollarını araştırdık. Bu bağlamda NF-kappa B sinyal yolu, p53 sinyal yolu ve apoptoz gibi çeşitli yollar değerlendirilmiştir (Kanehisa, 2019; Kanehisa vd., 2023; Kanehisa ve Goto, 2000).

Erken dönem stres geçmişi olan bireylerin akut stres durumlarında daha yüksek inflamatuvar tepkiler ve genel olarak daha fazla periferik pro-iltihabi sinyal gösterdiğini gösteren birçok çalışma bulunmaktadır. Tekrarlanan Anne Ayrılığı (MS) yaşayan hayvanlarda ise, insan psikiyatrik bozukluklarla ilişkilendirilen kritik beyin bölgelerinde artan mikrogial aktivasyon ve yüksek pro-iltihabi sitokin sinyali gözlemlenmiştir (Dutcher vd., 2020). Ethan G. Dutcher ve arkadaşlarının (2020) kapsamlı bir sistemik derlemesine göre, anne ayrılığı (MS) uygulamasının sonuçları incelenmiştir. Bu derlemede, MS uygulamasının sonlandırılmasından sonraki 3 haftalık ve daha uzun süreli etkileri "short-term" ve "long-term" terimleriyle sınıflandırılmıştır. Kısa vadeli etkilerde, fare ve sıçan yavruları da dahil olmak üzere hayvanlarda, hippocampal IL-1 β ve TNF- α mRNA seviyelerinde artış gözlenmiştir. Uzun vadeli etkiler ise, zorunlu yüzme testi gibi sonraki yaşam stresi (*later-life stress*) ile birlikte, hippocampal IL-1 β ve TNF- α 'nın arttığını göstermiştir. Bu sonuçlar, MS uygulanan hayvanların genellikle kontrol grubuna kıyasla hipokampuslarında daha fazla pro-iltihabi sitokin ifade profili sergilediğini göstermektedir (Dutcher vd., 2020). Çalışmamızda, örnekler, Anne Ayrılığı (MS) döneminin son gününden sonra geçen 3 hafta içinde alınmış ve incelenmiştir. Bulgularımıza göre, MS ve MSUS gruplarında *Bcl2* mRNA ifadesinde artış olduğunu tespit ettik. Bu artışın, NF-kappa B sinyal yolundan kaynaklanan Tnf- α ve IL-1 β artışıyla ilişkili olabileceğini düşünmekteyiz. Transkripsiyon faktörleri molekülleri NF- κ B ailesi, yetişkin hipokampal nörogenezin düzenlenmesinde rol oynayabilir (Bortolotto vd., 2014). NF- κ B'nin aktivasyonu, hücrenin hayatta kalmasını sağlayan *Bcl2* gibi genlerin ifadesine yol açarak, hücrenin apoptoz yerine hayatta kalmayı tercih ediyor olabileceğini düşünmekteyiz.

Çalışmamızda, *Tp53* mRNA ekspresyonunun kontrol grubuna kıyasla MS grubunda yüksek, MSUS grubunda ise anlamlı derecede yüksek olduğu saptanmıştır

($p = 0,0413$). *Tp53*, hücre ölümünü teşvik ederek tümörleri baskılamakta ve bu aktiviteyi doğrudan tümör baskılayıcı işlevine bağlamaktadır (Hemann ve Lowe, 2006). Normalde, p53, hücre ölümünü p53 sinyal yolunu kullanarak indüklemek için pro-apoptotik proteinlerin, örneğin Bax'ın, ifadesini teşvik etmekte ve anti-apoptotik proteinlerin, örneğin Bcl-2'nin inhibisyonunu sağlamaktadır. p53 aracılığıyla Bax ve Bcl-2 protein seviyesi oranının düzenlenmesi, bir hücrenin stres yanıtında kaderini etkileyebilmektedir (Hemann ve Lowe, 2006). *Tp53*, temel bir tümör baskılayıcı proteindir ve bir hücrenin stres altında apoptoz (programlanmış hücre ölümü) geçirip geçirmeyeceğini belirlemede kritik bir rol oynamaktadır. Bu karar, Bax ve Bcl-2 proteinleri arasındaki denge tarafından etkilenmektedir. Daha yüksek bir Bax/Bcl-2 oranı apoptozu tercih etmekte ve hasarlı hücrelerin yok edilmesine yol açmaktadır, bu da tümör oluşumuna karşı koruyucu bir mekanizmadır. Tersine, daha düşük bir Bax/Bcl-2 oranı hücrenin hayatta kalmasını tercih etmektedir (Gottlieb ve Babior, 1997), bu kısa vadeli olarak yararlı olabilir ancak hasarlı hücrelerin varlığını sürdürmesine ve potansiyel olarak kanser geliştirmesine izin verebilmektedir. BCL-2 proteini, BCL-2 protein ailesindeki en belirgin anti-apoptotik protein olarak bilinmektedir. BCL2, apoptozu inhibe ederek, tümör hücrelerinin yaşam süresini uzatır ve hücrelerin malign dönüşümüne neden olmaktadır (Qian vd., 2022). Çalışmamızda, kanser hücresi gelişimi gözlemlerimizin içinde yer almamaktadır. *Bcl2*'nin artışı, eğer kanser hücreleri varsa olumsuz bir anlam taşıyabilir, ancak çalışmamız süresince kanser oluşumu doku çıkarma sırasında (tüm iç organlar incelenmiştir) tespit edilememiş olması, *Bcl2*'nin aşırı ifadesinin koruyucu amaçlı olabileceğini düşündürmüştür.

Stendardo M. ve arkadaşları (2023) emziren annelerde oksitosin reseptörü fonksiyonunu inhibe ederek, p53 *knockout* farelerde anne bakımının bozulmasına yol açan yeni bir erken yaşam stresi modeli oluşturmuştur. Çalışmaları, bu annelerin yavrularının yaşamlarının ilerleyen dönemlerinde yüksek kortizol seviyeleri, kısalmış yaşam süresi ve kemik iliği hücrelerinde artmış tümörjenik potansiyel sergilediklerini ortaya koymuştur. Dikkat çekici bir şekilde, bu olumsuz sonuçlar sonraki nesiller boyunca da devam etmiştir (Stendardo vd., 2023). Bu durumda, hücresel hasarın ardından, p53 ifadesi, koruyucu bir yanıt olarak hizmet ediyor olabilir ve ana apoptotik proteinlerin, örneğin Bax ve Casp3 gibi proteinlerin ekspresyonunu artırabilir. Bildiğimiz kadarıyla, anne ayrılığı stresinin 5 haftalık farelerin hipokampusundaki

tümör oluşumunu etkilediğine dair bir kanıt bulunmamaktadır. On bir-on üç haftalık dişi C57BL/6 farelerde yapılan bir çalışmada, doğumdan sonra ilk iki haftada günde 60 dakika boyunca anne ayrılığı stresine maruz kalan farelere PND62 gününde melanoma hücreleri verilmiştir. Bulgular, erken yaşam stresinin tümör proliferasyonunu ve apoptozu etkileyen mekanizmalar yoluyla melanom ilerlemesini hızlandırdığını ve çocukluk döneminde yaşanan olumsuz deneyimler ile kanser ilerlemesi arasında bir bağlantı olduğunu göstermektedir (Barreto vd., 2021).

