

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

OTİZM SPEKTRUM BOZUKLUĞUNDA
NÖROİNFLAMASYONUN
SİNAPTİK PLASTİKLİK ÜZERİNE ETKİLERİ

Doç. Dr. Dilek Ünal

Temel Nörolojik Bilimler Programı

DOKTORA TEZİ

ANKARA

2024

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

OTİZM SPEKTRUM BOZUKLUĞUNDA
NÖROİNFLAMASYONUN
SİNAPTİK PLASTİKLİK ÜZERİNE ETKİLERİ

Doç. Dr. Dilek Ünal

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Emine Eren Koçak

Temel Nörolojik Bilimler Programı

DOKTORA TEZİ

ANKARA

2024

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

OTİZM SPEKTRUM BOZUKLUĞUNDA NÖROİNFLAMASYONUN
SİNAPTİK PLASTİKLİK ÜZERİNE ETKİLERİ

Dilek Ünal

Danışman: Prof. Dr. Emine Eren Koçak

Bu tez çalışması 19.01.2024 tarihinde jürimiz tarafından Temel Nörolojik Bilimler
Doktora Programında doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı	Prof. Dr. Turgay DALKARA <i>(Hacettepe Üniversitesi)</i>
Üye	Prof. Dr. Şaban Remzi ERDEM <i>(Başkent Üniversitesi)</i>
Üye	Doç.Dr. Gül YALÇIN ÇAKMAKLI <i>(Hacettepe Üniversitesi)</i>
Üye	Doç. Dr. Evren ERDENER <i>(Hacettepe Üniversitesi)</i>
Üye	Doç. Dr. Hale YAPICI ESER <i>(Koç Üniversitesi)</i>

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

Enstitü Müdürü

Prof. Dr. Müge Yemişçi Özkan

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

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

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

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

- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihinden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. ⁽¹⁾
- Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihinden itibaren 6 ay ertelenmiştir. ⁽²⁾
- Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir. ⁽³⁾

15 / 02/ 2024

Dilek Ünal

i

ⁱ“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”

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

* Tez **danışmanının** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulu** tarafından karar verilir.

ETİK BEYAN

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

Doç. Dr. Dilek nal

15.02.2024

TEŞEKKÜR

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

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

Çalışmamın kortikal kalınlık ölçümleri, davranış deneyleri sırasında emeği olan ve beni hep destekleyen değerli arkadaşım Tansu Bilge Köse'ye,

Çalışmamın devamı için beni yüreklendiren, desteklerini hep yanımda hissettiğim değerli hocam Prof. Dr. Ebru Çengel Kültür'e, canım arkadaşlarım Dr. Öğretim Görevlisi Kevser Nalbant, Cihan Aslan'a,

Çalışmamda Ankara Üniversitesi'nden destek almam için vesile olan, doktora sürecimin tanığı, ve destekçisi canım komşum, arkadaşım Dr. Hilal Özakıncı'ya, Mikroskopik değerlendirme konusundaki yardımlarından ötürü değerli Ankara Üniversitesi Patoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Aylin Heper Okçu'ya, kesit alma aşamasındaki katkılarından ötürü Kadriye Yücel Aydın'a, işaretleme aşamasındaki emeklerinden ötürü Filiz Yeşilyurt'a ve görüntü alma şamasındaki katkılarından dolayı Gökhan Özdoğan'a,

Çalışmamdaki katkılarından ötürü tüm Nörolojik ve Psikiyatrik Bilimler Enstitüsü lab grubuna ve ekibine,

18547 nolu projemi destekleyen Hacettepe Üniversitesi BAP Koordinasyon Birimi'ne, sonsuz teşekkür ve minnetlerimi sunarım.

Doç. Dr. Dilek Ünal

Ankara, 2024

ÖZET

Ünal D. Otizm Spektrum Bozukluğunda Nöroinflamasyonun Sinaptik Plastiklik Üzerine Etkileri, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Temel Nörolojik Bilimler (Neuroscience) Programı, Doktora Tezi, Ankara, 2024. Otizm spektrum bozukluğu (OSB) etyopatogenezinde nöroinflamasyonun yer aldığına dair bulgular elde edilmiştir. Bununla birlikte nöroinflamasyonun nasıl bir mekanizma üzerinden OSB tablosunu ortaya çıkarabildiği açık değildir. Bu tez çalışmasında antiinflamatuvar nitelikteki M2 tip mikroglialarla proinflamatuvar nitelikteki M1 tip mikroglialar arasındaki dengenin bozulduğunu, buna bağlı olarak dendritik budanmanın azaldığını, dolayısıyla sinaptik yoğunluğun arttığını; bunun sonucunda OSB belirtilerinin ortaya çıktığını hipotez ettik. Çalışmamızda OSB, farelerde maternal immün aktivasyon (MIA) ile modellenmiştir. MIA modeli gebeliğin 11,5. ve 12,5. günlerinde sentetik çift zincirli RNA Poly (I:C) uygulamasıyla gerçekleştirilmiştir. Bu annelere doğan yavrular birinci ayda davranış testleri (üç bölmeli sosyalleşme testi yeni nesne tanıma testi ve bilye gömme testi) ile değerlendirilmiştir. Beyin kesitlerinde, medyal prefrontal korteks (PFK), hipokampus, striatumda kalınlık ölçümleri yapılmıştır. PFK’da yapılan immünohistokimyasal işaretlemelerde mikroglialar Iba1, M1 tip mikroglialar CD86 ve M2 tip mikroglialar Ym1 antikoruyla işaretlenmiştir. Poly (I:C) uygulanan gebelerin yavrularının davranışlarında OSB’nin farklı klinik görünüşleriyle uyumlu spektrumsal bir dağılım gözlenmiştir: Bir grup farede sosyal defisitler daha belirginken, diğer grupta stereotipik davranışlarda artış görülmüştür. Böylece, kontrol (PBS) grubu, stereotipik davranış baskın Poly (I:C) grubu ve sosyal defisit baskın Poly (I:C) grubu olarak 3 ayrı grup oluşturulmuştur. Hipokampusun kalınlığı stereotipik davranış baskın Poly (I:C) grubunda diğer iki gruba göre artmış bulunmuştur. Hipokampus kalınlığı ile stereotipik davranış ve striatum kalınlığı ile öğrenme skorları arasında pozitif korelasyon saptanmıştır. Hipokampus kalınlığının striatum kalınlığı ile pozitif korelasyonu olduğu görülmüştür. Iba-1, Ym-1, CD86 ile işaretlenen mikroglia sayısı gruplar arasında değişmemiştir. Sinaptik çıkıntı sayımı teknik aksaklıklar nedeniyle tamamlanamamıştır.

Anahtar Kelimeler: Otizm, nöroinflamasyon, maternal immün aktivasyon, mikroglia, sinaptik budanma

Bu araştırma Hacettepe Üniversitesi BAP (18547) tarafından desteklenmiştir.

ABSTRACT

Ünal D. The Effects Of Neuroinflammation On Synaptic Plasticity In Autism Spectrum Disorders, Hacettepe University Graduate School of Health Sciences Basic Neurological Sciences (Neuroscience) Program, Doctor of Philosophy Thesis, Ankara, 2024. Neuroinflammation has been found to be related with Autism Spectrum Disorder (ASD) However, it is not clear how neuroinflammation causes autism symptoms as a mechanism. In our study, it is aimed to understand the role of neuroinflammation in the pathophysiology of ASD by using a Poly (I:C) Maternal Immun Activation (MIA) Model. We hypothesized that M2 microglia phenotype would be seen more than M1 phenotype, due to the less synaptic pruning and, ASD related behaviours would be seen as a result of the increase in synaptic density. Behavioral tests assessing social behaviour, repetitive behaviour and learning were held in the first postnatal month. The generation of the Poly (I:C) injected mothers showed the socialization deficits dispersed as a spectrum as seen in the clinic. Thus, three separate groups were formed: the control (PBS) group, the stereotypic behavior movement-dominant Poly (I:C) group, and the social deficit-dominant Poly (I:C) group. Afterwards animals were sacrificed and sagittal brain sections were analyzed. Regional thickness was measured for assessing synaptic pruning process in the medial prefrontal cortex, hippocampus, and striatum, which are known to be associated with ASD. Hippocampus was the only thicker region in stereotypic behaviour-dominant Poly (I:C) group. Also hippocampus thickness positively correlated with stereotypic behaviour. Striatum thickness was positively correlated with learning scores. The groups did not differ in terms of microglial number determined by Iba-1, Ym-1, CD86 labeling. Dendritic spine number counting process could not be completed due to technical problems.

Keywords: Autism Spectrum Disorder, neuroinflammation, maternal immun activation, synaptic pruning

This study was supported by Hacettepe University Coordinatorship of Scientific Research Projects (18547).

İÇİNDEKİLER

ONAY	iii
YAYIMLAMA VE MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN SAYFASI	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SIMGELER VE KISALTMALAR	xi
ŞEKİLLER	xii
TABLolar	xiv
1 GİRİŞ	1
2 GENEL BİLGİLER	6
2.1 OSB Klinik Özellikleri	6
2.2. OSB Etiyolojisi	7
2.3. OSB Nöroinflamasyon İlişkisi	9
2.4. OSB - Maternal İmmun Aktivasyon Modeli	10
2.5. Mikroglia, Mikroglial Fenotipler ve Sinaptik Budanma İlişkisi	11
3 GEREÇ VE YÖNTEM	14
3.1 Araştırmanın Örneklemi	14
3.1.1 Deney Gruplarının Oluşturulması	15
3.1.2 MIA Modeli Uygulanması	15
3.1.3 Davranış Deneyleri	16
3.2 Perfüzyon	19
3.3 İndirekt İmmüno Floresan İşaretleme	20
3.3.1 Yöntemin Optimizasyon Çalışmalarının Özeti	21
3.4 Dendritik Çıkıntı Sayısı Değerlendirmesi	25

3.5 Bölgesel Kalınlık Ölçülmesi	26
3.6 İstatistiksel Yöntemler	27
4 BULGULAR	29
4.1 Davranış deneyleri sonuçları	29
4.1.1 Sosyal Tercih Testi	29
4.1.2 Yabancı/Tanıdık Sosyal İlişki Tercihi Testi	30
4.1.3 Lokomotor Test ve Yeni Nesne Tanıma Testi	32
4.1.4 Bilye Gömme Testi	32
4.2 Poly (I:C) Uygulanan Farelerin OSB-benzeri Davranışlarına Göre Gruplandırılması	34
4.3 Oluşturulan Üç Grubun Davranış Analizleri	37
4.4 Bölgesel Kalınlık İlişkili Veriler	42
4.4.1 Bölgesel Kalınlık Ölçümleri	42
4.5 Bölgesel kalınlık korelasyonları	46
4.6 İmmünohistokimyasal Sonuçlar	46
4.6.1 İba işaretlemesine ilişkin sonuçlar	46
4.6.2 CD86 ve Ym1 işaretlemesine ilişkin sonuçlar	48
5 TARTIŞMA	50
5.1 Davranış bulguları	50
5.2 Bölgesel kalınlık ve Bölgesel Kalınlık Davranış Korelasyon Bulguları	51
5.3 İmmunohistokimya bulguları	55
6 SONUÇ VE ÖNERİLER	58
7 KAYNAKLAR	59
8 EKLER	69
8.1 EK 1 Tez Çalışması Etik Kurul Onayı	
8.2 EK 2 Tez Çalışması Orjinallik raporu	
9 ÖZGEÇMİŞ	72

SİMGELER VE KISALTMALAR

BDNF	Beyin-türevli nörotrofik faktör
C3	Kompleman 3
CX3CR1	Fraktalkin reseptörü
GFAP	Glial Fibriler Asidik Protein
IL	İnterlökin
LPS	Lipopolisakkarit
MIA	Maternal İmmun Aktivasyon
M1	M1 Mikroglia Fenotipi
M2	M2 Mikroglia Fenotipi
NF-κB	Nükleer Faktör Kappa B
NGS	Normal keçi serumu
OSB	Otizm Spektrum Bozukluğu
PBS	Fosfatlı tamponlu salin
PFA	Paraformaldehit
PFK	Prefrontal korteks
Poly (I:C)	Çift zincirli sentetik RNA
SDD	Sosyal defisit dominant
StD	Stereotipik hareket dominant
TNF-α	Tümör Nekroz Faktörü Alfa

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
1-1 Nörogelişimsel bozukluklarda genetik ve çevresel etkenlerin etkileşiminin nörogelişim üzerindeki etkisi.	4
2-1 OSB de gözüken semptom kümeleri ve zorluk alanlarının heterojenliği.	7
2-2 OSB etyolojisinde genetik, çevresel ve epigenetik faktörler.	9
2-3 Otoantikör ve sitokin akışı mekanizmalarıyla maternal immun aktivasyon tetiklenmesinin özeti.	10
2-4 Mikroglia sinaptik budanma ilişkisi	12
2-5 Mikroglia farklılaşması	13
3-1 Deney akış özeti	14
3-2 Vajinal tıkaç	15
3-3 Üç bölmeli sosyalleşme deneyi	17
3-4 Yeni nesne tanıma testi	18
3-5 Bilye gömme testi	19
3-6 CD206 ve MHC2 antikörleri ile pozitif ve negaif kontrol işaretlenmesi	22
3-7 CD206 ve MHC2 antikörlerinin Iba ile kolokalizasyonları	23
3-8 DAB'lı MHC2 ve CD206 antikörlerinin işaretlenmesi	24
3-9 Şekilde medyal PFK kesitinde CD86 işaretlemesi çekirdek etrafında turuncu oklarla gösterilmektedir.	25
3-10 Şekilde medyal PFK kesitinde Ym1 işaretlemesi çekirdek etrafında turuncu oklarla gösterilmektedir.	25
3-11 Konfokal mikroskobide dendiritik görüntüleme denemesine ait görüntü	26
3-12 Bölgesel kalınlık ölçümüne ve referans atlastaki ölçüme ait görüntü	27
4-1 Kontrol (n:6) ve poly (I:C) (n:14) grupları arasında üç bölmeli sosyalleşme testi bulguları	30
4-2 Kontrol (n:6) ve poly (I:C)(n:14) grupları arasında yabancı/tanıdık sosyal ilişki testi bulguları	31
4-3 Kontrol PBS (n:6) ve poly (I:C) (n:14) grupları arasında lokomotor ve yeni obje tanıma testi bulguları	32

4-4 Kontrol PBS (n:6) ve poly (I:C) (n:14) grupları arasında bilye gömme testi bulguları	33
4-5 Davranış testlerinin OSB hastalarının klinik görünümüne denk şekilde ayrıldığına işaret eden dağılım	36
4-6 Üçlü gruplarda bilye gömme ve üç bölmeli sosyalleşme testi sonuçlarının karşılaştırılması	38
4-7 Kontrol grubu içindeki Thy backgrounduna göre ayrılmış hayvan gruplarının davranış analiz bulguları	40
4-8 Kontrol grubu içindeki Thy backgrounduna göre ayrılmış hayvan gruplarının davranış analiz bulguları	41
4-9 Kontrol grubu içindeki Thy backgrounduna göre ayrılmış hayvan bilye gömme testi bulguları	42
4-10 Beyin bölgeleri kalınlık ölçümlerinin gruplara göre dağılımı	43
4-11 Thy1-ChR2-YFP backgroundına göre ikiye ayrılan kontrol grubunun bölgesel kalınlıkları	45
4-12 Bölgesel Kalınlıklar ile Davranış Testi Parametreleri Arasında Çıkan Korelasyonlara Dair Grafikler	46
4-13 3 grupta Iba sayımının karşılaştırılmasına dair ortalama ve standart sapma olarak verilmiş grafik	47
4-14 Iba-1 işaretlemesine ilişkin örnek bir görüntüler	47
4-15 Grafikte PBS ve Poly(I:C) gruplarında ortalama immunohistokimya(İHK) sayımları	49
5-1 Araştırmamızın basamaklarının grafik özeti	57

TABLÖLAR

Tablo	Sayfa
1 Kullanılan yavru sayıları	18
2 Araştırmada kullanılan birlikte kullanılan primer, sekonder antikorlar ve konsantrasyonları	24
3 PBS and Poly (I:C) gruplarında davranış test sonuçlarının karşılaştırılması hesaplanmış indeks olarak, ortalama ve standart sapma (SS) değerler ve ilişkili istatistiksel değerler)	37
4 Poly (I:C) alt gruplarının davranış test parametrelerine göre belirlenmesi	38
5 Bölgelere göre kalınlık verilerinin dağılımı	47
6 Gruplara göre CD86, Ym1 sayımlarının ve Ym1/CD86 oranı dağılımı	52

1 GİRİŞ

Otizm spektrum bozukluğu (OSB), sosyal–iletişimsel alanda belirgin yetersizlik ve sınırlı, tekrarlayıcı davranışlar ile karakterize, dünya çapında yaklaşık %1,7 (59 çocukta bir) sıklığında görülen nörogelişimsel bir bozukluktur (1). Erkeklerde kızlardan daha sık görülmekle birlikte, belirtilerin görünümü ve şiddeti, bireyin gelişim seviyesi, kronolojik yaşa göre farklılıklar göstermektedir. Erken başlangıç ve belirtilerin kronik seyri hem birey hem toplum için önemli maddi manevi sorunlar oluşturan, şu an için bilinen tedavisi olmayan bir bozukluktur. Müdahaleler, rehabilitasyonu sağlamak, ek psikiyatrik sorunları gidermek düzeyindedir.

OSB etiyojisi henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Bilinen genetik bir değişiklik ile ilişkisi gösterilemeyen ve sendromik olmayan olgularda, yine genetik bir zeminde, prenatal veya postnatal dönemde çevresel etkenlerin etkileşimiyle bozukluğun oluşmuş olabileceği düşünülmektedir (2). Hem tedavi edici hem koruyucu müdahale seçeneklerinin gündeme gelebilmesi için bozukluğun altında yatan mekanizmaların aydınlatılmasına ihtiyaç vardır.

OSB’li bireylerde, OSB belirtilerinin ortaya çıkış döneminde kafa çevresinde, beyin hacminde, kortikal nöron sayısında artış görüldüğü birçok çalışmada gösterilmiştir (3, 4). Kortikal aşırı kalabalık nöron popülasyonlarının, sosyal ve dil becerilerini düzenleyen temporal bölge ve amigdala ilişkili devrelerin oluşumunu bozduğu ileri sürülmüştür (5, 6). Ölüm ardı çalışmalarda OSB’li bireylerin beyin ağırlığının kontrollere göre fazla olduğu, özellikle medyal prefrontal korteks (PFK) ve dorsolateral PFK kalınlığında ve nöron ve kalınlık artış olduğu gösterilmiştir (4). Bunun yanı sıra OSB’li bireylerin beyinlerinin ölüm ardı incelemelerinde serebellum, amigdala ve striatumun hücresel yoğunluğunda değişim bildirilmiştir (7). OSB’li bireylerde yapılan yapısal ve fonksiyonel nörogörüntüleme çalışmalarını gözden geçiren analizlerde PFK alt alanları, bazal ganglionlar (kaudat çekirdek ve putamen), hipokampus, görme korteksi, sensörimotor korteks, serebellum ve talamus OSB belirtileri ile ilişkili bulunmuştur (8, 9). *Inbred* bir tür olan ve doğal OSB modeli olarak kabul edilen BTBRT+tf/J farelerde postnatal yedinci günde kortikal kalınlıkta artış olduğu gösterilmiştir (10). Nörogörüntüleme ile doku incelemesinin beraber yapıldığı bir çalışmada da, BTBRT+tf/J farelerde kontrollere göre medyal PFK ve insulada

kortikal kalınlıkta artış tespit edilmiştir (11). Bu veriler OSB’de sinaptik budanma sürecinde aksama olduğunu düşündürmekle birlikte (Şekil 1-1), bu aksamaya neden olan mekanizmalara dair halen yeterince veri yoktur.

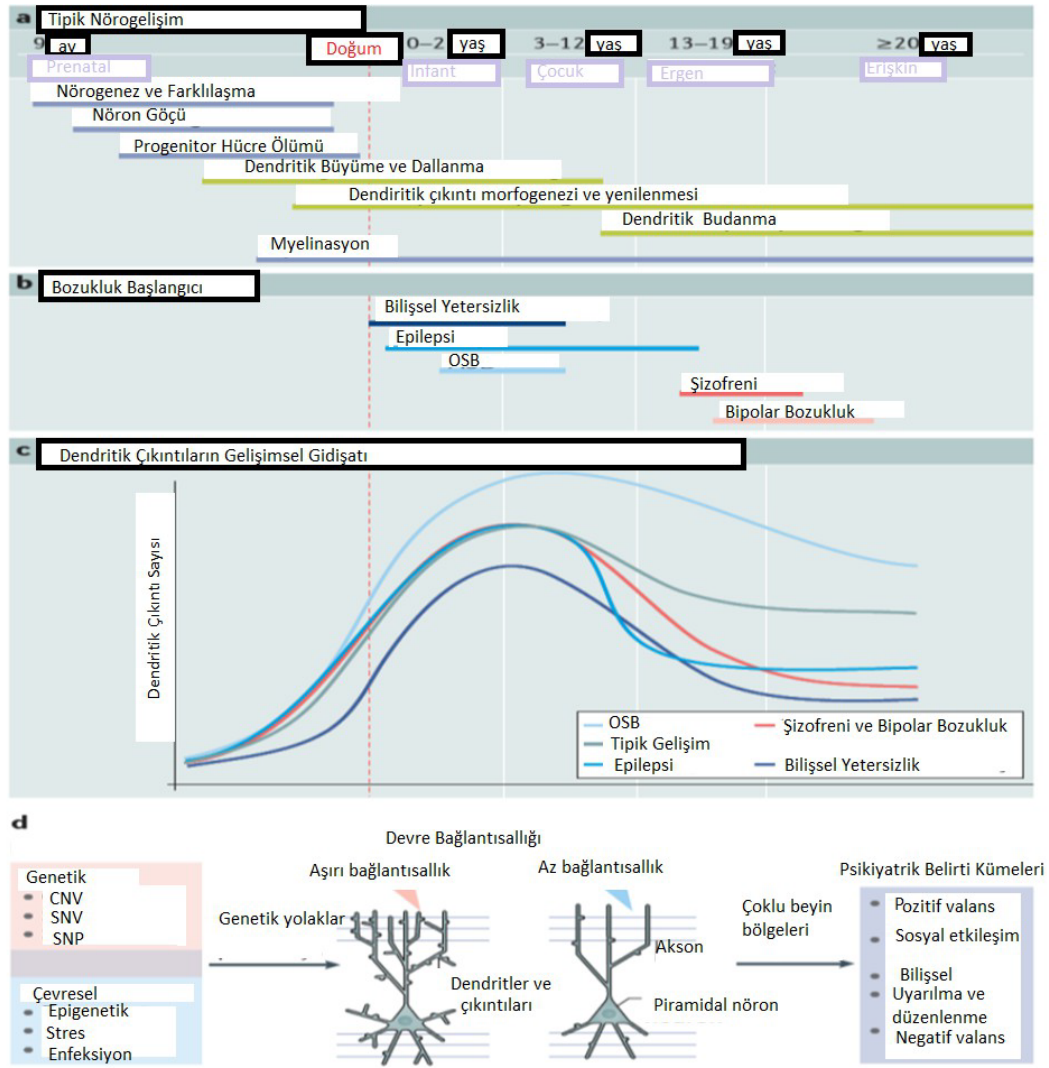
Son yıllarda bu mekanizmaları anlamaya yönelik yapılan bazı insan ve hayvan çalışmalarında, OSB patofizyolojisinde nöroinflamasyonun rolüne dair kanıtlar elde edilmiştir (12). İnsan çalışmalarında, OSB’li hastaların hem periferik dolaşımında (13), hem de ölüm ardı beyin dokusu incelemelerinde proinflamatuvar sitokin düzeylerinde ve mikroglia aktivitesinde artış, antiinflamatuvar sitokin düzeylerinde (3) ve kompleman C3 aktivitesinde düşüklük bildirmiştir (14). Bu bulgular nöroinflamasyonun gelişen beyinde antiinflamatuvar-proinflamatuvar yanıt dengesindeki ve kompleman yolağındaki aksamaların sinaptik budanma üzerinden olumsuz etkileri olabileceğini düşündürmektedir (15). Ancak nöroinflamasyonun nasıl bir mekanizma üzerinden OSB tablosunu ortaya çıkarabildiği ile ilgili henüz net bilgiler elde edilememiştir.

Nöroinflamasyon OSB ilişkisi çeşitli hayvan modelleri üzerinde de gösterilmiştir. İnflamasyon tetiklenen hayvan modellerinde OSB benzeri davranış problemleri gözlemlenmiştir (16). OSB etiyolojisinde gebelik döneminde annenin viral enfeksiyon geçirmesi risk faktörleri arasında sayıldığından, poliriboinosinik-poliribositidilik asit (poly I:C) ile uygulanan maternal immun aktivasyon (MIA) modelinin otizm çalışmaları için uygun bir model olduğu düşünülmektedir (17). MIA modelinde otizm nöroinflamasyon ilişkisi hem davranış testleriyle hem de hücresel düzeyde gösterilmiştir (18). MIA modelinde gebe dişi hayvanlara uygulanan poliriboinosinik-poliribositidilik asit (poly I:C), sentetik çift zincirli bir RNA’dır ve Toll-like reseptör-3’e bağlanarak, NF- κ B aktivasyonu ve TNF- α , IL-6, IL-12 gibi sitokinlerin artışına neden olur (19). Gebelikte geçirilen soğuk algınlığı veya fırsatçı viral enfeksiyonları taklit eder(20). Gebe farelere sistemik olarak poly I:C verildiğinde, yavrularda otizm benzeri davranışlar ve kortikal tabaka oluşumunda bozulma, nöron sayısında artış, reelin azalması, hipokampusta artmış mikroglia aktivitesi, GFAP ifadesinde artış gözlenmiştir(21, 22). Benzer şekilde gebelikte hava kirliliğine maruz kalan farelerin yavrularında, özellikle serebellar bölgede kortikal kalınlık artışı ve histolojik olarak da hücre artışı gösterilmiştir(23). Özetle hayvan

çalışmaları MÍA, kortikal gelişim farklılığı ve nöroinflamasyon arasındaki ilişkiyi desteklemektedir (24).

Mikroglialar beynin savunma hücreleri olarak bilinmekle birlikte, farklı fenotiplerde iken farklı görevleri yerine getirebilirler. Örneğin klasik aktivasyonda görülen M1 fenotipindeki mikrogliaların viral veya bakteriyel enfeksiyona karşı savunma rolü varken, alternan aktivasyonda görülen M2 fenotipindeki mikrogliaların cevabında ise daha çok viral enfeksiyonun yarattığı hasarın antiinflamatuvar etkiyle düzeltilmesi ön plandadır. M2 mikrogliaların nöral progenitör hücrelerin üretimi ve myelin oluşumunu destekleyen beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF) salgıladığı da bilinmektedir(25) (26). Ayrıca, mikroglialar sinaptik budanma sürecinde kritik bir role sahiptir. OSB'de rol alan nöroinflamatuvar sinyal mekanizmaları içinde mikrogliaların önemli bir yeri olduğu, prenatal viral enfeksiyon ile antiinflamatuvar nitelikteki M2 tipi mikrogliaların etkilerinin arttığı, sinaptik budanmanın bozulduğu ve yanlış sinaptik bağlantılar oluştuğu bildirilmiştir (27, 28). OSB'li bireylerin ölüm ardı beyin incelemelerinde artmış mikroglia aktivasyonu ve dorsolateral PFK'da artmış mikroglial yoğunluk tespit edilmiştir (29). Yine ölüm ardı beyin dokularında, temporal kortekste aktif mikroglia sayısında artış bulunmuştur (30). Ayrıca, M2 tipi mikroglialara ait gen ekspresyonunun ölüm ardı OSB bireylerin beyinlerinde PFK'da artmış olduğu, serebellumda değişmediği görülmüştür (31).

OSB hayvan modellerinde dentat girus ve hipokampusta sinaptik maturasyonu sağlayan sinaptik budanma eksikliklerinin otizmdeki bazı davranış problemleriyle ilişkili olduğu gösterilmiştir (32). Mikroglia üzerindeki fraktalkin reseptörü CX3CR1'i silinmiş hayvanlarda, hipokampus CA1 bölgesinde immatür sinapsların budanmasında aksaklık, artmış eksitatuvar iletim ve bunlarla ilişkili davranış sorunları gösterilmiştir (33). Buna paralel olarak hem Poly (I:C) ile hem de LPS ile yapılan MÍA otizm modellerinde dentat girus ve subventriküler zonda yapılan immunohistokimyasal işaretlemelerde M2 mikroglia hakimiyeti gösterilmiştir (34, 35).



Şekil 1-1 Nörogelişimsel bozukluklarda genetik ve çevresel etkenlerin etkileşiminin nörogelişim üzerindeki etkisi.

Dendritik çıkıntı sayısındaki değişiklik ile belirtilerin ortaya çıkması arasındaki zamanlama ilişkisi özetlenmiştir. Şekil Forrest ve ark. 2018 den adapte edilmiştir(36). CNV: Kopya sayısı varyantı, SNV: Tek nükleotid varyantı, SNP: Tek nükleotid polimorfizmi.

Bu çalışmada; MIA yöntemiyle oluşturulan OSB modelinde, farklı fenotipteki mikrogliaların OSB patogenezi üzerindeki yeri ve önemi ile sinaptik budanma üzerindeki etkisinin aydınlatılması hedeflenmiştir. Hipotezimiz OSB belirtileri gösteren hayvanların beyininde medyal prefrontal kortekslerinde M2 tipi mikrogliaların M1 mikroglialara göre baskın görüleceği ve bunun sinaptik yoğunluk artışı ile ilişkili bulunacağı idi. Öncelikle MIA modeli oluşturmak için Poly (I:C) uygulanan gebelerin

yavrularının davranışlarında OSB'nin farklı klinik görünümüyle uyumlu spektrumsal bir dağılım gözlenmiştir: Bir grup farede sosyal defisitler daha belirginken, diğer grupta stereotipik davranışlarda artış görülmüştür. Böylece, kontrol (PBS) grubu, stereotipik davranış baskın Poly (I:C) grubu ve sosyal defisit baskın Poly (I:C) grubu olarak 3 ayrı grup oluşturulmuştur. Prefrontal korteks kalınlığı gruplar arasında benzer saptanmıştır. Ancak hipokampusun kalınlığı stereotipik davranış baskın Poly (I:C) grubunda diğer iki gruba göre fazla bulunmuş, bunun yanı sıra hipokampus kalınlığı ile stereotipik davranış arasında pozitif korelasyon saptanmıştır. Striatum kalınlığında gruplar arasında fark bulunmamıştır, bununla birlikte striatum kalınlığı ile öğrenme skorları arasında pozitif korelasyon tespit edilmiştir. Hipokampus kalınlığının striatum kalınlığı ile pozitif korelasyonu olduğu görülmüştür. Medyal prefrontal kortekste mikroglial hücre belirteci Iba-1, Ym-1, CD86 ile işaretlenen mikroglia sayısı gruplar arasında değişmemiştir. Sinaptik yoğunluk artışını belirtmek üzere yapılması planlanan dendritik çıkıntı sayımı konfokal görüntüleme sisteminde giderilememiş teknik aksaklık nedeniyle tamamlanamamıştır.

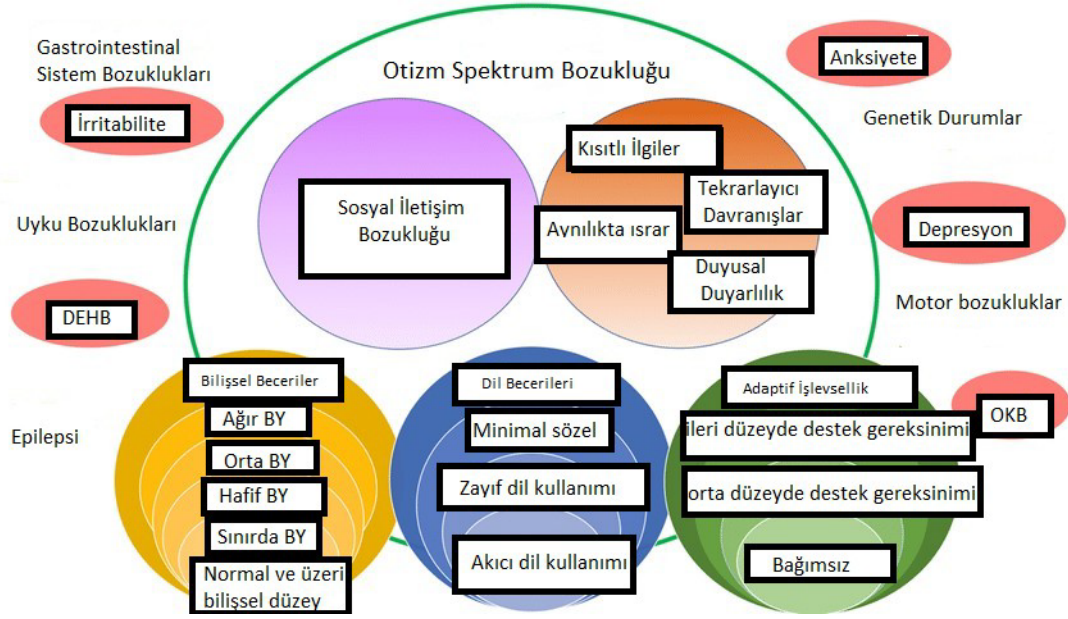
2 GENEL BİLGİLER

2.1 OSB Klinik Özellikleri

Otizm spektrum bozukluğu (OSB), sosyal yetersizlik, sınırlı ilgi alanları ve tekrarlayan davranışlarla karakterize, kronik bir hastalıktır (2). Bozukluğun önlenmesi ya da doğum öncesi tanısı mümkün olmadığı gibi, tanı ya da tedavi takibine yönelik laboratuvar testleri de mevcut değildir(36). Erkek cinsiyette baskın görülen bu bozukluğun yaygınlığının giderek artması, onu yaygın bir halk sağlığı sorunu haline getirmektedir(37). Bu sıklıktaki artışın hem belirtilerle ilgili toplumsal ve klinik farkındalığın artıp tanılanan hasta sayısının artmasıyla, hem de risk faktörlerinin de artış göstermesiyle ilişkili olduğu düşünülmektedir.

Klinik sunumdaki heterojenlik, OSB etiyojisi araştırmalarında büyük bir zorluktur. OSB ile sıklıkla anksiyete bozuklukları, obsesif-kompulsif bozukluk, tik bozuklukları ve duygusal regülasyon sorunları birlikte görülmektedir ve bu da farklı klinik görünümle ortaya çıkmaktadır (38). Eşlik eden psikiyatrik hastalıklar dışında belirtilerin çeşitliliği ve şiddeti hastadan hastaya değişmektedir. OSB'nin bir ucunda zihinsel engelli ve sürekli denetime ihtiyaç duyan ciddi davranış sorunları olan hastalar, diğer yanda akademik başarısı yüksek, bağımsız bir yaşam kurabilen hastalar vardır (Şekil 2-1).