Çalışmamızda, *p53*'ün artışı, yüksek *Bcl-2* seviyelerinin belirlediği anti-apoptotik eşiği aşmak için yeterli olmayabilir. Bilindiği üzere, *p53*'ün tam apoptotik yeteneği, bir dizi pro-apoptotik hedefin bir araya gelerek transkripsiyonel olarak aktive edilmesiyle gerçekleşmektedir (Hemann ve Lowe, 2006). *Pro-death* efektörünün etkisizleştirilmesi apoptotik eşiği düşürebilir (Hemann ve Lowe, 2006). Dolayısıyla çalışmamız, stres grubundaki *p53* artışının, hipokampusta apoptozisi teşvik etmede yetersiz kalabileceğini vurgulamaktadır. Bununla birlikte, *p53*'ün hücre yaşlanma veya hücre döngüsü durdurma gibi çeşitli hücre streslere yanıt vermede önemli olduğu da unutulmamalıdır (Hemann ve Lowe, 2006). Ayrıca, *Casp3* mRNA ekspresyonunda gruplar arasında farklılık olmaması (**Şekil 4.6**), anne ayrılığı modelinde hipokampusta apoptozisin gerçekleşmediğini düşündürülebilir.

K. Ohta ve arkadaşlarının (Ohta vd., 2017) (2017) sıçan yavrularını, PND2-PND20 arasında anne ayrılığına maruz bırakarak yaptıkları çalışmada, hipokampusta PND7'de ERK1/2 fosforilasyonunun belirgin şekilde azaldığı gösterilmiştir. Ancak PND14 ve PND21 günlerinde, ERK1/2 protein ekspresyonunda anlamlılık göstermese de bir artış tespit edilmiştir. ERK1/2 fosforilasyonunun, pro-survival ile ilişkili *Bcl2* ekspresyonu üzerinde dolaylı bir etkisi bulunmaktadır. Çalışmamızda, PND35'te hipokampusta *Bcl2* artışının, hücrenin hayatta kalma sinyal yolağındaki ERK1/2 fosforilasyonu sonucu olmuş olabileceği durumu tahminlerimiz arasındadır.

Özet olarak, PND1'den PND14'e kadar olan süreçte maruz kalınan öngörülme-yen anne ayrılığı ve anne stresi, fare yavrularının vücut ağırlığını etkileyerek daha düşük vücut ağırlığına yol açmaktadır. Kontrol, MS ve MSUS gruplarındaki vücut ağırlığı verileri arasında önemli farklılıklar gözlenmiştir (**Şekil 4.2** and **Şekil 4.3**). Özellikle, MS ve MSUS grupları kontrol grubuna kıyasla daha düşük

vücut ağırlığına sahiptir; MS ve MSUS grupları arasında da vücut ağırlığında önemli farklar vardır ve MSUS grubunun vücut ağırlığı MS grubundan daha düşüktür.

Ek olarak, stres altındaki gruplarda kıl yapısında ve kemikte belirgin fenotipik farklılıklar gözlenmiş, bu da stres altındaki fare modelinin başarısını teyit etmiştir. Bulgularımız ayrıca, hipokampusta stresin *Bcl2* ve *Tp53* mRNA ifadesinin anlamlı olarak artışı ve *Bax* ifadesinin anlamlı olarak azalmasına neden olduğunu göstermiştir. Fakat, stres modelimiz *Casp3* mRNA ifadesinde gruplar arası farklılıklara neden olmamıştır. Bu çalışmadan elde edilen qPCR sonuçları, yaşamın erken dönemlerinde anne ayrılığına ve anne stresine maruz kalan yavruların hipokampusunda apoptozla ilişkili genlerin (*Bax*, *Bcl2*, *Tp53* ve *Casp3*) mRNA ifade düzeylerini değiştirebileceğini göstermektedir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Maternal stresli fare modelimiz ile (Gapp vd., 2014; Weiss vd., 2011) yavrular üzerinde başarılı bir şekilde stres oluşturmuş ve etkinliği farelerin düşük vücut ağırlığı ve fenotipik farklılıklarla desteklenmiştir. Erken yaşam döneminde maternal stres, beş haftalık *BALB/c* farelerinin hipokampusunda pro-survival gen mRNA ekspresyonunda artışa ve pro-apoptotik gen mRNA ekspresyonunda azalmaya önemli bir etkiye sahiptir. Bu gen ifade profilleri, her iki cinsiyette de benzer şekilde tespit edilmiştir. Bu gen ifade değişiklikleri, apoptoza karşı koruyucu bir mekanizma olarak işlev görüyor olabilir.

Çalışmamız, erken yaşam döneminde maternal stresin yavruların gelişiminde önemli değişikliklere yol açtığını göstermiştir; bu da maternal stres dönemi boyunca ve sonrasında yavruların belirgin şekilde daha düşük vücut ağırlığına sahip olmasına yol açtığını ortaya koymuştur. Ayrıca, yavruların tüy özelliklerinde değişiklikler gözlemlenmiştir; bu da erken dönemde maruz kalınan stresin uzun vadeli etkilerini daha da vurgulamaktadır. Bu değişikliklerin anne sütündeki biyomoleküller aracılığıyla yavrulara geçerek meydana geldiği düşünülmektedir.

Gelecekte yapılacak çalışmalarda, stres dönemi ve stres sonrası dönemde kortikosteron seviyelerini ve anne sütü bileşenlerini ölçmenin, stresin fizyolojik tepkisini daha iyi anlamamıza yardımcı olabileceğini düşünüyoruz. Ayrıca, maternal stres modelinde sadece zorunlu yüzme testlerine maruz kalan bir grup veya sadece kısıtlama stresine maruz kalan bir grup gibi belirli stresörlerle deneysel grupların dahil edilmesinin, ek düzenleyici faktörleri daha iyi anlamamıza katkı sağlayabileceğini düşünüyoruz.

Ayrıca, pro-survival yolaktaki genlerin mRNA ve miRNA ekspresyon düzeylerini araştırmak altta yatan mekanizmaları anlamamıza değerli bir katkı sağlayabilir.

Bununla birlikte, nörojenez seviyesinin incelenmesi gerektiğine inanıyoruz. Bu şekilde, yüksek nörojenezin arkasındaki etkenin azalan apoptozis mi yoksa hücre çoğalmasının mı olduğunu belirleyebiliriz. Ayrıca immunohistokimyasal boyamalar

ve western blot gibi tekniklerin de çalışmaya dahil edilmesinin proteinlerle ilgili yorum yaparken güvenilir bilgi sağlayacağını düşünmekteyiz.