OSB tanısının farklı semptom kümelerini içermesi, OSB'nin patofizyolojisinde farklı beyin devrelerinin rol oynadığını düşündürmektedir. Sosyal eksiklik, farklı hastalarda değişen şiddette, karşılıklılık, sözsüz ve sözlü iletişimdeki eksikliği içeren ana temel semptom kümesidir. Diğer bir semptom kümesi ise basmakalıp hareketler, aynılıkta ısrar, sınırlı ilgi alanları ve çevrenin duyuşal yönlerine karşı hipo/aşırı duyarlılık olarak ortaya çıkan sınırlı ilgi alanı ve tekrarlanan davranışlardır. Zihinsel yetersizlik ve buna bağlı öğrenme sorunları da sıklıkla birlikte görülebilmektedir. Son olarak 2013 yılında *The Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth Edition* (DSM-V, OSB tanısı altında bir spektrum teriminde tanımlanan klinik tabloları bir araya getirmiştir (1). DSM'nin kategorik yaklaşımı tanı ve insidans çalışmalarını kolaylaştırmayı amaçlamıştır ancak ne yazık ki bozuklukların altında yatan beyin devrelerini ve arkasındaki mekanizmaları anlamakta yetersiz kalmıştır.



Şekil 2-1 OSB de gözükken semptom kümeleri ve zorluk alanlarının heterojenliği. (Şekil Rosen ve ark. (2021) den adapte edilmiştir (40)).

DEHB: Dikkat Eksikliği Hiperaktivite Bozukluğu, OKB: Obsesif Kompulsif Bozukluk, BY: Bilişsel yetersizlik.

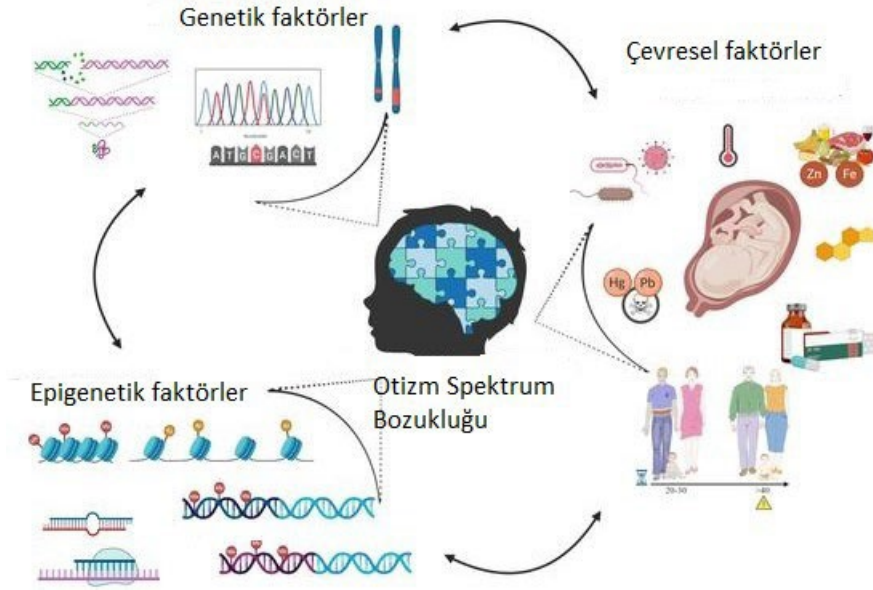
2.2. OSB Etiyolojisi

OSB'nin etiolojisinin kesin nedeni hala belirsizliğini korumaktadır. İkiz çalışmaları, monozigotik (MZ) ikizler arasında yüksek uyumun, dizigotik (DZ) ikizlerden çok daha düşük olması OSB'nin güçlü bir genetik bağlantıya sahip olduğunu göstermektedir (39). OSB'li hastaların %10-30'unda *denovo* ve kalıtsal genetik varyantlar etiolojide sorumlu bulunmaktadır. TSC1/TSC2 (tüberoskleroz kompleksi) veya FMR1 (kırılğan X mental retardasyon 1) genlerindeki mutasyonlar gibi OSB riskini artıran bazı gen mutasyonları bir süredir bilinmektedir ve yenileri keşfedilmektedir (örn. kromodomain helikaz DNA-bağlayıcı protein 8 (CHD8); *dual specificity tyrosine phosphorylation regulated kinase 1A* (DYRK1A), ve sodyum voltaj kapılı kanal alfa alt birim 2 (SCN2A) (42). Genetik araştırmalar dışında çevresel etkenler de sıklıkla araştırılmıştır. Gebelikte valproik asit kullanımı (40), hava kirliliğine maruz kalma ve babanın gebelik yaşı gibi ek faktörler, çocukta OSB olasılığını artırabilir (41, 42). Sağlıklı annelerle karşılaştırıldığında tip 1 veya tip 2 diyabet ve gebelik diyabetinin bulunduğu annelerden doğan bebeklerde OSB riskini arttırmaktadır (43). Bunlara ek olarak, epidemiyolojik çalışmalar hamilelik sırasında

annenin enfeksiyonu ile yavrularda nörogelişimsel kökenleri olan merkezi sinir sistemi (MSS) hastalıkları arasında bir ilişki olduğunu göstermiştir (Şekil 2-2). Rubellavirüs, sitomegalovirüs veya toksoplazmagondii gibi farklı enfeksiyöz patojenlere maruz kalma da nörolojik gelişimde bozulma ve nöropsikiyatrik bozukluk riskiyle bağlantılıdır (44).

Anne enfeksiyonu ile çocukta OSB tanısı arasındaki bağlantı ilk olarak 1960'lardaki Amerika Birleşik Devletleri'ndeki kızamıkçık salgınından sonra öne sürülmüştür. Doğum öncesi dönemde (özellikle ilk trimesterde) kızamıkçığa maruz kalan çocuklar sıklıkla konjenital kızamıkçık sendromu olarak adlandırılan hastalıkla doğarlar ve bu çocukların %8-13'üne daha sonra OSB tanısı konulmuştur (45). İlginç bir şekilde, enfeksiyonun kendisinden ziyade annenin bağışıklık sisteminin aktivasyonu, yavrularda artan OSB riski ile ilişkili gibi görünmektedir (46). Jiang ve ark. (2016) tarafından yapılan bir meta-analiz gebelik sırasında anne enfeksiyonunun, ister bakteriyel, ister viral olsun, birinci veya ikinci trimesterde meydana gelmesi durumunda, doğan yavrularda OSB riskinde %12'lik bir artışla ilişkili olduğunu belirtmiştir (50). Bu da MIA zamanlamasının önemli olduğunu göstermektedir (51). Danimarka Tıbbi Doğum Kaydı'ndan elde edilen verilerin analizi, hamilelerin ilk üç aylık dönemde viral enfeksiyonlar veya ikinci üç aylık dönemde bakteriyel enfeksiyonlar nedeniyle hastaneye götürülmesinin, çocuklarda takibeden yıllarda OSB tanısıyla ilişkili olduğunu ortaya koymuştur (52, 53).

Epidemiyolojik çalışmalar, hayvan modelleri ve vaka kontrol çalışmaları, annenin bağışıklık sisteminin aktivasyonunun otizm, Tourette sendromu ve obsesif-kompulsif bozukluğun ortaya çıkmasında önemli bir faktör olabileceğini göstermiştir (47). Bu risk faktörlerinin annenin bağışıklık sisteminin aktivasyonunun ters aktarımla, hayvan modellerine dahil edilmesi epidemiyolojik çalışmaların öngörücü potansiyeline önemli destek sağlamıştır (48).



Şekil 2-2 OSB etyolojisinde genetik, çevresel ve epigenetik faktörler. OSB etolojisine dair görsel Masini ve ark. 2020 den adapte edilmiştir(56).

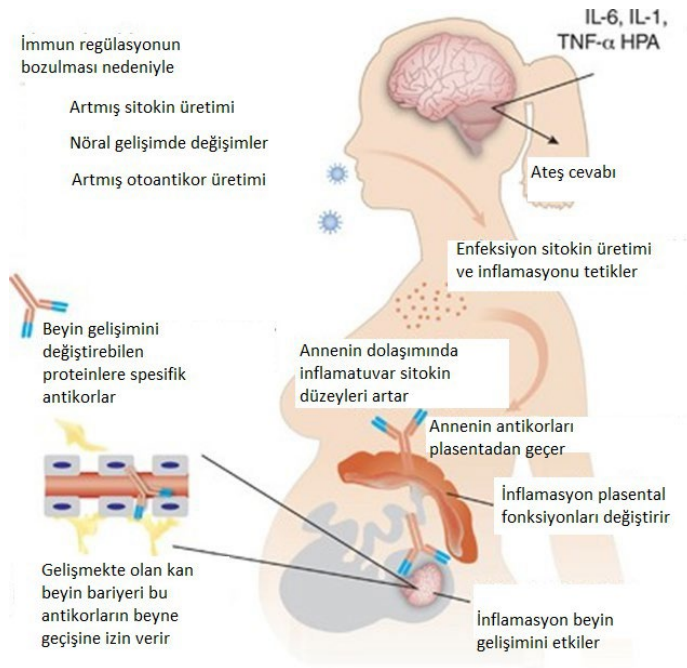
2.3. OSB Nöroinflamasyon İlişkisi

Otizm Spektrum Bozukluğunun (OSB) ve şizofreni gibi diğer nörodavranışsal bozuklukların patogenezinde nöroinflamasyonun rol oynadığı düşünülmektedir (49). Nöroinflamasyon ile OSB arasındaki karmaşık ilişki insan ve hayvan çalışmalarıyla ortaya kinsa da halen açıklanması gereken noktalar vardır(50). Çalışmalar, ölüm sonrası insan OSB beyinlerinde kan-beyin bariyeri (KBB) bütünlüğü ile ilişkili genlerin ifadesinin değiştiğini ve nöroinflamasyonun arttığını göstermiştir (51-53). Ayrıca, OSB tanısı alan bireylerin en az %69'unda mikrogliyal aktivasyon veya nöroinflamasyon olduğu gösterilmiştir (54). Ölüm sonrası çalışmalar, otizmlili bireylerin beyin çeşitli bölgelerinde nöroinflamasyon kanıtları göstermiştir (55). Araştırmalar, nöroinflamasyonun beyin gelişimi ve OSB ve şizofreni gibi diğer bozukluklarda gözlenen sosyal bilişsel eksiklikler üzerinde etkili olabileceğini göstermiştir (56).

OSB gelişiminde nöroinflamasyonun katılımı, anti-beyin antikorlarının varlığı, mikrogliyal aktivasyonun artması ve OSB'deki mezokortikostriatal sinir ağlarında sitokin konsantrasyonlarındaki artışlar arasındaki bağlantıların kanıtlarıyla desteklenmektedir (57). Ayrıca, OSB'li çocukların bir alt kümesinde nöronal dokuya reaktif antikorların varlığı, beyindeki bağışıklık fonksiyonunun değiştiğini

düşündürmektedir; bu da merkezi sinir sisteminde nöroglial aktivasyonu ve nöroinflamasyonu göstermektedir (58). Bunları destekler şekilde, OSB'li bireylerin beyin dokusunda inflamasyon, oksidatif stres ve mitokondriyal fonksiyon bozukluğu arasında bir ilişki olduğu rapor edilmiştir (59). Ayrıca hayvan modelleri, OSB'nin başlangıcında ve patogeneğinde nöroinflamasyonun rolüne ilişkin insan çalışmalarına paralel bilgiler sağlayarak, OSB ile ilişkili bilişsel bozukluklarda nöroinflamasyonun rolünü desteklemektedir (60).

Bağışıklık sistemi üzerine etkiler otoantikor oluşumu ile nöronal sistemi etkilediği gibi, normal beyin gelişimi ve sinaptik plastisite gelişimi sırasında gereken immun proteinlerin gereğinden fazla veya az bulunması da beyin gelişimini olumsuz etkileyebilir (Şekil 2-3).



Şekil 2-3 Otoantikor ve sitokin akışı mekanizmalarıyla maternal immun aktivasyon tetiklenmesinin özeti.

Şekil Meltzer ve Van de Water (2017) den adapte edilmiştir (69).

2.4. OSB - Maternal İmmun Aktivasyon Modeli

Hamile kemirgenlerde MİA'nın, davranış, histoloji ve gen ekspresyonunda şizofreni ve otizmi hatırlatan anormalliklere sahip yavrular ürettiği gösterilmiştir, bu da MİA'yı bu bozukluklar için yararlı bir model haline getirmektedir(61). MİA modeli,

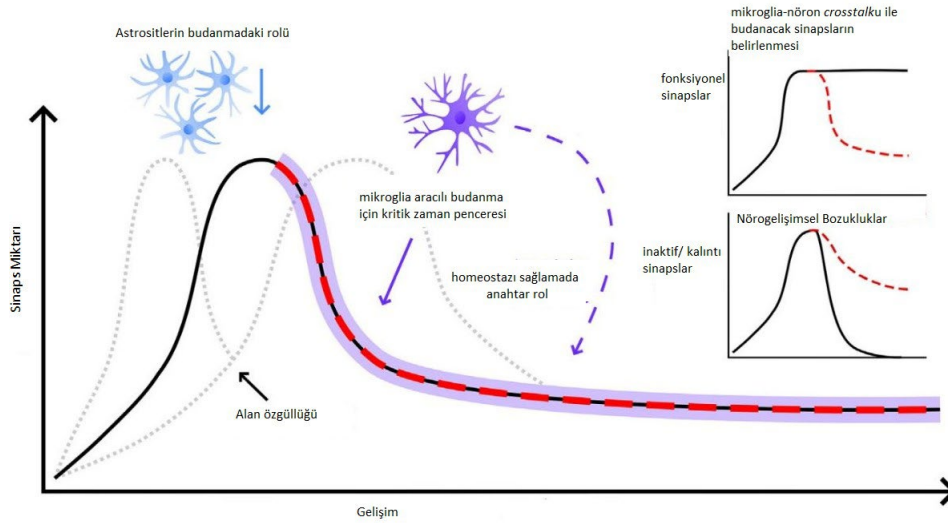
annenin bağışıklık tepkilerinin çocuğun nörogelişimi ve nöropsikiyatrik bozuklukların etyopatolojisi üzerindeki etkisinin aydınlatılmasında çok katkıda bulunmuştur. Bu hayvan modelleri ile moleküler mekanizmalar, davranışsal sonuçlar ve annenin bağışıklık aktivasyonunun uzun vadeli etkileri hakkında değerli bilgiler edinilmiştir.

MIA hayvan modelleri maternal immun aktivasyonun tek başına yaşam boyu nöropatolojiyi ve yavrularda değişen davranışları tetiklemek için yeterli olduğunu göstermiştir (16). Viral enfeksiyon veya sentetik çift iplikçikli RNA ile indüklenen kemirgen MIA modelinin, sosyal eksiklikler ve tekrarlayan davranışlar da dahil olmak üzere OSB'yi anımsatan davranışsal semptomlara sahip yavrular ürettiği gösterilmiştir (62-65). İnterlökin 6 (IL-6) ve IL-17a, MIA kaynaklı OSB'de anahtar sitokinler olarak tanımlanmış olup, spesifik inflamatuvar mediyatörlerin annenin bağışıklık tepkisindeki rolünü vurgulamaktadır (66).

Buna ek olarak, annenin bağışıklık aktivasyon modeli, anormal fetal beyin gelişiminin altında yatan temel mekanizmalar olarak fetal mikrogliaların anormal farklılaşmasına ve sitokin ağlarının düzensizliğine işaret etmiştir; mikroglia, pro-inflamatuvar bir fenotipe yönelik olarak hazırlanmıştır ve yavru morbiditesinde rol oynayan sinaptik budamanın değişmesine neden olmuştur (Şekil 2-3) (67).

2.5. Mikroglia, Mikroglial Fenotipler ve Sinaptik Budanma İlişkisi

Çalışmalar MSS'teki yerleşik bağışıklık hücreleri olan mikrogliaların nörogenezi, nöronal göçü, sinaptik budamayı ve bağışıklık fonksiyonunu düzenlemede önemli bir rol oynadığını göstermiştir. Ölüm sonrası dokularda ve OSB'li hayvan modellerinde artan sayıda reaktif mikrogliala ilişkin raporlarla birlikte, mikroglial fonksiyonun düzensizliği OSB ile ilişkilendirilmiştir (31, 68). Ayrıca anormal mikroglial fonksiyon, sinaptik olgunlaşma ve fonksiyondaki eksikliklerle ilişkilendirilmiştir (Şekil 2-4) ve bu da OSB'nin patofizyolojisine doğrudan bir katkı olduğunu düşündürmektedir (69). Ek olarak, mikrogliaların sinaptik budama ve sosyal davranış bozukluklarında rol oynadığı ve çevresel etkenlerin mikrogliaların işlevsel durumlarını değiştirerek OSB riskini artırabileceği öne sürülmüştür (70, 71).