Eğer tüm kan örneklerinde, hipokampusta olduğu gibi genlerin mRNA ekspresyon profili benzer ise, *Bcl2*, *Tp53* ve *Bax*'ın erken dönemde maruz kalınan stresi belirlemek için potansiyel biyobelirteçler olabileceğini getirmektedir. Ancak, bu belirteçlerin etkinliğini doğrulamak ve bu stresin etkilerini doğru bir şekilde değerlendirmek için insan ile yapılan çalışmaları da kapsayacak şekilde daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. *Bcl2*, *Tp53* ve *Bax*'ın mRNA ekspresyon düzeylerinin farelerin yetişkin olduktan sonra ve ardışık nesiller boyunca incelenmesi sonucu, bu transkriptlerin benzer şekilde varlığı gerçekten erken yaşam anne stresini tespit etmek için biyobelirteç olarak kullanılabilişliğinin belirlenmesine yardımcı olabilir.

Genel olarak, araştırmamız erken yaşamdaki stresin kalıcı etkilerine ışık tutmakta ve gelecekteki çalışmaların, biyobelirteçler, nleme yöntemleri ve stresle ilişkili bozukluklarda rol oynayan moleküler yolları incelemesine olanak sağlamaktadır.

7. KAYNAKLAR

- Alonso, C., Guilarte, M., Vicario, M., Ramos, L., Ramadan, Z., Antolín, M., Martínez, C., Rezzi, S., Saperas, E., Kochhar, S., Santos, J., & Malagelada, J. R. (2008). Maladaptive intestinal epithelial responses to life stress may predispose healthy women to gut mucosal inflammation. *Gastroenterology*, 135(1). <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.03.036>
- Ambeskovic, M., Roseboom, T. J., & Metz, G. A. S. (2020). Transgenerational effects of early environmental insults on aging and disease incidence. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 117, 297–316. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2017.08.002>
- Amin, M. N., & Ahmad, M. (2018). A study on assessment of stress and its management in hospital employess. *International Journal of Indian Psychology*, 6(1). <https://doi.org/10.25215/0601.501>
- Baek, S. Bin, Bahn, G., Moon, S. J., Lee, J., Kim, K. H., Ko, I. G., Kim, S. E., Sung, Y. H., Kim, B. K., Kim, T. S., Kim, C. J., & Shin, M. S. (2011). The phosphodiesterase type-5 inhibitor, tadalafil, improves depressive symptoms, ameliorates memory impairment, as well as suppresses apoptosis and enhances cell proliferation in the hippocampus of maternal-separated rat pups. *Neuroscience Letters*, 488(1), 26–30. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2010.10.074>
- Ballard, O., & Morrow, A. L. (2013). Human milk composition: Nutrients and bioactive factors. *Pediatric Clinics of North America*, 60(1), 49–74. <https://doi.org/10.1016/j.pcl.2012.10.002>
- Barreto, F. S., Ribeiro, W. L. C., Cavalcanti, B. C., Silva, P. G. de B., Soares de Sousa, C. N., Vasconcelos, G. S., Nunes, A. P. N., Moraes Filho, M. O. de, & Macedo, D. S. (2021). Early maternal separation enhances melanoma progression in adult female mice by immune mechanisms. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1502(1), 40–53. <https://doi.org/10.1111/nyas.14625>
- Berdanier, C. D., & Freake, H. C. (2005). Nutrient-gene interactions | Molecular aspects. *Encyclopedia of Human Nutrition*, 269–276. <https://doi.org/10.1016/B0->

- Bian, Y., Ma, Y., Ma, Q., Yang, L., Zhu, Q., Li, W., & Meng, L. (2021). Prolonged maternal separation induces the depression-like behavior susceptibility to chronic unpredictable mild stress exposure in mice. *BioMed Research International*, 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/6681397>
- Bortolotto, V., Cuccurazzu, B., Canonico, P. L., & Grilli, M. (2014). NF-κB mediated regulation of adult hippocampal neurogenesis: Relevance to mood disorders and antidepressant activity. *BioMed Research International*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/612798>
- Brady, H. J. M., & Gil-Gómez, G. (1998). Molecules in focus box. The pro-apoptotic Bcl-2 family member, bax. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 30(6), 647–650. [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(98\)00006-5](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(98)00006-5)
- Bratton, S. B., & Salvesen, G. S. (2010). Regulation of the Apaf-1–caspase-9 apoptosome. *Journal of Cell Science*, 123(19), 3209–3214. <https://doi.org/10.1242/JCS.073643>
- Buccitelli, C., & Selbach, M. (2020). mRNAs, proteins and the emerging principles of gene expression control. *Nature Reviews Genetics*, 21, 630–644. <https://doi.org/10.1038/s41576-020-0258-4>
- Burenkova, O. V., Averkina, A. A., Aleksandrova, E. A., & Zarayskaya, I. Y. (2020). Brief but enough: 45-min maternal separation elicits behavioral and physiological responses in neonatal mice and changes in dam maternal behavior. *Physiology and Behavior*, 222, 112877. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2020.112877>
- Chandra, D., Bratton, S. B., Person, M. D., Tian, Y., Martin, A. G., Ayres, M., Fearnhead, H. O., Gandhi, V., & Tang, D. G. (2006). Intracellular nucleotides act as critical prosurvival factors by binding to cytochrome c and inhibiting apoptosome. *Cell*, 125(7), 1333–1346. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.05.026>
- Chauhan, P., Jethwa, K., Rathawa, A., Chauhan, G., & Mehra, S. (2021). The anatomy of the hippocampus. *Cerebral Ischemia*, 17–30. <https://doi.org/10.36255/exonpublications.cerebralischemia.2021.hippocampus>
- Chocyk, A., Dudys, D., Przyborowska, A., Majcher, I., Maćkowiak, M., &

- Weogonekdzony, K. (2011). Maternal separation affects the number, proliferation and apoptosis of glia cells in the substantia nigra and ventral tegmental area of juvenile rats. *Neuroscience*, 173, 1–18. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROSCIENCE.2010.11.037>
- Choi, S., Zhang, B., Ma, S., Gonzalez-Celeiro, M., Stein, D., Jin, X., Kim, S. T., Kang, Y. L., Besnard, A., Rezza, A., Grisanti, L., Buenrostro, J. D., Rendl, M., Nahrendorf, M., Sahay, A., & Hsu, Y. C. (2021). Corticosterone inhibits GAS6 to govern hair follicle stem-cell quiescence. *Nature*, 592(7854), 428–432. Springer US. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03417-2>
- Cimino, S., & Cerniglia, L. (2023). Impact of maternal-newborn separation in italian women with suspected COVID-19 infection on psychopathological symptoms and quality of interactions during breastfeeding. *Psychopathology*, 56(5), 1. <https://doi.org/10.1159/000528410>
- Coccurello, R., Bielawski, A., Zelek-Molik, A., Vetulani, J., Kowalska, M., D'Amato, F. R., & Nalepa, I. (2014). Brief maternal separation affects brain α 1-adrenoceptors and apoptotic signaling in adult mice. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 48, 161–169. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2013.10.004>
- Costa, V., Lugert, S., & Jagasia, R. (2015). Role of adult hippocampal neurogenesis in cognition in physiology and disease: pharmacological targets and biomarkers. In: Kantak, K., Wettstein, J. (eds) *Cognitive Enhancement. Handbook of Experimental Pharmacology*, (vol 228, 99–155). Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-16522-6_4
- Cotella, E. M., Mestres Lascano, I., Franchioni, L., Levin, G. M., & Suárez, M. M. (2013). Long-term effects of maternal separation on chronic stress response suppressed by amitriptyline treatment. *Stress*, 16(4), 477–481. <https://doi.org/10.3109/10253890.2013.775241>
- D, L.-T., Vukovic, O., & Stepanovic, J. (2011). Stress and personality. *Psychiatriki*, 22(4), 290–297. https://www.researchgate.net/publication/221772331_Stress_and_Personality
- Dai, S., Mo, Y., Wang, Y., Xiang, B., Liao, Q., Zhou, M., Li, X., Li, Y., Xiong, W.,

- Li, G., Guo, C., & Zeng, Z. (2020). Chronic stress promotes cancer development. *Frontiers in Oncology*, 10(August), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.01492>
- Dai, Z., & Lai, J. R. (2019). Isolation of synthetic antibodies against BCL-2-Associated X Protein (BAX). *Methods in Molecular Biology*, 1877, 351–357. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8861-7_21
- Daun, K. A., Fuchigami, T., Koyama, N., Maruta, N., Ikenaka, K., & Hitoshi, S. (2020). Early maternal and social deprivation expands neural stem cell population size and reduces hippocampus/amygdala-dependent fear memory. *Frontiers in Neuroscience*, 14, 483850. <https://doi.org/10.3389/FNINS.2020.00022/BIBTEX>
- de Almeida Magalhães, T., Correia, D., de Carvalho, L. M., Damasceno, S., & Brunialti Godard, A. L. (2018). Maternal separation affects expression of stress response genes and increases vulnerability to ethanol consumption. *Brain and Behavior*, 8(1), 1–17. <https://doi.org/10.1002/brb3.841>
- Drastichova, Z., Rudajev, V., Pallag, G., Novotny, J., Drastichova, Z., Rudajev, V., Pallag, G., & Novotny, J. (2021). Proteome profiling of different rat brain regions reveals the modulatory effect of prolonged maternal separation on proteins involved in cell death-related processes. *Biological Research*, 54(1), 4. <https://doi.org/10.1186/S40659-021-00327-5>
- Dutcher, E. G., Pama, E. A. C., Lynall, M.-E., Khan, S., Clatworthy, M. R., Robbins, T. W., Bullmore, E. T., & Dalley, J. W. (2020). Early-life stress and inflammation: A systematic review of a key experimental approach in rodents. *Brain and Neuroscience Advances*, 4, 1–11. <https://doi.org/10.1177/2398212820978049>
- Endo, N., Makinodan, M., Mannari-Sasagawa, T., Horii-Hayashi, N., Somayama, N., Komori, T., Kishimoto, T., & Nishi, M. (2021). The effects of maternal separation on behaviours under social-housing environments in adult male C57BL/6 mice. *Scientific Reports*, 11(1):527, 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80206-3>
- Erekat, N. S. (2018). Apoptosis and its role in Parkinson's disease. *Parkinson's Disease: Pathogenesis and Clinical Aspects*, 65–82. <https://doi.org/10.15586/CODONPUBLICATIONS.PARKINSONSDISEASE.2>

- Fabricius, K., Wörtwein, G., & Pakkenberg, B. (2008). The impact of maternal separation on adult mouse behaviour and on the total neuron number in the mouse hippocampus. *Brain Structure & Function*, 212(5), 403–416. <https://doi.org/10.1007/S00429-007-0169-6>
- Fenoglio, K. A., Brunson, K. L., & Baram, T. Z. (2006). Hippocampal neuroplasticity induced by early-life stress: Functional and molecular aspects. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 27(2), 180–192. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2006.02.001>
- Fink, G. (2009). Stress: Definition and history. *Encyclopedia of Neuroscience*, October, 549–555. <https://doi.org/10.1016/B978-008045046-9.00076-0>
- Flurkey, K., Currer, J. M., & Harrison, D. E. (2007). Mouse Models in Aging Research. *The Mouse in Biomedical Research*, 3, 637–672. <https://doi.org/10.1016/B978-012369454-6/50074-1>
- Franklin, T. B., Linder, N., Russig, H., Thöny, B., & Mansuy, I. M. (2011). Influence of early stress on social abilities and serotonergic functions across generations in mice. *PLOS ONE*, 6(7), 1–7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021842>
- Gallagher, H. C., Richardson, J., Forbes, D., Harms, L., Gibbs, L., Alkemade, N., Macdougall, C., Waters, E., Block, K., Lusher, D., Baker, E., & Bryant, R. A. (2016). Mental health following separation in a disaster: The role of attachment. *Journal of Traumatic Stress*, 29(1), 56–64. <https://doi.org/10.1002/JTS.22071>
- Galluzzi, L., Bravo-San Pedro, J. M., Vitale, I., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Adam, D., Alnemri, E. S., Altucci, L., Andrews, D., Annicchiarico-Petruzzelli, M., Baehrecke, E. H., Bazan, N. G., Bertrand, M. J., Bianchi, K., Blagosklonny, M. V., Blomgren, K., Borner, C., Bredesen, D. E., Brenner, C., ... Kroemer, G. (2014). Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015. *Cell Death & Differentiation*, 22(1), 58–73. <https://doi.org/10.1038/cdd.2014.137>
- Gao, P., Ishige, A., Murakami, Y., Nakata, H., Oka, J. I., Munakata, K., Yamamoto, M., Nishimura, K., & Watanabe, K. (2011). Maternal stress affects postnatal growth and the pituitary expression of prolactin in mouse offspring. *Journal of*

Neuroscience Research, 89(3), 329–340. <https://doi.org/10.1002/jnr.22550>

- Gapp, K., Bohacek, J., Grossmann, J., Brunner, A. M., Manuella, F., Nanni, P., & Mansuy, I. M. (2016). Potential of environmental enrichment to prevent transgenerational effects of paternal trauma. *Neuropsychopharmacology*, 41(11), 2749–2758. <https://doi.org/10.1038/npp.2016.87>
- Gapp, K., Soldado-Magraner, S., Alvarez-Sánchez, M., Bohacek, J., Vernaz, G., Shu, H., Franklin, T. B., Wolfer, D., & Mansuy, I. M. (2014). Early life stress in fathers improves behavioural flexibility in their offspring. *Nature Communications*, 5. <https://doi.org/10.1038/ncomms6466>
- Gareau, M. G., Jury, J., Yang, P. C., Macqueen, G., & Perdue, M. H. (2006). Neonatal maternal separation causes colonic dysfunction in rat pups including impaired host resistance. *Pediatric Research*, 59(1), 83–88. <https://doi.org/10.1203/01.pdr.0000190577.62426.45>
- George, E. D., Bordner, K. A., Elwafi, H. M., & Simen, A. A. (2010). Maternal separation with early weaning: A novel mouse model of early life neglect. *BMC Neuroscience*, 11(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-11-123/FIGURES/4>
- Ghosh, A. P., & Roth, K. A. (2014). Detection of apoptosis and autophagy. *Pathobiology of Human Disease: A Dynamic Encyclopedia of Disease Mechanisms*, 3841–3858. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386456-7.07406-2>
- Görs, S., Kucia, M., Langhammer, M., Junghans, P., & Metges, C. C. (2009). Technical note: Milk composition in mice - Methodological aspects and effects of mouse strain and lactation day. *Journal of Dairy Science*, 92(2), 632–637. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1563>
- Gottlieb, R. A., & Babior, B. M. (1997). Regulation of fas-mediated apoptosis. *Current Topics in Cellular Regulation*, 35, 69–105. [https://doi.org/10.1016/S0070-2137\(97\)80003-9](https://doi.org/10.1016/S0070-2137(97)80003-9)
- Govindaraj, S., Shanmuganathan, A., & Rajan, R. (2017). Maternal psychological stress-induced developmental disability, neonatal mortality and stillbirth in the offspring of Wistar albino rats. *PLOS ONE*, 12(2), e0171089.