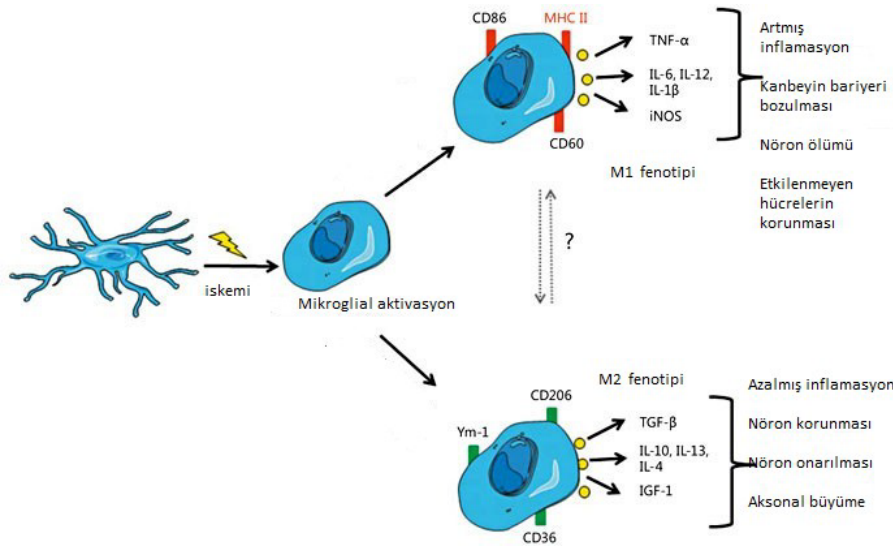


Şekil 2-4 Mikroglia sinaptik budanma ilişkisi

Şekilde normal gelişim sırasında mikroglial aktivitenin doğru zamanlamasıyla sinaptik budanmanın gerçekleştiği, bu sürecin aksaması sonucu sinaptik yoğunluğun olması gerekenden fazla kaldığında nörogelişimsel bozuklukların ortaya çıkmasına dair süreç açıklanmıştır. Şekil Mordelt ve ark.2023 ten adapte edilmiştir (81).

Mikroglia fenotipleri, anormal aktivasyon durumları ve polarizasyon belirtileri gösterir. OSB çalışmalarında hem antiinflamatuvar M2 polarize mikroglialar (31, 72-75) hem de proinflamatuvar M1 fenotiplerin baskın görüldüğüne dair kanıtlar vardır (Şekil 2-5) (76-78).

Mikroglia'nın M2 fenotipi, anti-inflamatuvar işlevlerle ilişkilidir ve beyin onarımı ve nöroproteksiyonda rol oynadığı gösterilmiştir. Dolayısıyla sinaptik budanmada bozulma ve sinaptik yoğunlukta artış ile görülen OSB'nin mikroglia M2 baskın anti-inflamatuvar fenotipi ile potansiyel bir bağlantısı olması olasıdır. Çalışmalar, M2 fenotipindeki mikrogliaların mobilitelerinin azaldığını, sinaptik budanmada bozulma olduğu ve sonuçta OSB benzeri davranışların gelişimini tetiklediğini göstermiştir (89, 90). Ek olarak endokanabinoid sistem, mikroglia'da antiinflamatuvar, nöroprotektif bir fenotipin teşvik edilmesiyle ilişkilendirilmiştir (91). Ayrıca, M1/M2 makrofajlarının oranının, OSB tanısı için potansiyel bir yardımcı araç olarak önerilmesi, OSB bağlamında M2-baskın antiinflamatuvar fenotiplerin önemine işaret etmektedir (92, 93) OSB'li çocukların beyinlerinde bir anti-inflamatuvar sitokin olan IL-37'nin arttığını bildirilmiş olması da, OSB'de anti-inflamatuvar mekanizmaların katılımını daha da desteklemektedir (94).



Şekil 2-5 Mikroglia farklılaşması.

İskemi gibi bir travmatik etkiyle, mikroglial fenotiplerin ne yönde gelişebileceğine dair, inflamatuvar ve antiinflamatuvar her iki yolağı ve fenotiplere dair markerların bazılarını gösteren şekil Barakat ve ark. 2015'ten adapte edilmiştir (95).

Özetle, mikroglialının M2-baskın antiinflamatuvar fenotipi, OSB'nin patofizyolojisinde önemli bir rol oynuyor gibi görünmektedir ve potansiyel olarak nörokoruma, beyin onarımı ve nöroinflamasyonun modülasyonuna katkıda bulunmaktadır. Mikroglialdaki M2 polarizasyonunun altında yatan mekanizmaları anlamak, OSB için yeni terapötik stratejilerin geliştirilmesine ilişkin değerli bilgiler sağlayabileceği düşünülmektedir.

Bu bilgilerden yola çıkılarak oluşturulan araştırma hipotezlerimiz şöyle özetlenebilir:

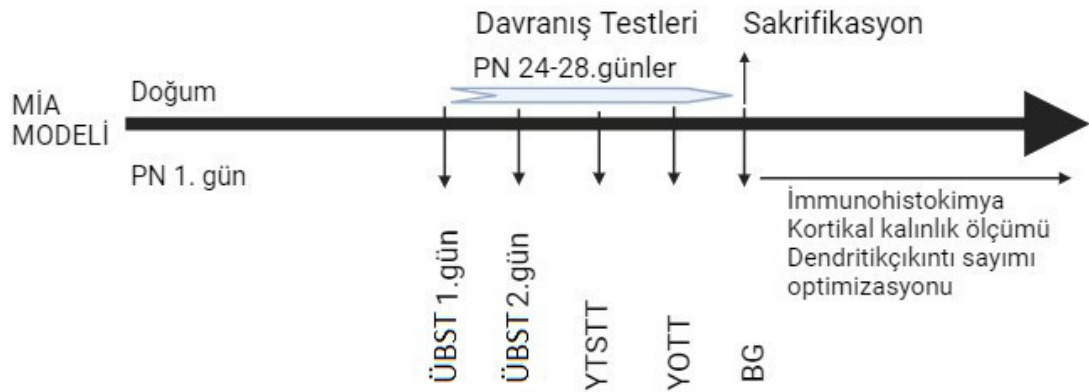
1. MIA yöntemiyle oluşturulan OSB modelinde, prenatal Poly (I:C) uygulanmış hayvanların beyinlerinde medyal prefrontal kortekste Iba ile gösterilecek mikroglia sayısı, kontrollere göre fazla bulunacaktır.
2. Prenatal Poly (I:C) uygulanmış hayvanların beyinlerinde medyal prefrontal kortekste M2 tipi mikroglialar M1 mikroglialara göre baskın görülecektir, başka bir ifadeyle M2/M1 oranında artış gözlenecektir.
3. Prenatal Poly (I:C) uygulanmış hayvanların OSB benzeri davranışları ile medyal prefrontal korteksteki sinaptik yoğunluk (dendritik çıkıntı sayısı) ile ilişkili bulunacaktır.

3 GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Araştırmanın Örneklemi

OSB modelinin yerleştirilmesi için öndeneyle bir THY-Ch2-YFP heterozigot transgenik erkek fareyle çiftleştirilen üç C57BL/6 dişi fareye doğan 19 fare kullanıldı. Modelin yerleştirilmesinin ardından 6 THY-Ch2-YFP heterozigot transgenik erkek ile 2'şerli C57BL/6 dişi fare (n:12) ortak kafeslere alındı. Vajinal tıkaç (*plug*) ile gebelik tespiti sonrasında, erkek fareler kafeslerden alındı. Toplam 4 gebe fare (2 kafes) kontrol grubu olarak seçildi ve intraperitoneal (ip) fosfat tamponlu salin (PBS) uygulandı. Diğer 4 kafesteki 8 gebe fareye ise ip Poly (I:C) uygulandı. Böylece oluşturulan gruplardan elde edilen toplam 20 yavru ile (6 adet PBS (kontrol), 14 adet poly:ic) davranış deneyleri planlandığı şekilde postnatal 24-28. günler arasında yapıp, en son testin uygulandığı gün ötenazi gerçekleştirildi. Sonrasında farelerin beyinleri sagittal olarak ikiye ayrıldı. Beyinlerin yarısı %4 paraformaldehit (PFA)'da yarısı da formolde saklandı. Arkasından moleküler analizlere geçildi (Şekil 3-1).

Araştırma, Hacettepe Üniversitesi Hayvan Çalışmaları Yerel Etik Kurulu tarafından,



Şekil 3-1 Deney akış özeti:

MİA modeli uygulaması sonrasında, yavrular doğduktan sonra takip edildi ve üç bölmeli sosyalleşme testi (ÜBST), yabancı/tanıdık sosyal tercih testi (YTSTT) ve yeni obje tanıma testi (YOTT), bilye gömme (BG) testleri ardışık olarak 24-28. postnatal günlerde gerçekleştirildi. BG testi uygulanan gün ötenazi sonrası beyinler saklandı. Davranış deneyleri analizleri sonrası immunohistokimya deneylerinde incelenecek beyinler seçildikten sonra immunohistokimya ve dendritik çıkıntı sayılması yöntemlerinin optimizasyon süreçleri başladı.

3.1.1 Deney Gruplarının Oluşturulması

Thy1-ChR2-YFP transgenik erkek(n:6) ve C57BL/6 dişi fareler(n:12) çiftleştirildi ve dişiler her sabah vajinal tıkaç varlığı açısından incelendi. Vajinal tıkaç varlığı embriyonik 0,5. gün olarak kabul edildi (Şekil 3-2). Sonrasında fareler tartılarak, karın büyümesi açısından gözlenmeye devam edildi.



Şekil 3-2 Vajinal tıkaç:
Saptanan vajinal tıkaçta dair resim yer almaktadır.

3.1.2 MİA Modeli Uygulanması

Çalışma grubundaki farelere (8 gebe fare) gebeliğin 11,5. ve 12,5. günlerinde viral enfeksiyonu taklit edecek ip poly I:C (sentetik çift zincirli RNA) uygulaması yapıldı. Kontrol grubuna ise (4 gebe fare) gebeliğin 11,5. ve 12,5. günlerinde iki kez ip PBS uygulandı. Sonrasında her iki grubun yavrularına (n: 20) doğumdan sonra postnatal 24-28. günler arasında (sütten kesme sonrası) davranış deneyleri uygulandı (17). Araştırmada kullanılan yavruların gruplara ve genotiplere göre sayılarının dağılımı aşağıda (Tablo 1)'de belirtilmiştir.

Tablo 1. Kullanılan yavru sayıları

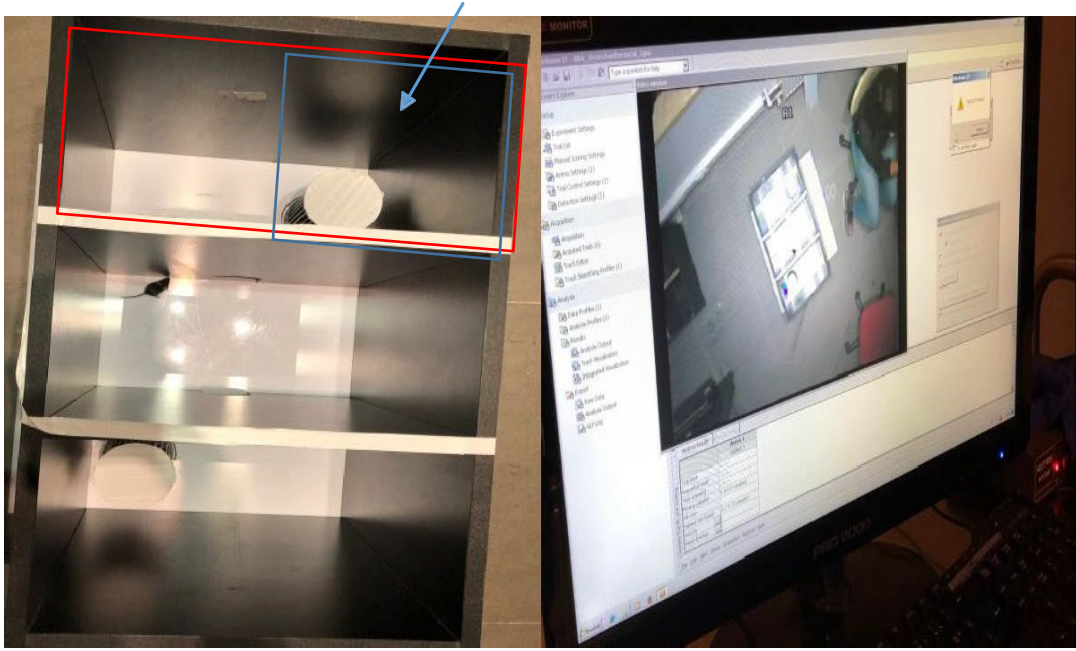
Araştırmada kullanılan yavruların gruplara ve genotiplere göre sayılarının dağılımı (Thy +:Thy1-ChR2-YFP pozitif, Thy-: Thy1-ChR2-YFP negatif)

Grup(n)	Genotip		Toplam
	Thy+	Thy-	
Total PBS yavru	3	3	6
Seçilen PBS yavru	1	3	4
Total Poly (I:C) yavru	10	4	14
Seçilen StD yavru	3	1	4
Seçilen SDD yavru	1	3	4

3.1.3 Davranış Deneyleri

3.1.3.1 Sosyal Tercih Testi/Üç Bölmeli Sosyalleşme Testi:

Sosyalleşme alanındaki defisitleri saptamak için kullanıldı. Fareler, 1 saat habituasyon için temiz taşıma kafesinde bekletildi ve sonra 3-4 saatlik bir period içinde toplamda 10 dakika boyunca boş 3 odalı alana bırakıldı. Ertesi gün fareler ortadaki bölmeye kondu, 5 dakika boyunca sağ ve sol alana geçmesine izin verilmeden bulunduğu yeri incelemesine izin verildi. Kullanılan oda alanları testler öncesinde temizlendi. Bundan sonra aradaki bariyerler kaldırılıp, içlerinde bir tarafta oyuncak fare, diğer tarafta farklı bir kafesten alınan, deney yapılan fareye yabancı bir fare konmuş olan alanlara geçişine 10 dakika süresince izin verildi. Her seansta hem sosyal bölmede hem de sosyal bölmenin farenin bulunduğu kafesi içeren yarısında (sosyal yarı bölme) canlı fare ile etkileşimde buldukları süreler (sn), giriş çıkış frekansları ve o bölmeye girme latansları kayıtlı videolardan analiz edildi. Analizler farelerin genotipine ve deney grubuna kör bir gözlemci tarafından yapıldı (79) (Şekil 3-3). Değerlendirmede, **sosyalizasyon indeksi** = [canlı hayvanın olduğu bölme veya yarı bölmede geçirilen zaman(sn)/ tüm bölmelerde geçirilen zaman(sn)] şeklinde, **frekans indeksi**: (canlı hayvanın bulunduğu bölme veya yarı bölmeye giriş çıkış sayısı/ tüm bölmelere giriş çıkış sayısı) olarak hesaplandı. Latans ise sosyal bölme/yarı bölmeye ilk geçişe kadar geçen süre (sn) olarak değerlendirildi.



Şekil 3-3 Üç bölmeli sosyalleşme deneyi

Üç bölmeli sosyalleşme testi düzeneği solda, test sırasında alınmış Ethovision görüntü çekimi sağda yer almaktadır. (Mavi okla işaretli mavi alan sosyal yarıbölme, etrafı kırmızı renkle işaretli kırmızı alan ise sosyal bölme göstermektedir.)

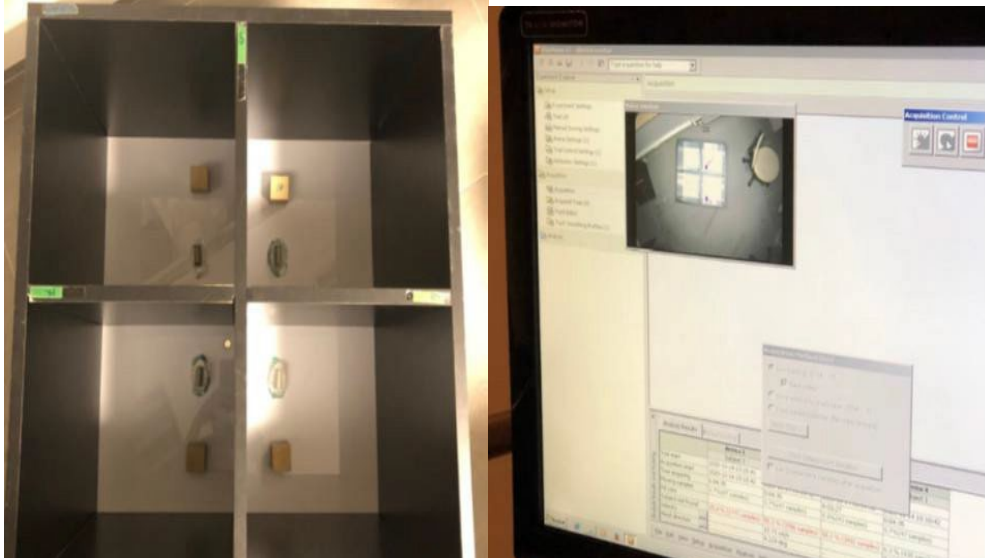
3.1.3.2 Yabancı/ Tanıdık Sosyal Tercih Testi

Sosyalleşme alanındaki defisitleri saptamak için üç bölmeli sosyalleşme testinin devamında kullanılmaktadır. Bu testin uygulanmasına dair başka bir deneyin parçası olarak laboratuvarımızda bir ön uygulama yapıldıktan sonra, bu basamağında davranış testlerimize eklenmesine karar verildi. 3 bölmeli sosyalleşme testinin uygulandığı günün ertesi gün, üç bölmeli sosyalleşme testi esnasında oyuncığın bulunduğu kafese tanışık olmadığı bir fare, diğer kafese ise aynı kafesten bir yavru kondu. Sonrasında test edilecek fare ortadaki bölmeye konulup ve kapılar açık bırakılarak, 10 dakika boyunca ortamı incelemesine izin verildi. Test edilen hayvanın yabancı hayvana daha çok ilgi duyup, daha çok onu keşfetmeye çalışarak vakit geçirmesi beklendi. Her seansta iki taraftaki farelerle etkileşimde buldukları süreler (2 cm'lik alan içinde yaklaşma, koklama), bölmelere giriş çıkış frekansları ve ilk giriş latansları kaydedilen videolardan analiz edildi. Analizler farelerin genotipine ve deney grubuna kör bir gözlemci tarafından yapıldı(80). Değerlendirmede, yabancı ve yeni olan sosyal hedefle **sosyalizasyon indeksi** = [yeni hayvanın olduğu bölme ve yarı bölmede geçirilen zaman (sn)/ tüm bölmelerde geçirilen zaman (sn)] şeklinde, **frekans**

indeksi = (yeni hayvanın bulunduğu bölme veya yarı bölme giriş çıkış sayısı/ tüm bölmelere giriş çıkış sayısı) olarak hesaplandı. Latans ise yeni sosyal hedefin olduğu sosyal bölme veya yarı bölme ilk geçişe kadar geçen süre (sn) olarak değerlendirildi.