<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0171089>

- Green, D. R., Ferguson, T., Zitvogel, L., & Kroemer, G. (2009). Immunogenic and tolerogenic cell death. *Nature Reviews Immunology*, 9(5), 353–363. <https://doi.org/10.1038/nri2545>
- Gunnarsdóttir, B., Zerbi, V., & Kelly, C. (2022). Multimodal gradient mapping of rodent hippocampus. *NeuroImage*, 253(March). <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2022.119082>
- Hammoud, K., Spittler, N., Buch, K., Hakimelahi, R., Nguyen, J., & Lanfranchi, M. (2019). Camping out in the hippocampus: Imaging spectrum of etiologies that affect the hippocampi and tips for honing the differential diagnosis. *Neurographics*, 9(1), 37–54. <https://doi.org/10.3174/ng.1800032>
- Hartman, S., Eilertsen, E. M., Ystrom, E., Belsky, J., & Gjerde, L. C. (2020). Does prenatal stress amplify effects of postnatal maternal depressive and anxiety symptoms on child problem behavior? *Developmental Psychology*, 56(1), 128–137. <https://doi.org/10.1037/DEV0000850>
- Hemann, M. T., & Lowe, S. W. (2006). The p53-Bcl-2 connection. *Cell Death and Differentiation*, 13(8), 1256–1259. <https://doi.org/10.1038/SJ.CDD.4401962>
- Herculano-Houzel, S. (2009). Brain Development: The generation of large brains. *Encyclopedia of Neuroscience*, 333–335. <https://doi.org/10.1016/B978-008045046-9.00938-4>
- Herman, J. P., Mcklveen, J. M., Ghosal, S., Kopp, B., Wulsin, A., Makinson, R., Scheimann, J., & Myers, B. (2016). Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical stress response. *Comprehensive Physiology*, 6(2), 603–621. <https://doi.org/10.1002/cphy.c150015.Regulation>
- Herrenkohl, L. R. (1986). Prenatal stress disrupts reproductive behavior and physiology in offspring. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 474(1), 120–128. <https://doi.org/10.1111/J.1749-6632.1986.TB28003.X>
- Hoaglin, D. C., & Iglewicz, B. (1987). Fine-tuning some resistant rules for outlier labeling. *Journal of the American Statistical Association*, 82(400), 1147–1149. <https://doi.org/10.1080/01621459.1987.10478551>

- Hu, J. M., Rho, J. Y., Suzuki, M., Nishihara, M., & Takahashi, M. (2000). Effect of taurine in rat milk on the growth of offspring. *Journal of Veterinary Medical Science*, 62(7), 693–698. <https://doi.org/10.1292/jvms.62.693>
- Huang, J., Shen, C., Ye, R., Shi, Y., & Li, W. (2021). The effect of early maternal separation combined with adolescent chronic unpredictable mild stress on behavior and synaptic plasticity in adult female rats. *Frontiers in Psychiatry*, 12(March), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2021.539299>
- Jackson, S. J., Andrews, N., Ball, D., Bellantuono, I., Gray, J., Hachoumi, L., Holmes, A., Latcham, J., Petrie, A., Potter, P., Rice, A., Ritchie, A., Stewart, M., Streпка, C., Yeoman, M., & Chapman, K. (2017). Does age matter? The impact of rodent age on study outcomes. *Laboratory Animals*, 51(2), 160. <https://doi.org/10.1177/0023677216653984>
- Jan, R., & Chaudhry, G. e. S. (2019). Understanding apoptosis and apoptotic pathways targeted cancer therapeutics. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 9(2), 205. <https://doi.org/10.15171/APB.2019.024>
- Jankord, R., & Herman, J. P. (2009). Limbic regulation of hypothalamo-pituitaryadrenocortical function during acute and chronic stress. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1148, 64–73. <https://doi.org/10.1196/annals.1410.012.LIMBIC>
- Jiang, Z., Zhu, Z., Zhao, M., Wang, W., Li, H., Liu, D., & Pan, F. (2021). H3K9me2 regulation of BDNF expression in the hippocampus and medial prefrontal cortex is involved in the depressive-like phenotype induced by maternal separation in male rats. *Psychopharmacology*, 238(10), 2801–2813. <https://doi.org/10.1007/S00213-021-05896-7>
- Kanehisa, M. (2019). Toward understanding the origin and evolution of cellular organisms. *Protein science : a publication of the Protein Society*, 28(11), 1947–1951. <https://doi.org/10.1002/PRO.3715>
- Kanehisa, M., Furumichi, M., Sato, Y., Kawashima, M., & Ishiguro-Watanabe, M. (2023). KEGG for taxonomy-based analysis of pathways and genomes. *Nucleic Acids Research*, 51(D1), D587–D592. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKAC963>
- Kanehisa, M., & Goto, S. (2000). KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes.

Nucleic Acids Research, 28(1), 27–30. <https://doi.org/10.1093/NAR/28.1.27>

Keil, R. M. K. (2004). Coping and stress: A conceptual analysis. *Journal of Advanced Nursing*, 45(6), 659–665. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2648.2003.02955.x>

Kestering-Ferreira, E., Tractenberg, S. G., Lumertz, F. S., Orso, R., Creutzberg, K. C., Wearick-Silva, L. E., Viola, T. W., & Grassi-Oliveira, R. (2021). Long-term effects of maternal separation on anxiety-like behavior and neuroendocrine parameters in adult Balb/c mice. *Chronic Stress*, 5. https://doi.org/10.1177/24705470211067181/ASSET/IMAGES/LARGE/10.1177_24705470211067181-FIG9.JPEG

Kim, E. J., Pellman, B., & Kim, J. J. (2015). Stress effects on the hippocampus: A critical review. *Learning and Memory*, 22(9), 411–416. <https://doi.org/10.1101/lm.037291.114>

Kim, J. J., & Diamond, D. M. (2002). The stressed hippocampus, synaptic plasticity and lost memories. *Nature Reviews Neuroscience*, 3(6), 453–462. <https://doi.org/10.1038/nrn849>

König, B., & Markl, H. (1987). Maternal care in house mice. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 20(1), 1–9. <https://doi.org/10.1007/bf00292161>

Koutra, K., Chatzi, L., Bagkeris, M., Vassilaki, M., Bitsios, P., & Kogevinas, M. (2013). Antenatal and postnatal maternal mental health as determinants of infant neurodevelopment at 18 months of age in a mother-child cohort (Rhea Study) in Crete, Greece. *Social Psychiatry and Psychiatric Epidemiology*, 48(8), 1335–1345. <https://doi.org/10.1007/s00127-012-0636-0>

Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E. S., Baehrecke, E. H., Blagosklonny, M. V., El-Deiry, W. S., Golstein, P., Green, D. R., Hengartner, M., Knight, R. A., Kumar, S., Lipton, S. A., Malorni, W., Nuñez, G., Peter, M. E., Tschopp, J., Yuan, J., ... Nomenclature Committee on Cell Death 2009 (2009). Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death & Differentiation*, 16(1), 3–11. <https://doi.org/10.1038/cdd.2008.150>

Kuang, H., Sun, M., Lv, J., Li, J., Wu, C., Chen, N., Bo, L., Wei, X., Gu, X., Liu, Z., Mao, C., & Xu, Z. (2014). Hippocampal apoptosis involved in learning deficits

- in the offspring exposed to maternal high sucrose diets. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 25(9), 985–990. <https://doi.org/10.1016/J.JNUTBIO.2014.04.012>
- Kuhn, H. G. (2015). Control of cell survival in adult mammalian neurogenesis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(12). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018895>
- Le Roch, K. G., & Winzeler, E. A. (2004). Genome-wide analysis of gene expression. *Encyclopedia of Biological Chemistry*, 175–180. <https://doi.org/10.1016/B0-12-443710-9/00264-7>
- Lee, H. J., Kim, J. W., Yim, S. V., Kim, M. J., Kim, S. A., Kim, Y. J., Kim, C. J., & Chung, J. H. (2001). Fluoxetine enhances cell proliferation and prevents apoptosis in dentate gyrus of maternally separated rats. *Molecular Psychiatry*, 6(6), 610. <https://doi.org/10.1038/SJ.MP.4000954>
- Lin, Y., Xu, J., Huang, J., Jia, Y., Zhang, J., Yan, C., & Zhang, J. (2017). Effects of prenatal and postnatal maternal emotional stress on toddlers' cognitive and temperamental development. *Journal of Affective Disorders*, 207, 9–17. <https://doi.org/10.1016/J.JAD.2016.09.010>
- Londei, T., Calci, M., & Leone, V. G. (1988). First experiences with solid food by mouse pups: Effects of age and the presence of the mother. *Bolletino di Zoologia*, 55(1–4), 155–159. <https://doi.org/10.1080/11250008809386612>
- Lucassen, P. J., Müller, M. B., Holsboer, F., Bauer, J., Holtrop, A., Wouda, J., Hoogendijk, W. J. G., De Kloet, E. R., & Swaab, D. F. (2001). Hippocampal apoptosis in major depression is a minor event and absent from subareas at risk for glucocorticoid overexposure. *The American Journal of Pathology*, 158(2), 453–468. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63988-0](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63988-0)
- Maes, C., & Kronenberg, H. M. (2016). Bone development and remodeling. *Endocrinology: Adult and Pediatric*, 1–2, 1038–1062.e8. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-18907-1.00060-3>
- Maghami, S., Zardooz, H., Khodagholi, F., Binayi, F., Saber, R. R., Hedayati, M., Sahraei, H., & Ansar, M. A. (2018). Maternal separation blunted spatial memory formation independent of peripheral and hippocampal insulin content in young adult male rats. *PLoS ONE*, 13(10), 1–23.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204731>

- Mahurkar-Joshi, S., & Chang, L. (2020). Epigenetic Mechanisms in Irritable Bowel Syndrome. *Frontiers in Psychiatry*, 11(August), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2020.00805>
- Mathai, J. P., Germain, M., & Shore, G. C. (2005). BH3-only BIK regulates BAX,BAK-dependent release of Ca²⁺ from endoplasmic reticulum stores and mitochondrial apoptosis during stress-induced cell death. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(25), 23829–23836. <https://doi.org/10.1074/JBC.M500800200>
- Maxwell, S. E., Delaney, H. D., & Kelley, K. (2017). *Designing Experiments and Analyzing Data: A Model Comparison Perspective* (Third Edition). Routledge. <https://doi.org/10.4324/9781315642956/DESIGNING-EXPERIMENTS-ANALYZING-DATA-SCOTT-MAXWELL-HAROLD-DELANEY-KEN-KELLEY>
- McIlwain, D. R., Berger, T., & Mak, T. W. (2013). Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(4), 1–28. <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A008656>
- Melo, R. C. N., Dvorak, A. M., & Weller, P. F. (2022). Eosinophil cell death. *Eosinophil Ultrastructure*, 207–252. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813755-0.00002-2>
- Menard, C., Pfau, M. L., Hodes, G. E., Kana, V., Wang, V. X., Bouchard, S., Takahashi, A., Flanigan, M. E., Aleyasin, H., Leclair, K. B., Janssen, W. G., Labonté, B., Parise, E. M., Lorsch, Z. S., Golden, S. A., Heshmati, M., Tamminga, C., Turecki, G., Campbell, M., ... Russo, S. J. (2017). Social stress induces neurovascular pathology promoting depression. *Nature Neuroscience*, 20(12), 1752–1760. <https://doi.org/10.1038/s41593-017-0010-3>
- Meng, X., Bao, B., & Yue, G. (2023a). Global research trends on maternal separation paradigms as an early life stress model: A bibliometric analysis. *Heliyon*, 9(8), e18469. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e18469>
- Meng, X., Bao, B., & Yue, G. (2023b). Global research trends on maternal separation paradigms as an early life stress model: A bibliometric analysis. *Heliyon*, 9(8).

<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e18469>

Möhler, E., & Resch, F. (2019). Early Life Stress. *Praxis der Kinderpsychologie und Kinderpsychiatrie*, 68(7), 575–591.
<https://doi.org/10.13109/PRKK.2019.68.7.575>

Motulsky, H. J. (n.d.). *GraphPad Statistics Guide*. Erişim tarihi (30 Mayıs 2024)
<http://www.graphpad.com/guides/prism/10/statistics/index.htm%0A%0A>

Nakamura, H. (2013). BALB/c mouse. *Brenner's Encyclopedia of Genetics: Second Edition*, 290–292. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.00133-9>

Nishigawa, T., Nagamachi, S., & Ikeda, H. (2018). Restraint stress in lactating mice alters the levels of sulfur-containing amino acids in milk. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 80(3), 503–509. <https://doi.org/10.1292/jvms.17-0661>

Noland, R. C. (2015). Exercise and regulation of lipid metabolism. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 135, 39–74. Elsevier Inc.
<https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2015.06.017>

Norris, F. H., Friedman, M. J., Watson, P. J., Byrne, C. M., Diaz, E., & Kaniasty, K. (2002). 60,000 disaster victims speak: Part I An empirical review of the empirical literature, 1981-2001. *Psychiatry*, 65(3), 207–239.
<https://doi.org/10.1521/psyc.65.3.207.20173>

Ohta, K. I., Suzuki, S., Warita, K., Kaji, T., Kusaka, T., & Miki, T. (2017). Prolonged maternal separation attenuates BDNF-ERK signaling correlated with spine formation in the hippocampus during early brain development. *Journal of Neurochemistry*, 141(2), 179–194. <https://doi.org/10.1111/JNC.13977>

Okamura, H., Yasugaki, S., Suzuki-Abe, H., Arai, Y., Sakurai, K., Yanagisawa, M., Takizawa, H., & Hayashi, Y. (2022). Long-term effects of repeated social defeat stress on brain activity during social interaction in BALB/c mice. *eNeuro*, 9(3).
<https://doi.org/10.1523/ENEURO.0068-22.2022>

Orso, R., Creutzberg, K. C., Wearick-Silva, L. E., Wendt Viola, T., Tractenberg, S. G., Benetti, F., & Grassi-Oliveira, R. (2019). How early life stress impact maternal care: A systematic review of rodent studies. *Frontiers in Behavioral*

Neuroscience, 13. <https://doi.org/10.3389/FNBEH.2019.00197/FULL>

- Pagliaccio, D., & Barch, D. M. (2016). Early life adversity and risk for depression: alterations in cortisol and brain structure and function as mediating mechanisms. *Systems Neuroscience in Depression*, 29–77. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802456-0.00002-9>
- Pappalardo, X. G., Testa, G., Pellitteri, R., Dell’Albani, P., Rodolico, M., Pavone, V., & Parano, E. (2023). Early life stress (ELS) effects on fetal and adult bone development. *Children*, 10(1). <https://doi.org/10.3390/children10010102>
- Pariante, C. M., & Nemeroff, C. B. (2012). Unipolar depression. *Handbook of Clinical Neurology*, 106, 239–249. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52002-9.00014-0>
- Pérez-Garijo, A., & Steller, H. (2015). Spreading the word: Non-autonomous effects of apoptosis during development, regeneration and disease. *Development (Cambridge)*, 142(19), 3253–3262. <https://doi.org/10.1242/dev.127878>
- Pesonen, A. K., & Räikkönen, K. (2012). The lifespan consequences of early life stress. *Physiology & Behavior*, 106(5), 722–727. <https://doi.org/10.1016/J.PHYSBEH.2011.10.030>
- Pfeffer, C. M., & Singh, A. T. K. (2018a). Apoptosis: A target for anticancer therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(2). <https://doi.org/10.3390/ijms19020448>
- Pfeffer, C. M., & Singh, A. T. K. (2018b). Apoptosis: A target for anticancer therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(2). <https://doi.org/10.3390/IJMS19020448>
- Porsolt, R., Le Pichon, M. & Jalfre, M. (1977). Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature*, 266, 730–732. <https://doi.org/10.1038/266730a0>
- Price, S. A., Roff, S. R., Schwartz, J. A., & Chilton, J. A. (2023). Immunohistochemistry for the non-human primate. *Spontaneous Pathology of the Laboratory Non-human Primate*, 553–586. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813088-9.00011-2>
- Pryce, C. R., & Feldon, J. (2003). Long-term neurobehavioural impact of the postnatal

- environment in rats: manipulations, effects and mediating mechanisms. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 27(1–2), 57–71. [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(03\)00009-5](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(03)00009-5)
- Qian, S., Wei, Z., Yang, W., Huang, J., Yang, Y., & Wang, J. (2022). The role of BCL-2 family proteins in regulating apoptosis and cancer therapy. *Frontiers in Oncology*, 12. <https://doi.org/10.3389/FONC.2022.985363>
- Raisova, M., Hossini, A. M., Eberle, J., Riebeling, C., Wieder, T., Sturm, I., Daniel, P. T., Orfanos, C. E., & Geilen, C. C. (2001). The Bax/Bcl-2 ratio determines the susceptibility of human melanoma cells to CD95/Fas-mediated apoptosis. *The Journal of investigative dermatology*, 117(2), 333–340. <https://doi.org/10.1046/J.0022-202X.2001.01409.X>
- Rao, R. V., Niazi, K., Mollahan, P., Mao, X., Crippen, D., Poksay, K. S., Chen, S., & Bredesen, D. E. (2006). Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell-death program: a novel HSP90-independent role for the small chaperone protein p23. *Cell Death and Differentiation*, 13(3), 415–425. <https://doi.org/10.1038/SJ.CDD.4401761>
- Reshetnikov, V. V., Kovner, A. V., Lepeshko, A. A., Pavlov, K. S., Grinkevich, L. N., & Bondar, N. P. (2020). Stress early in life leads to cognitive impairments, reduced numbers of CA3 neurons and altered maternal behavior in adult female mice. *Genes, Brain and Behavior*, 19(3), e12541. <https://doi.org/10.1111/GBB.12541>
- Sarosiek, K. A., Ni Chonghaile, T., & Letai, A. (2013). Mitochondria: gatekeepers of response to chemotherapy. *Trends in Cell Biology*, 23(12), 612–619. <https://doi.org/10.1016/J.TCB.2013.08.003>
- Schmauss, C., Lee-McDermott, Z., & Medina, L. R. (2014). Trans-generational effects of early life stress: The role of maternal behavior. *Scientific Reports*, 4(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep04873>
- Schmeer, K. K., Guardino, C., Irwin, J. L., Ramey, S., Shalowitz, M., & Dunkel Schetter, C. (2020). Maternal postpartum stress and toddler developmental delays: Results from a multisite study of racially diverse families. *Developmental Psychobiology*, 62(1), 62–76. <https://doi.org/10.1002/DEV.21871>

- Schwarz, C. S., Evert, B. O., Seyfried, J., Schaupp, M., Kunz, W. S., Vielhaber, S., Klockgether, T., & Wüllner, U. (2001). Overexpression of bcl-2 results in reduction of cytochrome c content and inhibition of complex I activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 280(4), 1021–1027. <https://doi.org/10.1006/BBRC.2001.4242>
- Servatius, R. J., Salameh, G., Coyle, K. M., & Paré, W. P. (2007). Restraint stress. *Encyclopedia of Stress*, 389–390. <https://doi.org/10.1016/B978-012373947-6.00333-0>
- Shachar-Dadon, A., Gueron-Sela, N., Weintraub, Z., Maayan-Metzger, A., & Leshem, M. (2017). Pre-conception war exposure and mother and child adjustment 4 years later. *Journal of Abnormal Child Psychology*, 45(1), 131–142. <https://doi.org/10.1007/S10802-016-0153-9>
- Sharma, V. K., Singh, T. G., Singh, S., Garg, N., & Dhiman, S. (2021). Apoptotic pathways and Alzheimer's disease: Probing therapeutic potential. *Neurochemical Research*, 46(12), 3103–3122. <https://doi.org/10.1007/S11064-021-03418-7>
- Shi, Y. (2002). Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Molecular Cell*, 9(3), 459–470. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00482-3](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00482-3)
- Shu, C., Xiao, L., Tang, J., Wang, G., Zhang, X., & Wang, X. (2015). Blunted behavioral and molecular responses to chronic mild stress in adult rats with experience of infancy maternal separation. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*, 235(2), 18–87. <https://doi.org/10.1620/TJEM.235.81>
- Siddiqui, W. A., Ahad, A., & Ahsan, H. (2015). The mystery of BCL2 family: Bcl-2 proteins and apoptosis: an update. *Archives of Toxicology*, 89(3), 289–317. <https://doi.org/10.1007/S00204-014-1448-7>
- Sikand, K., Singh, J., Ebron, J. S., & Shukla, G. C. (2012). Housekeeping gene selection advisory: Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH) and β -Actin are targets of miR-644a. *PLoS ONE*, 7(10). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0047510>
- Sinnamon, G. C. B. (2019). The pathological consequences of exposure to domestic and family violence in childhood. *Child Abuse and Neglect: Forensic Issues in Evidence, Impact and Management*, 175–202. <https://doi.org/10.1016/B978-0->