3.1.3.3. Yeni Nesne Tanıma Testi

Farelerin kısa dönem ve uzun dönem nesne hafızalarını değerlendirmek için kullanılmaktadır (81). Deneylerimizde ise OSB grubu içinde farklılaşan öğrenme ve zihinsel esnekliği değerlendirmek üzere bu test seçildi. Fareler boyutları 22.5x22.5x30 cm olan kutuya konduktan sonra kutuya alışmaları için 10 dakika beklendi. Ertesi gün kutunun köşelerine 6 cm boşluk bırakılarak iki nesne yerleştirilip, 10 dakika boyunca farelerin bu kutuda her bir nesneyle geçirdikleri süre ve nesnelerin olduğu bölgelere giriş sıklığı video ile kaydedildi. **Kısa dönemli belleği** değerlendirmek amacıyla **6 saat sonra** nesnelere birisi yeni bir nesneyle değiştirilerek 5 dakika boyunca Ethovision XT8 ile her nesnenin etrafında geçirdiği süre ve nesnelerin olduğu bölgelere giriş sıklığı kaydedildi (Şekil 3-4). Belleği sağlam olan farelerin eski nesnelere öğrenmesi ve hatırlaması beklendiğinden, yeni nesne etrafında daha fazla süre geçirmeleri ve/veya nesnelerin olduğu bölgelere daha fazla girmeleri beklenmektedir. **Öğrenme ve bellek indeksi** [yeni nesne etrafında geçirilen süre veya sıklığın, "yeni +eski" nesnelere etrafında geçirilen süre veya sıklığın toplamına] bölünmesi



Şekil 3-4 Yeni nesne tanıma testi.

Yeni nesne tanıma testi için hazırlanan düzenek solda, testin Ethovision'da çekimine dair görsel sağda yer almaktadır.

3.1.3.4 Bilye Gömme Testi

Gömülü bilye sayısı ile stereotipik davranış arasında ilişki vardır (62). Fareler 3-4 cm talaş yerleştirilmiş temiz bir kafese 30-60 dakika boyunca alıştırdıldıktan sonra kafese 15 adet bilye grid biçiminde simetrik yerleştirildi. 15 dakikalık inceleme fırsatından sonra fareler tekrar kafeslerine alınıp, gömülü bilyeler sayıldı. Tam ve yarısından fazla ($\frac{3}{4}$) gömülen bilyeler değerlendirmeye alındı (Şekil 3-5).



Şekil 3-5 Bilye gömme testi.

Bilye gömme testi öncesine ait görünüm solda, sonrasına ait görünüm sağda yer almaktadır

3.2 Perfüzyon

Davranış testlerinin tamamlanmasının ardından hayvanlara ip 1000 mg/kg dozunda verilmiş kloralhidrat anestezisi altında %4 PFA ile kardiyak perfüzyon yapıldı. Farelerin beyinleri sagittal olarak ikiye ayrılıp, yarısı %4 PFA'da yarısı formolde saklandı. PFA dan çıkarılmış beyinler, %30' luk sükröz solüsyonuna alınıp, +4°C ' de beyinler dibe çöktükten sonra, kullanılacağı güne kadar -80°C ' de saklandı. İmmunohistokimya çalışmaları için seçilen beyinlerin PFA'da fikse edilen yarısından kriyostatla 660 mikronluk kalınlığı örnekleyecek şekilde (PFK yapılarını içine alacak alanda) 200 mikron arayla 20 mikronluk 3 kesit alındı.

3.3 İndirekt İmmüno Floresan İşaretleme

Alınan beyin kesitlerinde medyal PFK'da mikrogliolar immunohistokimyasal olarak Iba-1 antikoru ile gösterildi. M2 işaretleyicisi olarak CD206, Ym-1; M1 işaretleyicisi olarak MHC-2, CD86 antikorları kullanıldı. Alınan kesitler önce PBS altında oda sıcaklığında 10 dakika (dk) bekletilip, ardından kesitler 3 defa 5'er dk süreyle PBS ile yıkandı. Daha sonra oda sıcaklığında %0,5'lik TritonX-0,3 M Glisin'in olduğu %10'luk normal keçi serumu (NGS) ile 1 saat bloke edildi. Gece boyu blokaj solüsyonu içinde bir veya farklı konak hayvanlarda üretilmiş üç farklı primer optimize edilmiş konsantrasyonlarda antikorla +4 ° C'de inkübe edildikten sonra, 3 defa PBS ile 5'er dakikalık yıkama yapılmış ve blokaj solüsyonu içerisinde keçi anti-sıçan-Cy3 ve tavşan anti-fare Cy2 sekonder antikorlarla 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi (Tablo 2). Ardından 3 kere 5'er dakika süreyle PBS ile yıkandıktan sonra Hoechst- 33258 ile kesitler kapatılıp, 20X'lik sulu objektifle konfokal mikroskobu ile görüntüledi. Araştırmamızda Thy1-ChR2-YFP kökenli fareler kullanıldığı için, Thy1-ChR2-YFP pozitif farelerde ikili işaretleme CY3 renkte emisyon veren Goat anti-Rat IgG sekonder antikorlarla yapılamadı. Bu nedenle konfokal mikroskopun lazer ışık donanımının izin verdiği tek şekilde Iba1, CD86 ve Ym-1'nin herbiri için ayrı işaretleme yapıldı. Iba-1, CD86, Ym-1 sayımları araştırma gruplarına kör bir araştırmacı tarafından yapıldı.

İmmünohistokimyasal işaretleme prosedürü sonrası, PBS grubundan 4, Poly (I:C) grubundan seçilen 7 hayvandan 2'ser beyin kesitinde her kesitten ikişer görüntü konfokal mikroskopla alınarak, medial PFK bölgesinde Iba1 işaretleme görüntüledi. Iba görüntülemelerinin analizleri PBS (n:4), StD (n:3), SDD (n:4) gruplarında tekrarlandı.

CD86 ve Ym1 işaretleme için kullanılacak sekonder antikor Thy1-ChR2-YFP pozitif hayvan beyinlerinde yakın dalga boyunda ışıma verdikleri için, bu değerlendirmeye sadece Thy1-ChR2-YFP negatif hayvan beyinlerinden alınan kesitlerin dahil edilmesine karar verildi. PBS grubunda 3, StD Poly (I:C) grubunda 1, SDD grubunda 3 Thy1-ChR2-YFP negatif hayvan bulunması sebebiyle, Iba boyaması gibi 3 grupta yapılan analiz CD86, Ym1 işaretleme için tekrarlanamamıştır. Dolayısıyla, CD86 ve Ym1 işaretleme sadece Thy1-ChR2-YFP negatif olgulardan

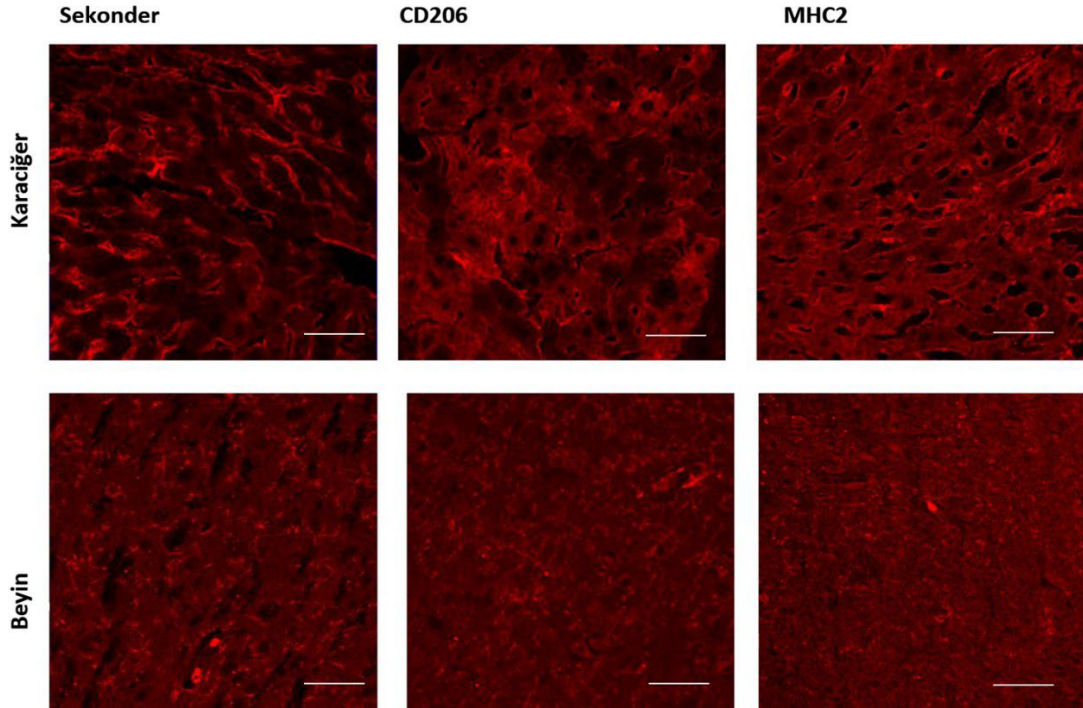
oluşan PBS kontrol grubundan ve Poly (I:C) grubundan seçilen 3'er hayvandan ikişer kesit ve her kesitten alınan 2 görüntüde incelendi (Tablo1). Araştırmada immunohistokimya için kullanılan primer ve sekonder antikorlar (Tablo 2)'de belirtilmiştir.

Tablo 2 Araştırmada kullanılan birlikte kullanılan primer, sekonder antikorlar ve konsantrasyonları

Antijen	Primer antikor	Sekonder antikor
Iba	Tavşan Anti-Iba1 Antikoru (019-19741)- Wako Sigma Aldrich (1/200)	Jackson Cy2 Keçi Anti-tavşan (1/200)
MHC2	Fare Anti-MHC Class 2 Antikoru ABCAM (Ab 55152) (1/50-1/500)	A10521 Invitrogen keçi anti-fare IgG (cyanine3) 115-095-164 Jackson FITC saf keçi anti-fare IgG (1/200)
CD206	Fare Anti-CD206 ABCAM (ab 8918) (1/50-1/500)	A10521 Invitrogen keçi anti-fare IgG (cyanine3) 115-095-164 Jackson FITC saf keçi anti-fare IgG (1/200)
CD86	Sıçan Anti-Mo CD86 eBioscience (14-0862-82) (1/200)	A-11006 Invitrogen Keçi anti-sıçan IgG (H+L) <i>Cross-Adsorbed</i> Sekonder Antikor, Alexa Fluor™ 488(1/200)
Ym1	Sıçan Anti-Ym1/ Chitinase benzeri protein 3 (Ab 2446) (1/200)	A-11006 Invitrogen keçi anti-sıçan IgG (H+L) <i>Cross-Adsorbed</i> Sekonder Antikor, Alexa Fluor™ 488 (1/200)

3.3.1 Yöntemin Optimizasyon Çalışmalarının Özeti

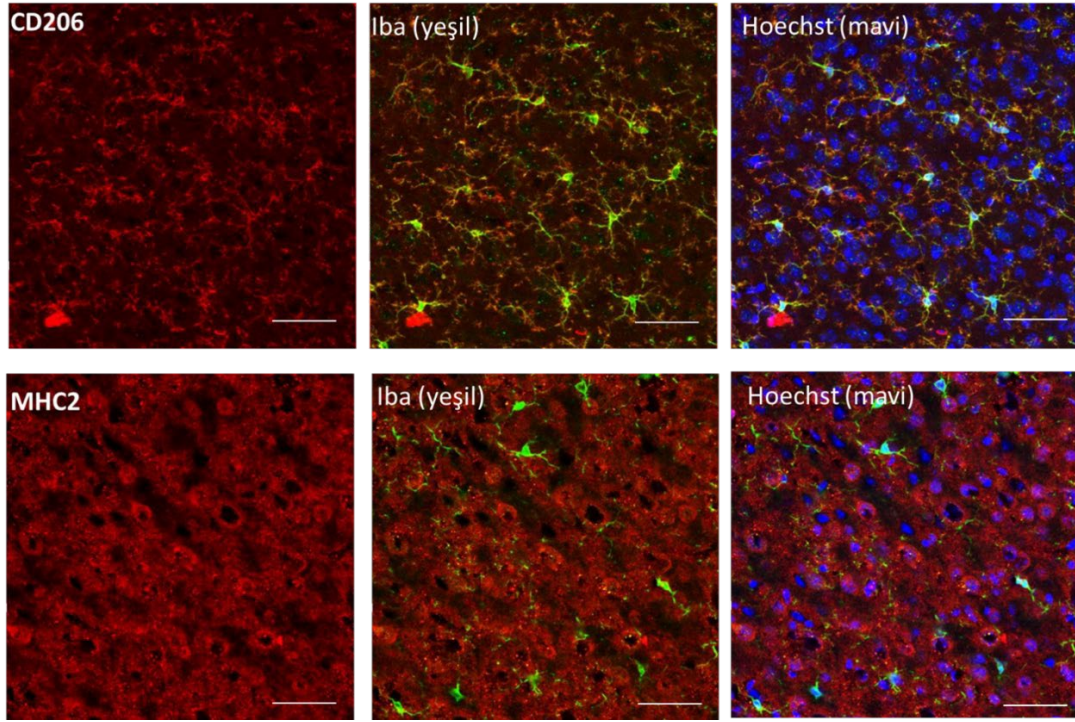
M2 ve M1 işaretlemeleri için seçilen antikorlarla (M1 için MHC2 ab8918 ve M2 için CD206 ab55152) optimizasyon çalışmalarında pozitif kontrol olarak karaciğer dokusu kullanıldı. Negatif kontrol olarak primer antikor uygulanmadan işaretleme yapıldı (Şekil 3-6). Değerlendirmelerde zemin işaretleme fazla olduğu gözlemlendi, ve negatif kontrolde de benzer sinyal gözlenmesi nedeniyle işaretleme özgül olmadığı düşünüldü.



Şekil 3-6 CD206 ve MHC2 antikorları ile pozitif ve negaif kontrol işaretlenmesi. CD206 ve MHC2 antikorları ile işaretleme negatif (sadece sekonderle işaretlenmiş beyin dokusu) ve pozitif kontrollerle (karaciğer dokusu) karşılaştırılmalı verilmiştir (Görüntüler 25xlik objektifle konfokal mikroskopta alınıp, 50 mikron ölçekleme ile yapıldı)

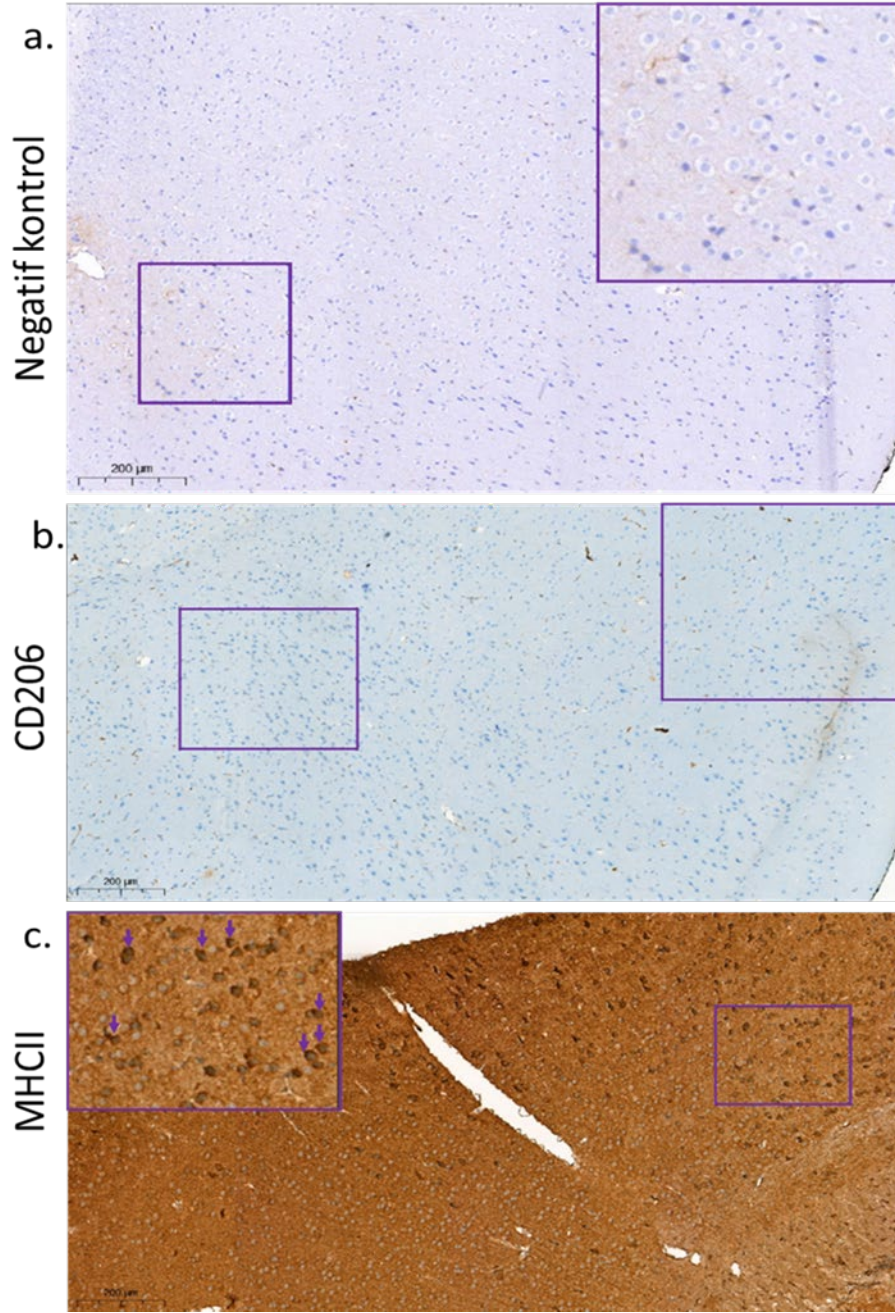
Yazında bu antikorlarla ilgili işaretleme protokolleri incelendi, ve uyguladığımız protokolda bazı değişiklikler yapılması öngörülerek protokolümüz güncellendi. Antikor üreticisinin önerisi ve benzer yöntemli yayınlar doğrultusunda antijen *retrieval* basamağı eklenip hem *freefloat* hem de standart lam üzerine alınan kesitlerde işaretleme yapıldı. Bunlara ek olarak, PBS yerine yıkamalarda TBST kullanılması, non-spesifik bağlanmaları azaltmak üzere blokaj solüsyonunun %5 NGS + %1 sığır serum albumini (BSA) olarak hazırlanması, primer antikorların dilüsyonlarının seyreltilmesi (1:200) de denendi ancak alınan görüntülerde değişiklik olmadı.

Bu esnada CD206 ve MHC2 boyamalarında boyamaların mikroglialar ile çakışmasını gözlemlemek için Iba-1 antikoru ile ikili işaretleme de yapıldı. Burada da gözlenen sinyallere benzer sinyallerin negatif kontrolde de gözlenmesi üzerine antikorların optimal çalışmadığı kanaatine varıldı. Sinyallerin Iba-1 ile çakışmaması da bu kanaati destekledi (Şekil 3-7).



Şekil 3-7 CD206 ve MHC2 antikorlarının Iba ile kolokalizasyonları. CD206 ve MHC2 ile Iba kolokalizasyonuna yönelik işaretleme denemesinde iki işaretlenmenin çakışmadığı görülmektedir. (Görüntüler 25xlik objektifle konfokal mikroskopta alınıp, 50 mikron ölçekleme ile yapıldı).

İmmüno Floresans ile dendiğimiz bu iki primer antikorun DAB ile çalışıp çalışmadığının gözlenmesi için Ankara Üniversitesi Patoloji Anabilim Dalında parafin kesitlerden otomatize sistemle işaretleme denemesi yapıldı. Her ne kadar sagittal beyin kesit işaretlemelelerinde pozitif kontrol dokularından elde edilen görüntülere benzer düzeyde MHC-2 sinyali (M1 işaretleyicisi olarak) ve CD206 sinyali (M2 işaretleyicisi olarak) gözlemlenerek de (Şekil 3-8 b ve c), negatif kontrollerde de immüno Floresanstakiyle uyumlu biçimde benzer sinyal gözlenmesi üzerine (Şekil 3-8a) alternatif M1 ve M2 mikroglial işaretleyiciler kullanılması planlandı.

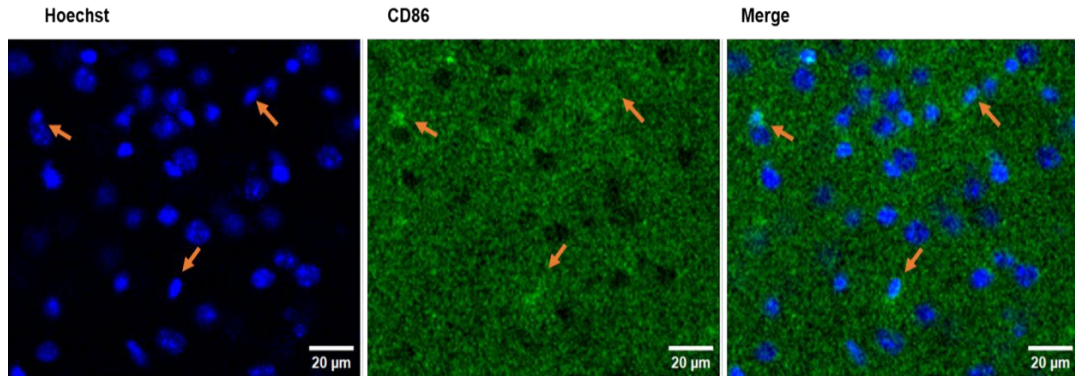


Şekil 3-8 DAB'lı MHC2 ve CD206 antikorlarının işaretlenmesi.

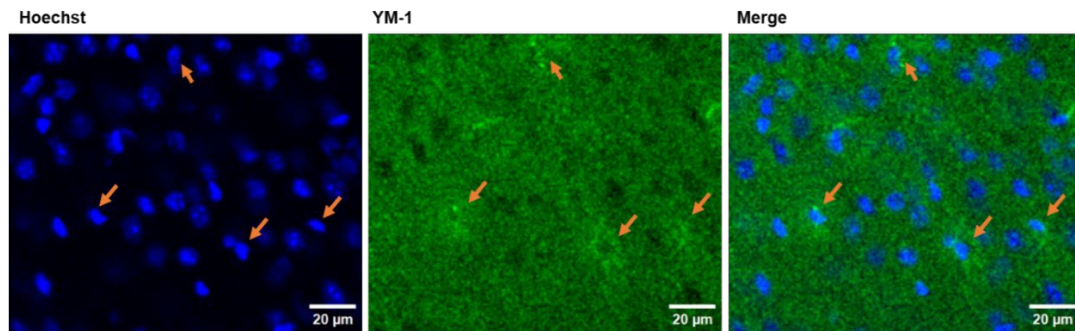
a. Üstte medyal prefrontal beyin kesitinde negatif kontrol, **b.** DAB'lı CD206 boyaması, **c.** DAB'lı MHC2 boyaması gösterilmektedir. (Görüntüler 10'luk objektif büyütmesinde Slideviewer programı ile alınıp, 200 mikronla ölçeklendirildi).

Yaptığımız literatür araştırması sonucunda öne çıkan M1 işaretleyicisi CD86 ve M2 işaretleyicisi Ym1 antikorlarıyla immünohistokimyasal işaretlemeler tekrarlanmıştır. Bu çalışmalar sonucunda spesifik işaretlenmeler gözlenmiş, negatif kontrollerde benzer sinyal gözlenmemiştir. Bu nedenle çalışmaya bu antikorlarla devam edilmesi kararlaştırılmıştır.

En son bu antikorlar ile yapılan ayrı boyamalara ait işaretlemeler Şekil 3-9 ve Şekil 3-10' da görülmektedir.



Şekil 3-9 Şekilde medyal PFK kesitinde CD86 işaretlemesi çekirdek etrafında turuncu oklarla gösterilmektedir. (Görüntüler 25xlik objektifle konfokal mikroskopta alınıp, 20 mikron ölçekleme ile yapıldı).

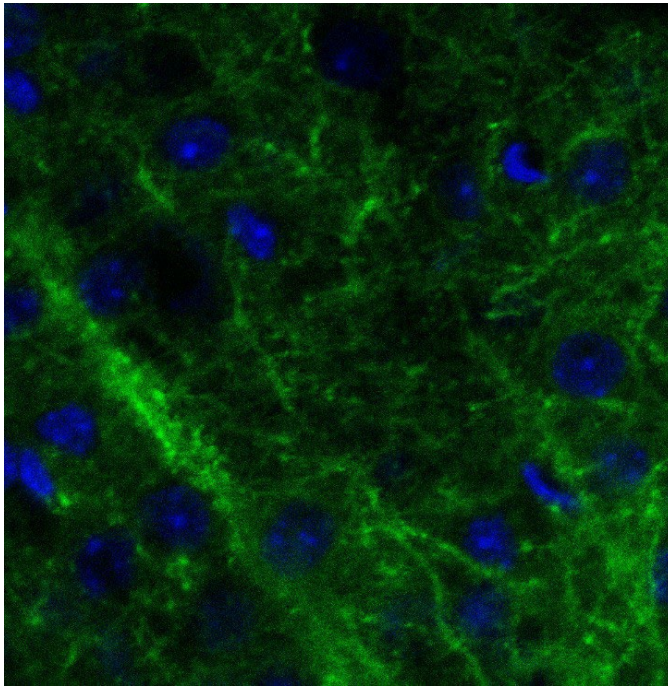


Şekil 3-10 Şekilde medyal PFK kesitinde Ym1 işaretlemesi çekirdek etrafında turuncu oklarla gösterilmektedir. (Görüntüler 25xlik objektifle konfokal mikroskopta alınıp, 20 mikron ölçekleme ile yapıldı).

3.4 Dendritik Çıkıntı Sayısı Değerlendirmesi

Araştırmada sinaptik yoğunluğun dendritik çıkıntı sayısı ile gösterilmesi, öncelikle dendritik çıkıntıların Neuron Studio yazılımı ile 15-40 um uzunluğundaki dendrit segmentlerindeki çıkıntıların sayılması şeklinde değerlendirilmesi planlandı. Sonrasında Neuron Studio yazılımının ücretsiz sürümüne erişimin engellenmesi nedeniyle, ücretsiz erişilebilen Vaa3d programı ile sayım yapılması planlandı. Ancak bu program ile mevcut görüntüler üzerinde yapılan denemelerde, otomatize sayımla sağlıklı sonuç alınamayacağı kanaatine varıldı.

Bunun üzerine, konfokal mikroskopta alınacak kesit görüntüsü üzerinden medyal PFK'da elle sayım yapmak için en uygun kesit özellikleri ve konfokal mikroskop görüntüleme ayarlarını tespit etmek üzere optimizasyon çalışmaları yapıldı. Yaptığımız literatür araştırması ve denemeler sonucunda 20 mikronluk kesitte, 63X'lik yağlı objektifle, 1024x1024 piksel çözünürlüğünde 0,3 mikrometre aralıklarla *z-stack* görüntüleri alıp, en iyi görülen 3-5 apikal dendritte dendritik çıkıntıları sayıp, bunların ortalamasının sinaptik yoğunluk verisi olarak kullanılmasına karar verildi (Şekil 3-11). Ancak, sonrasında 63X objektifle ilgili yaşanan teknik aksaklıklar nedeniyle araştırmanın bu basamağı tamamlanamadı.

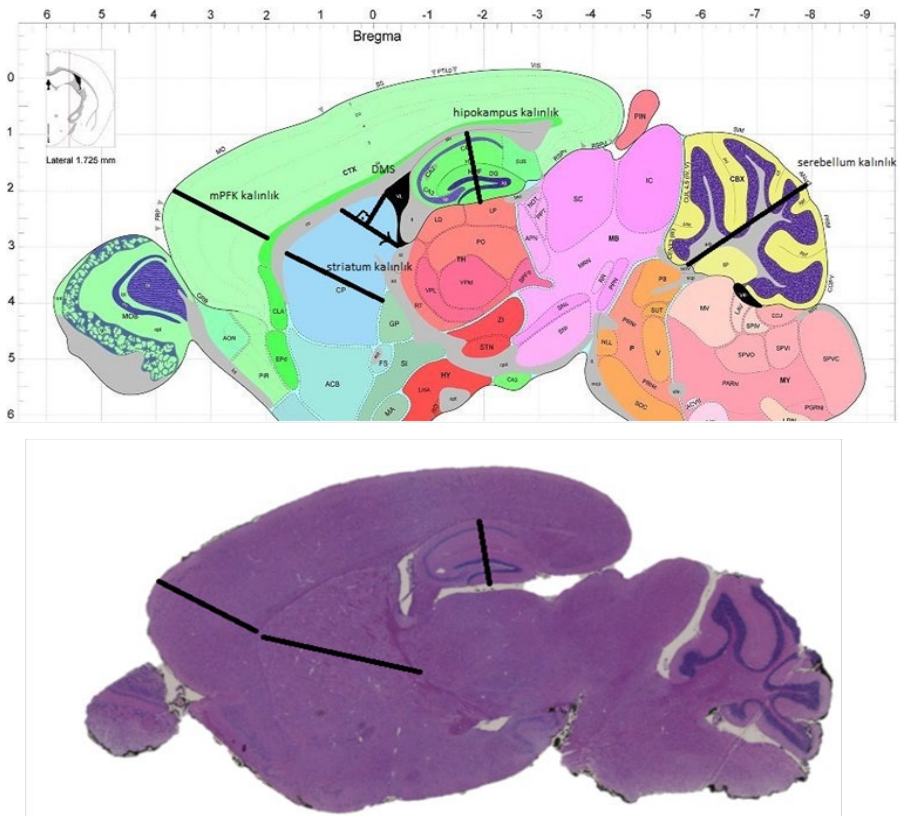


Şekil 3-11 Konfokal mikroskobide dendritik görüntüleme denemesine ait görüntü.

3.5 Bölgesel Kalınlık Ölçülmesi:

Kortikal kalınlık otizmlili bireylerle normal kontroller arasında yapısal farklılığı gösteren temel parametrelerden biridir(82). Sinaptik yoğunluğu göstermek üzere dendritik çıkıntı sayılması prosedürünün tamamlanamaması üzerine, buna yönelik ikinci bir parametrenin değerlendirilmesi için bölgesel kalınlık ölçülmesinin kullanılmasına karar verildi. Beyin bölgelerinin kalınlık ölçümü için Ankara Üniversitesi Patoloji Anabilim Dalında immunohistokimya protokolü optimizasyonu sırasında alınan sagittal parafinize kesitlerin hematoxilen eozin (HE) boyamaları yapıp ve mikroskobik görüntüler Dijital Patoloji sistemiyle (Ankara Üniversitesi

Bilimsel Araştırmalar Birimi 14A0230003 proje nosu ile alınmış) kaydedildi. Allan *Developing Mouse Brain Reference Atlas 2013* online versiyonundaki histolojik ve topografik kesitlerdeki b6lgeler baz alınarak, medyal PFK, striatum, hipokampus b6lgelerinin genişliği 6lçümü, *Slide Viewer* programı ile işaretlenmiş olan sagittal parafin kesit g6rüntüleri üzerinden yapıldı. Her üç derinlikten, CD206 ve MHC2 primer antikolarıyla işaretlenmiş kesitlerden veriye k6r bir araştırmacı tarafından b6lgesel kalınlıklar 6lçölüp, davranış test sonuçlarına g6re ayrılan gruplar birbiriyle karşılaştırıldı. Ayrıca b6lgesel kalınlık 6lçümlerinin davranış verisiyle korelasyonu incelendi. Şekil 3-12’te b6lgesel kalınlık 6lçümü yapılan sagittal kesit ve referans alınan anatomik atlas g6rüntüsü birlikte verilmektedir.



Şekil 3-12 B6lgesel kalınlık 6lçümüne ve referans atlastaki 6lçüme ait g6rüntü.

3.6 İstatistiksel Y6ntemler

İstatistiksel analizler için IBM Sosyal Bilimler için İstatistik Programının (SPSS) (*Statistical Package for Social Sciences*) 25. versiyonu kullanıldı. Verilerin normal dağılıp dağılmadığı Kolmogorov Smirnov testiyle kontrol edildi. Analizlerde ikili karşılaştırmalar, normal dağılmayan veriler için *Mann Whitney-U* testi ile yapıldı.

İkiden fazla bağımsız grup kıyaslamaları normal dağılmayan veriler için *Kruskal Wallis* testi ile gerçekleştirildi. Tüm testlerde p değerinin 0,05 den küçük olması anlamlı kabul edildi. Korelasyon analizleri Spearman testi ile yapıldı.