- Smith, K. E., & Pollak, S. D. (2020). Early life stress and development: potential mechanisms for adverse outcomes. *Journal of Neurodevelopmental Disorders*, 12(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/S11689-020-09337-Y>
- Song, H., Sieurin, J., Wirdefeldt, K., Pedersen, N. L., Almqvist, C., Larsson, H., Valdimarsdóttir, U. A., & Fang, F. (2020). Association of stress-related disorders with subsequent neurodegenerative diseases. *JAMA Neurology*, 77(6), 700–709. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2020.0117>
- Stendardo, M., Renzi, C., Pallavi, R., Roda, N., Gambino, V., Casciaro, F., Persico, G., & Giorgio, M. (2023). The early-life stress induced by oxytocin inhibition in p53 knockout mouse dams increases adulthood tumorigenesis in first and second generations. *Cancer Reports*, 6(1). <https://doi.org/10.1002/CNR2.1625>
- Szegezdi, E., Reed Herbert, K., Kavanagh, E. T., Samali, A., & Gorman, A. M. (2008). Nerve growth factor blocks thapsigargin-induced apoptosis at the level of the mitochondrion via regulation of Bim. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 12(6A), 2482–2496. <https://doi.org/10.1111/J.1582-4934.2008.00268.X>
- Timucin, A. C., Basaga, H., & Kutuk, O. (2019). Selective targeting of antiapoptotic BCL-2 proteins in cancer. *Medicinal Research Reviews*, 39(1), 146–175. <https://doi.org/10.1002/MED.21516>
- Ulrich-Lai, Y. M., & Herman, J. P. (2009). Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nature Reviews Neuroscience*, 10(6), 397–409. <https://doi.org/10.1038/nrn2647>
- Van Steenwyk, G., Roszkowski, M., Manuella, F., Franklin, T. B., & Mansuy, I. M. (2018). Transgenerational inheritance of behavioral and metabolic effects of paternal exposure to traumatic stress in early postnatal life: Evidence in the 4th generation. *Environmental Epigenetics*, 4(2), 1–8. <https://doi.org/10.1093/eep/dvy023>
- Wang, X., Jiang, L., Ma, W., Zheng, X., He, E., Zhang, B., Vashisth, M. K., & Gong, Z. (2022). Maternal separation affects anxiety-like behavior beginning in adolescence and continuing through adulthood and related to Dnmt3a expression.

Journal of Neurophysiology, 128(3), 611–618.
<https://doi.org/10.1152/jn.00247.2022>

Wei, M. C., Zong, W. X., Cheng, E. H. Y., Lindsten, T., Panoutsakopoulou, V., Ross, A. J., Roth, K. A., Macgregor, G. R., Thompson, C. B., & Korsmeyer, S. J. (2001). Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science (New York, N.Y.)*, 292(5517), 727–730.
<https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1059108>

Weiss, I. C., Franklin, T. B., Vizi, S., & Mansuy, I. M. (2011). Inheritable effect of unpredictable maternal separation on behavioral responses in mice. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 5, 3. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2011.00003>

Wenderski, W., & Maze, I. (2014). Epigenetic mechanisms of drug addiction vulnerability. *Epigenetics in Psychiatry*. Elsevier Inc.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417114-5.00021-8>

White, C., Li, C., Yang, J., Petrenko, N. B., Madesh, M., Thompson, C. B., & Foskett, J. K. (2005). The endoplasmic reticulum gateway to apoptosis by Bcl-X(L) modulation of the InsP3R. *Nature Cell Biology*, 7(10), 1021–1028.
<https://doi.org/10.1038/NCB1302>

Wuertz-Kozak, K., Roszkowski, M., Cambria, E., Block, A., Kuhn, G. A., Abele, T., Hitzl, W., Drießlein, D., Müller, R., Rapp, M. A., Mansuy, I. M., Peters, E. M. J., & Wippert, P. M. (2020). Effects of early life stress on bone homeostasis in mice and humans. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(18), 1–25.
<https://doi.org/10.3390/ijms21186634>

Yamane, T., Dylla, S. J., Muijtjens, M., & Weissman, I. L. (2005). Enforced Bcl-2 expression overrides serum and feeder cell requirements for mouse embryonic stem cell self-renewal. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(9), 3312–3317.
<https://doi.org/10.1073/PNAS.0500167102>

Yang, J., Liu, X., Bhalla, K., Kim, C. N., Ibrado, A. M., Cai, J., Peng, T. I., Jones, D. P., & Wang, X. (1997). Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science (New York, N.Y.)*, 275(5303), 1129–1132.
<https://doi.org/10.1126/SCIENCE.275.5303.1129>

- Yang, S., Li, J., Han, L., & Zhu, G. (2017). Early maternal separation promotes apoptosis in dentate gyrus and alters neurological behaviors in adolescent rats. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 10(11), 10812.
- Yang, Y., Zhong, Z., Wang, B., Wang, Y., & Ding, W. (2023). Activation of D1R signaling in the medial prefrontal cortex rescues maternal separation-induced behavioral deficits through restoration of excitatory neurotransmission. *Behavioural Brain Research*, 441, 114287. <https://doi.org/10.1016/J.BBR.2023.114287>
- Yilmaz, C., Engür, D., Keskinoglu, P., Kumral, A., & Yilmaz, O. (2023). Highlights for the research involving the lactation period in laboratory rats. *Journal of Laboratory Animal Science and Practices*, 3(2), 45–50. <https://doi.org/10.5152/jlasp.2023.23008>
- Zalosnik, M. I., Pollano, A., Trujillo, V., Suárez, M. M., & Durando, P. E. (2014). Effect of maternal separation and chronic stress on hippocampal-dependent memory in young adult rats: evidence for the match-mismatch hypothesis. *Stress (Amsterdam, Netherlands)*, 17(5), 445–450. <https://doi.org/10.3109/10253890.2014.936005>
- Zhou, J. X., & Li, X. (2015). Apoptosis in Polycystic Kidney Disease: From Pathogenesis to Treatment. In: Li X (Ed), *Polycystic Kidney Disease [Internet]*, (197–230). Brisbane (AU): Codon Publications. <https://doi.org/10.15586/CODON.PKD.2015.CH9>
- Zhou, L., Wu, Z., Wang, G., Xiao, L., Wang, H., Sun, L., & Xie, Y. (2020). Long-term maternal separation potentiates depressive-like behaviours and neuroinflammation in adult male C57/BL6J mice. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 196. <https://doi.org/10.1016/J.PBB.2020.172953>