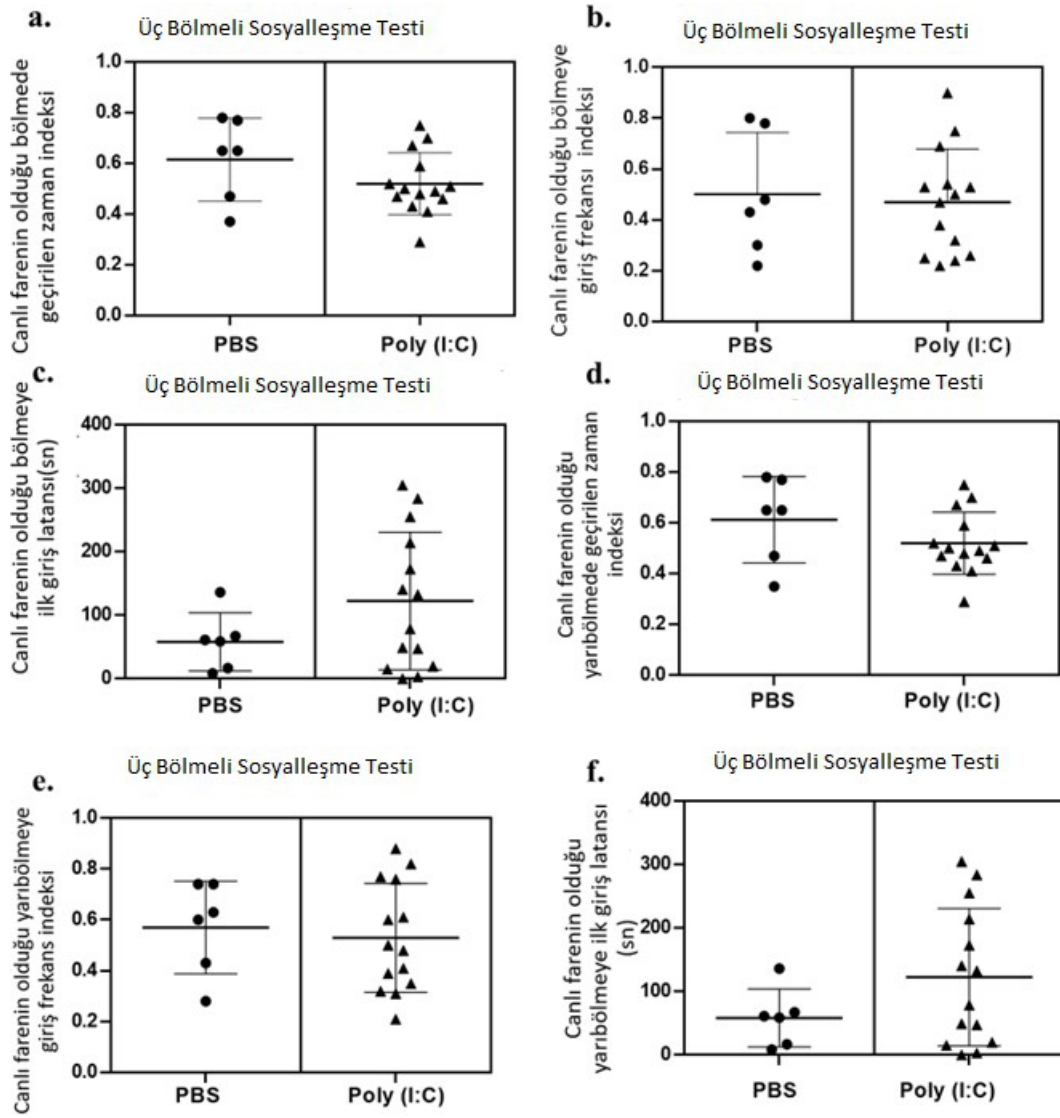
4 BULGULAR

4.1 Davranış deneyleri sonuçları

OSB grubunu kontrollerden ayırması beklenen en önemli ayırt edici test üç bölmeli sosyalizasyon testidir, bu nedenle sosyalizasyon iki aşamada değerlendirildi. İlk aşamada bir bölmede kafes arkadaşı diğer bölmede oyuncak fare varken (sosyal tercih); ikinci aşamada bir bölmede kafes arkadaşı diğer bölmede oyuncak fare varken (sosyal yenilik) kafeslerin olduğu bölmeyi ne kadar tercih ettikleri değerlendirildi. Sonrasında öğrenme ve belleğin değerlendirilmesi için yeni nesne tanıma testi ve tekrarlayıcı davranışların değerlendirilmesi için bilye gömme testi sırasıyla uygulandı. Testler sonucunda hesaplanan indekslerin ortalama ve standart sapma değerleri ile, yapılan istatistiksel değerlendirmeye ait veriler Tablo 3'de özetlenmiştir.

4.1.1 Sosyal Tercih Testi

Sosyal bölmede geçirilen süre indeksi Poly (I:C) grubunda kontrollere göre farklı değildi ($p=0,216$). Farenin olduğu sosyal yarıbölme baz alındığında, sosyal tercih indeksinin Poly (I:C) grubunda kontrollerle benzer olduğu saptandı ($p= 0,804$). Sosyal bölmeye ve sosyal yarı bölmeye geçiş frekans indeksi analiz edildiğinde, iki grup arasında farklılık gözlenmedi ($p= 0,934$). Poly (I:C) grubunda sosyal bölmeye ve yarı bölmeye ilk giriş için beklenen süre (ilk giriş latansı) daha uzundu ancak Poly (I:C) grubundaki varyasyon nedeniyle kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0,364$) (Tablo 3, Şekil 4-1).



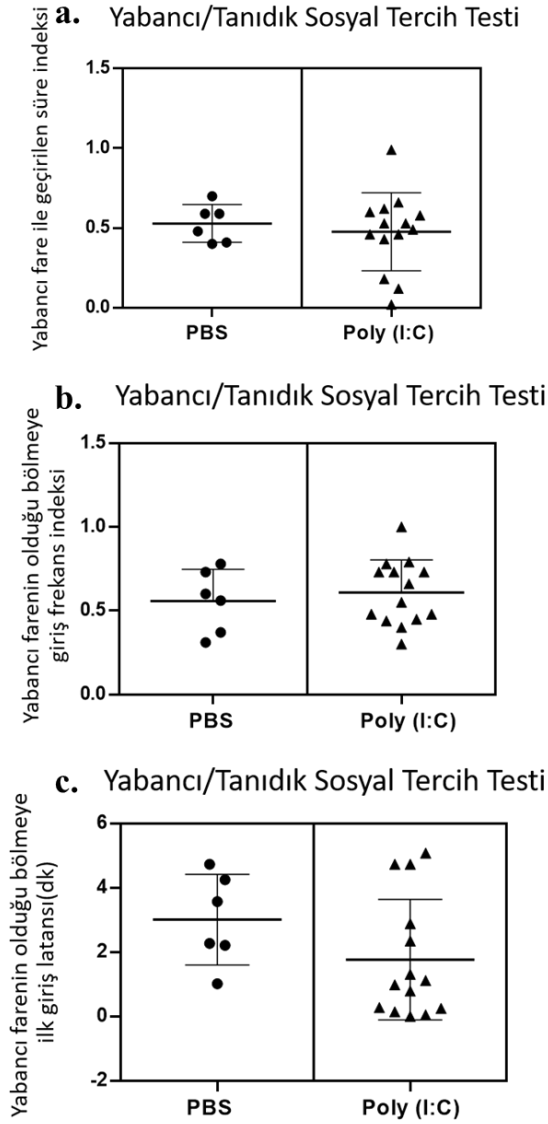
Şkeil4-1 Kontrol (n:6) ve poly (I:C) (n:14) grupları arasında üç bölmeli sosyalleşme testi bulguları

Üçbölmeli sosyalleşme testinde kontrol (PBS), poly (I:C) gruplarında **a.** sosyal bölmede geçirilen zaman indeksi, **b.** sosyal bölmeye giriş çıkış frekansı indeksi ve **c.** sosyal bölmeye ilk geçiş latansı **d.** sosyal yarıbölmede geçirilen zaman indeksi **e.** sosyal yarıbölme giriş çıkış frekansı indeksi **f.** sosyal bölmeye ilk geçiş latansı indekslerinin dağılımına dair grafikler (Grafiklerde verilerin dağılımı, ortalama değer ve standart sapmalar görülmektedir).

4.1.2 Yabancı/Tanıdık Sosyal İlişki Tercih Testi

Poly (I:C) grubunun kontrol grubuna kıyasla yabancı hayvanla geçirdiği süre indeksi, her iki hayvan etrafında geçirdiği süre indeksine göre farklı değildi ($p=0,804$). Poly (I:C) ve kontrol gruplarının yabancı hayvanın olduğu bölme toplam giriş sayısı

ve ilk giriş latansı da benzer bulundu (sırasıyla $p=0,160$; $p=0,620$). (Tablo 3 ve Şekil 4-2).

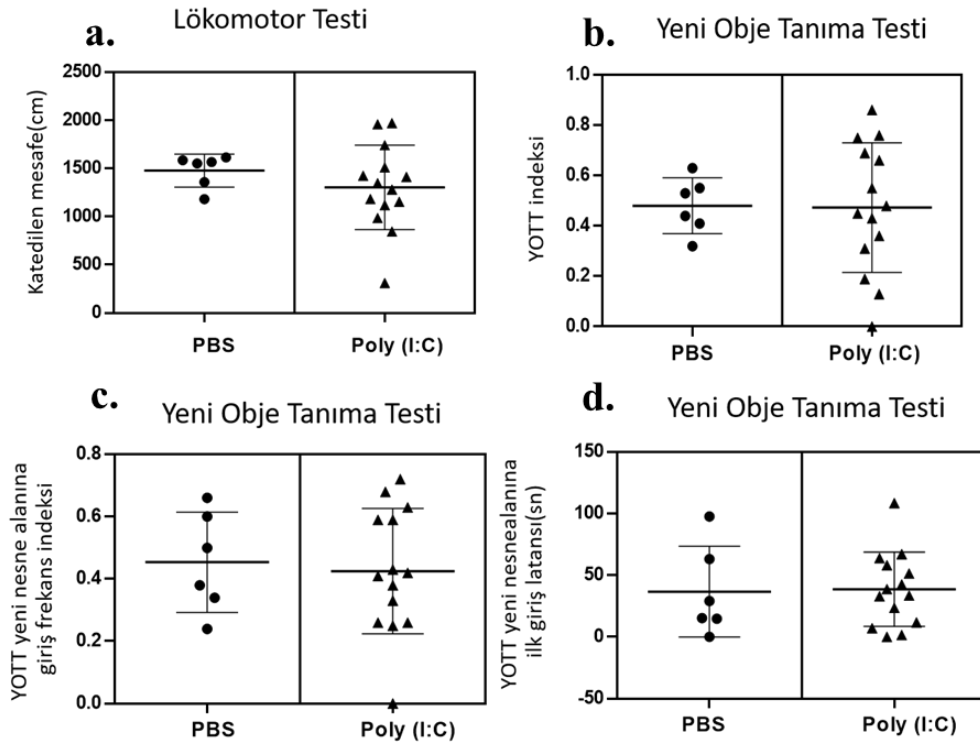


Şekil 4-2 Kontrol (n:6) ve poly (I:C)(n:14) grupları arasında yabancı/tanıdık sosyal ilişki testi bulguları

Yabancı/Tanıdık Sosyal İlişki Tercihi Testinde kontrol (PBS), poly (I:C) gruplarında **a.**yabancı sosyal hedefin olduğu bölmede sosyal bölmede geçirilen zaman indeksi **b.**yabancı sosyal hedefin olduğu bölmeye giriş çıkış frekans indeksi ve **c.**yabancı sosyal hedefin olduğu bölmeye ilk geçiş latansı indekslerinin dağılımına dair grafikleri göstermektedir. (Grafiklerde verilerin dağılımı, ortalama değer ve standart sapmalar görülmektedir).

4.1.3 Lokomotor Test ve Yeni Nesne Tanıma Testi

Lokomotor aktivite iki grup arasında farklılık göstermedi ($p=0,216$). PBS grubunda yeni nesne etrafında geçirilen süre %48 iken, Poly (I:C) grubunda %47 olarak bulundu. Yeni nesne tanıma indeksinde de benzer şekilde istatistiksel anlamlı farklılık saptanmadı ($p=0,869$). Yeni nesnenin olduğu alana giriş sıklığı indeksi de PBS ve Poly (I:C) grupları arasında benzer bulundu (sırasıyla $p=0,869$; $p=0,41$). (**Tablo 3** ve **Şkeil4-3**).

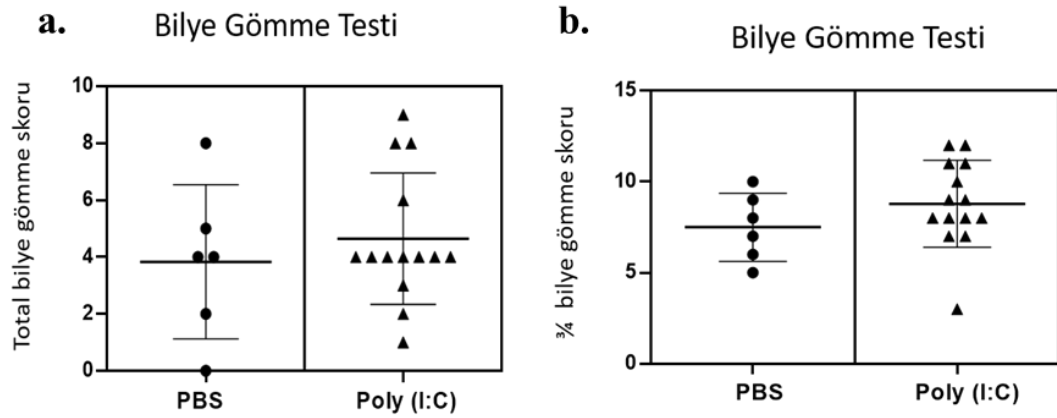


Şkeil4-3 Kontrol PBS (n:6) ve poly (I:C) (n:14) grupları arasında lokomotor ve yeni nesne tanıma testi bulguları

a. Lokomotor testinde PBS ve Poly (I:C) gruplarında katedilen mesafeler (cm) ve Yeni nesne tanıma testinde (YOTT) PBS ve Poly (I:C) gruplarında **b.** yeni nesne etrafında geçirilen süre indeksi, **c.** yeni nesne alanına giriş çıkış frekans indeksi ve **d.** yeni nesne alanına giriş latansı indekslerinin dağılımına dair grafikleri göstermektedir. (Grafiklerde verilerin dağılımı, ortalama değer ve standart sapmalar görülmektedir).

4.1.4 Bilye Gömme Testi

Tam ve (¾) gömülü bilye sayıları Poly(I:C) ve PBS grupları arasında karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmedi (sırasıyla $p=0,611$; $p=0,424$) (**Tablo 3** ve **Şekil 4-4**).



Şekil 4-4 Kontrol PBS (n:6) ve poly (I:C) (n:14) grupları arasında bilye gömme testi bulguları

Bilye gömme testinde (BG) PBS ve Poly (I:C) gruplarında **a.** tam bilye gömme ve **b.** (¾) bilye gömme skorlarının dağılımına dair grafikler gösterilmektedir. (Grafiklerde verilerin dağılımı, ortalama değer ve standart sapmalar görülmektedir).

Tablo 3 PBS and Poly (I:C) gruplarında davranış test sonuçlarının karşılaştırılması (hesaplanmış indeks olarak, ortalama ve standart sapma (SS) değerler ve ilişkili istatistiksel değerler)

Test	PBS, n=6 ort±SS	Poly (I:C), n=14 ort±SS	İstatistik (Mann Whitney U-testi)
ÜBST-Sosyal bölmedeki süre indeksi	0.60±0.12	0.50±0.08	p=0.216, z=-1.237
ÜBST-Sosyal bölmeye giriş için frekans indeksi	0.5±0.24	0.46±0.19	p=0.934, z=0.082
ÜBST- Sosyal bölmeye ilk giriş gecikmesi (dk)	0.96±0.46	2.04±1.18	p=0.364, z=-0.907
ÜBST- Sosyal yaribölmedeki süre indeksi	0.61±0.12	0.52±0.10	p=0.284, z=-1.072
ÜBST- Sosyal yaribölme giriş için frekans indeksi	0.56±0.12	0.52±0.20	p=0.805, z=-0.247
ÜBST- Sosyal yaribölme giriş gecikmesi(dk)	0.96±0.46	2.04±1.86	p=0.364, z=-0.907
YTSTT-Yeni sosyal hedef bölgesindeki süre indeksi	0.52±0.06	0.47±0.02	p=0.804, z= -0.248
YTSTT-Yeni sosyal hedef bölgesine giriş için frekans indeksi	0.55±0.09	0.60±0.05	p=0.620, z=-0.495
YTSTT-Yeni sosyal hedef bölgesine ilk girişte gecikme(dk)	3.00±0.30	1.7±0.48	p=0.160, z=-1.404
YOTT-Yeni obje alanında geçirilen süre indeksi	0.48±0.04	0.47±0.06	p=0.869, z=-0.165
YOTT-Yeni obje alanına girme frekans indeksi	0.45±0.06	0.42±0.05	p:0.869, z=-0.165
YOTT-Yeni obje alanına giriş gecikmesi(sn)	36.6±14.9	38.6±8.0	p=0.741, z=-0.330
YOTT-Lokomotor testinde hareket edilen mesafe (cm)	1477.53±69.8	1304.61±117.2	p=0.216, z=-1.237
BGT-Toplam bilye gömme puanı	3.6±1.1	5.00±0.6	p=0.611, z=-0.509
BGT-¾ bilye gömme puanı	7.50±0.7	8.7±0.6	p=0.424, z=-0.800

BGT: Bilye Gömme Testi; **YOTT:** Yeni Objeye Tanıma Testi, **PBS:** Fosfat tamponlu salin; **Poly (I:C):** Polyinosinik:polycyidylic asit **YTSTT:** Yabancı/ Tanıdık Sosyal Tercih Testi, **ÜBST:** ÜçBölmeli Sosyalleşme Testi

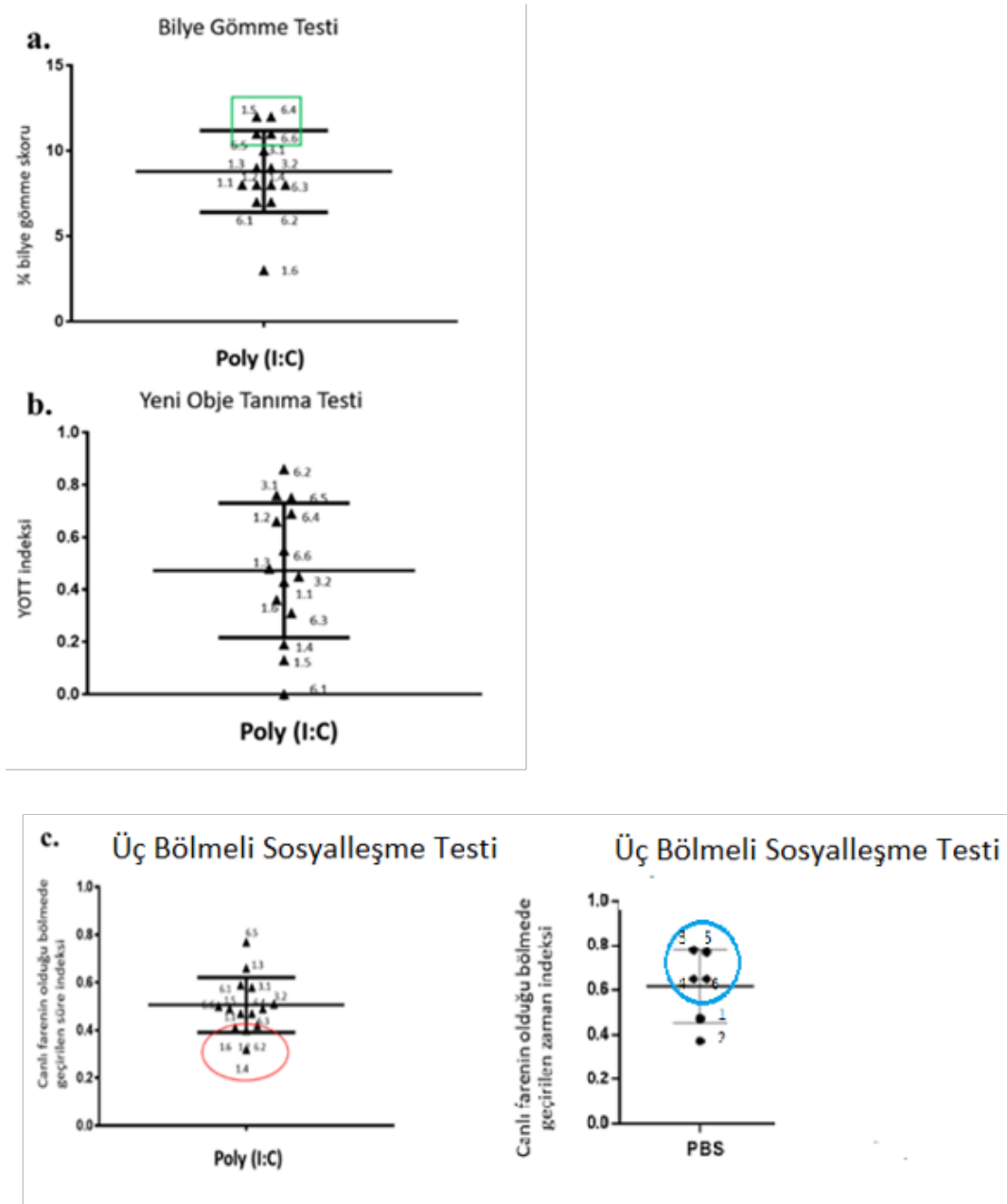
4.2 Poly (I:C) Uygulanan Farelerin OSB-benzeri Davranışlarına Göre Gruplandırılması

Daha önceden yapılmış çalışmalardan farklı olarak, prenatal Poly (I:C) uygulamasının postnatal 4. haftada OSB benzeri davranışlar açısından istatistiksel fark oluşturmadığını gözlemledik. Ancak veri yakından incelendiğinde Poly (I:C)'ye

maruz kalmış bazı farede OSB-benzeri davranışlar gözlemlendi. Burdan yola çıkarak davranışsal veriyi incelediğimizde, Poly (I:C) grubunun stereotipik davranışın baskın olduğu (StD) ve sosyal defisitinin baskın (SDD) olduğu iki grup olarak ayrılabilildiğini gördük (Şekil 4-5). SDD grubunda stereotipik davranışın da, öğrenmenin de geniş varyasyonda dağıldığı görüldü. StD grup için de benzer şekilde sosyal davranış ve öğrenmenin geniş varyasyonda dağıldığı gözlemlendi (Şekil 4-6 a-b ve Tablo 4). Bu gözlem OSB'nin multifaktöriyel etyoloji hipoteziyle uyumaktadır. Prenatal viral enfeksiyon maruziyeti OSB için bir risk faktörü olmakla birlikte, bu enfeksiyona maruz kalan tüm çocuklarda OSB belirtileri gelişmemektedir. Çevresel etkenler kadar genetik etkenlerin de OSB gelişiminde katkısı olduğu bilinmektedir.

Tablo 4 Poly (I:C) alt gruplarının davranış test parametrelerine göre belirlenmesi

Davranış Testi Parametresi	Poly (I:C)	
	Grup1 (stereotipik davranış dominant) n=4	Grup2 (sosyalizasyon defisiti dominant) n=4
Sosyal bölmede geçirilen zaman indeksi	yüksek/düşük	düşük
³ / ₄ bilye gömme skoru	yüksek	yüksek/düşük
YOTT indeksi	yüksek/düşük	yüksek/düşük



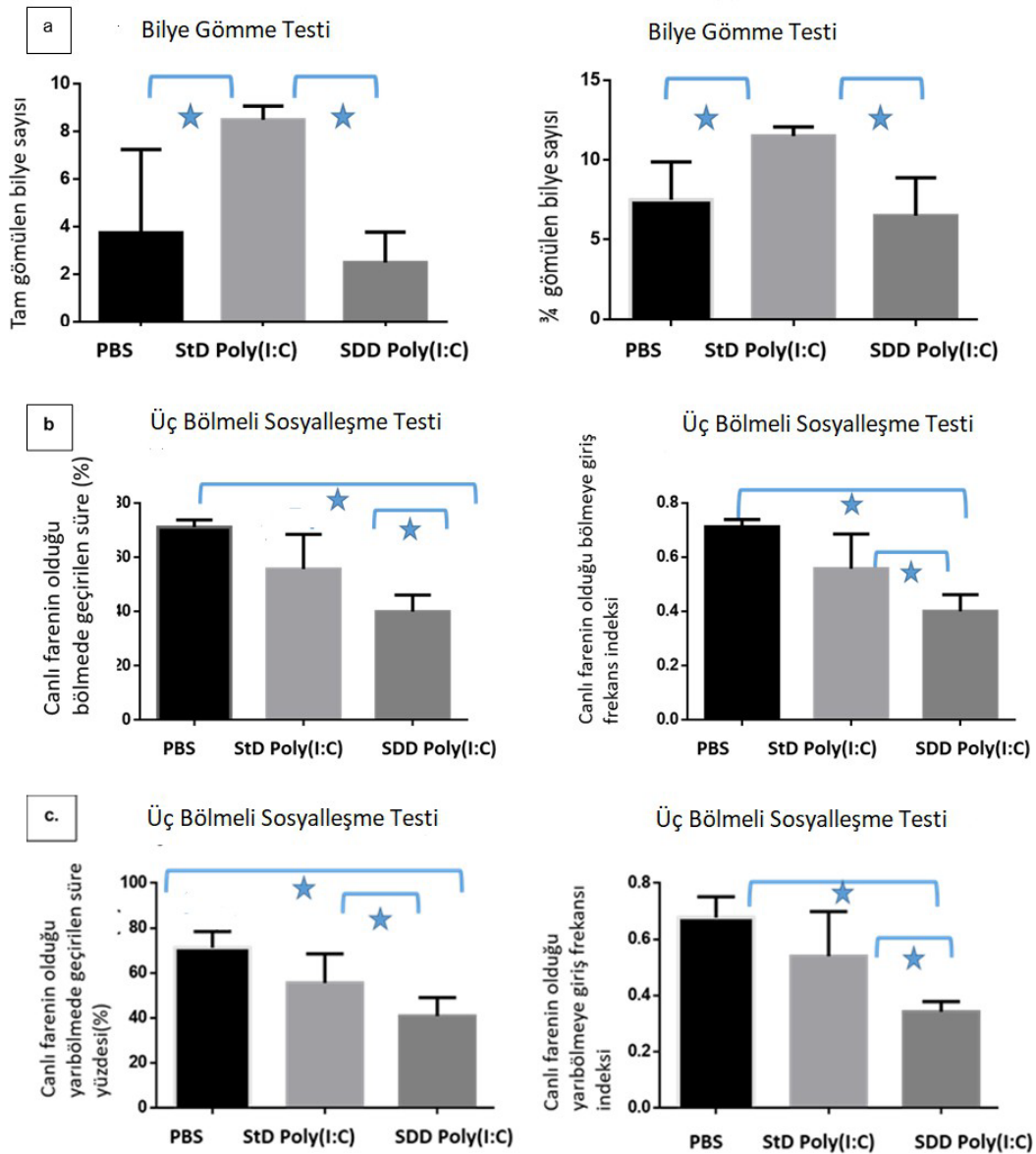
Şekil 4-5 Davranış testlerinin OSB hastalarının klinik görünümüne denk şekilde ayrıldığına işaret eden dağılım

Sosyal bölmede geçirilen süre, yeni nesne ile geçirilen süre ve ($\frac{3}{4}$) bilye gömme skorlarına göre hayvanların, OSB hastalarında görülen klinik görümlere denk düşecek şekilde ayrılmasına dair şekil görülmektedir. **a.Grup 1**'in PBS (kontrol) grubunu (n:4), **b.Grup 2**'nin bilye gömme skorları yüksek (stereotipik hareket baskın) grubu (n:4), **c. Grup 3**'ün ise Poly(I:C) grubu içinde sosyal tercih indeksi düşük (sosyalizasyon defisiti baskın) olan grubu (n:4) temsil ettiğini, PBS kontrol grubu için ise sosyalizasyon indeksi daha yüksek olan 4 olgunun seçildiğini göstermektedir. (Grafiklerde verilerin dağılımı, ortalama değer ve standart sapmalar görülmektedir).

Bundan hareketle, immunohistokimyasal çalışmalar PBS kontrol grubu, OSB-benzeri davranışlarına göre StD ve SDD grubu olmak üzere 3 grup fare beyinlerinde gerçekleştirildi.

4.3 Oluşturulan Üç Grubun Davranış Analizleri

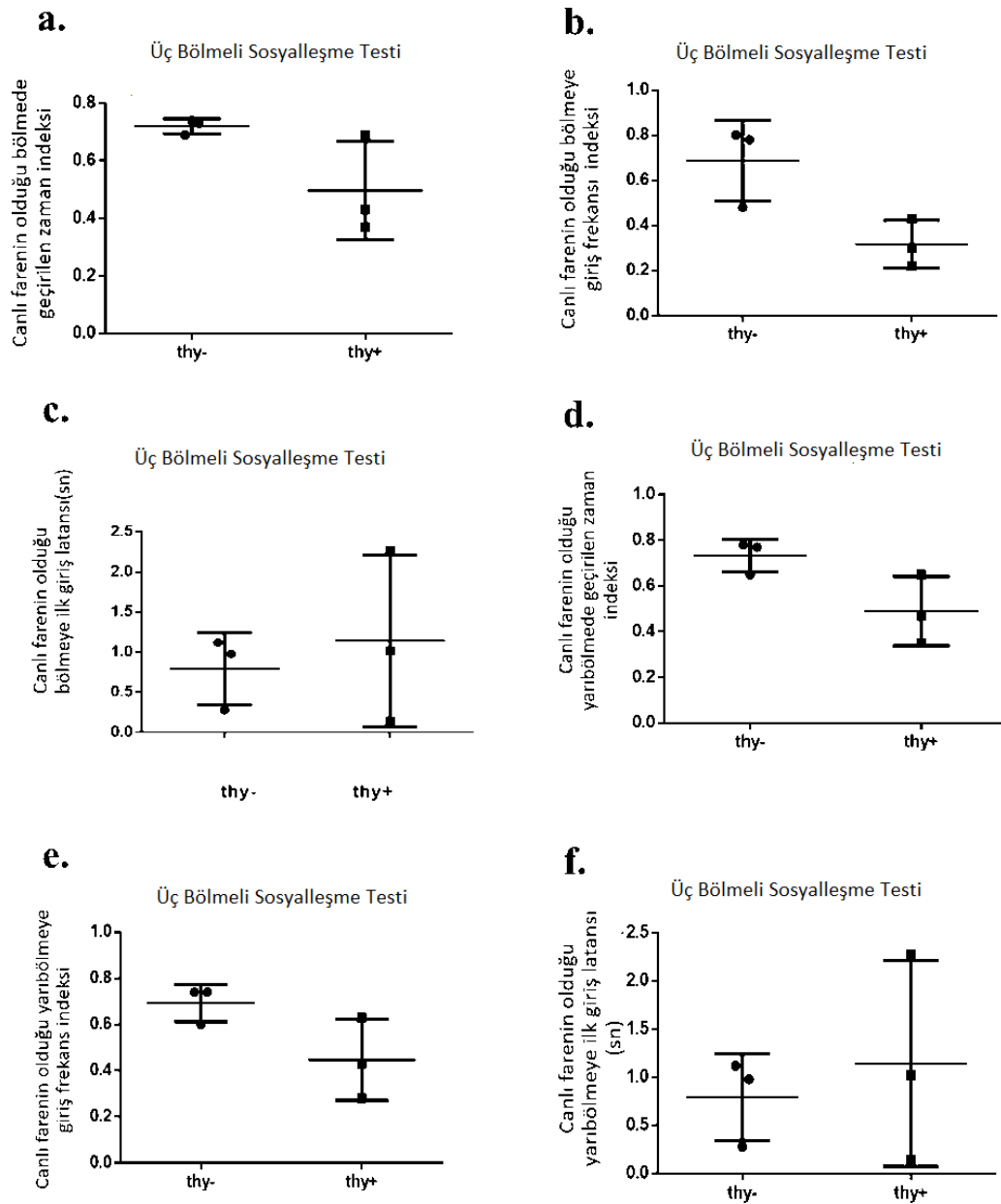
StD ve SDD gruplarının PBS kontrol grubundan farklılaştığı, yapılan Kruskal Wallis analizi ile teyit edilmiştir. Üçgrup arasında total bilye gömme skoru ($p=0,034$), 3/4 bilye gömme skoru ($p=0,022$), sosyal bölmede geçirilen zaman indeksi ($p=0,018$), sosyal bölmeye giriş frekans indeksi ($p=0,021$), sosyal yarı bölmede geçirilen zaman indeksi ($p=0,012$) ve sosyal yarı bölmeye giriş frekans indeksi ($p=0,018$) istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklı bulunmuştur (Şekil 4-6).



Şekil 4-6 Üçlü gruplarda bilye gömme ve üç bölmeli sosyalleşme testi sonuçlarının karşılaştırılması

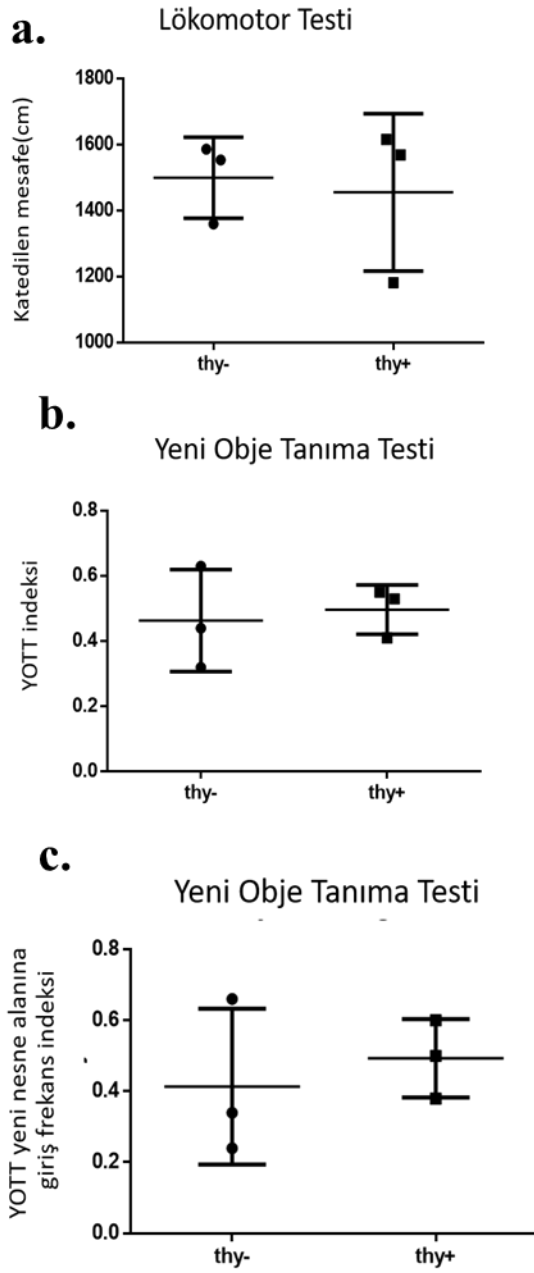
a. Üçlü gruplar 2'şerli gruplar halinde kendi aralarında Mann Whitney U analiziyle karşılaştırıldığında total bilye gömme skoru StD Poly (I:C) grubunda (n:4) PBS grubuna göre (p=0,037) (n:4) ve SDD Poly (I:C) grubuna göre (n:4) yüksek bulundu (p=0,019). (3/4) bilye gömme skoru StD Poly (I:C) grubunda (n:4) PBS grubuna göre (n:4) (p=0,019) ve SDD Poly (I:C) grubuna göre (n:4) (p=0,019) yüksek bulundu. **b.** PBS grubunda SDD grubuna göre (0,021) ve StD grubunda SDD grubuna göre sosyal bölmede geçirilen zaman indeksi yüksek bulundu (p=0,021). Sosyal bölmeye giriş frekans indeksi PBS grubunda SDD Poly:IC grubundan (p=0,021) yüksek ve StD grubunda SDD grubundan (p=0,021) yüksek tespit edildi. **c.** Sosyal yarı bölmede geçirilen zaman indeksi StD grubunda SDD grubuna göre (p=0,021) ve StD grubunda SDD Poly(I:C) grubuna göre yüksek bulundu (p=0,021). SDD Poly(I:C) grubunda StD Poly (I:C) grubuna göre düşük (p=0,021) ve PBS grubunda SDD grubuna göre yüksek sosyal yarı bölmeye giriş frekansı saptandı (p=0,021).

Araştırmamızda dendritik çıkıntılarının sayısını için dendritlerinde sarı floresan protein (YFP) ifade eden Thy1-ChR2-YFP transgenik erkek fareler, yabancıl tip C57BL/6 ile çiftleştirildiği için elde edilen yavruların davranış sonuçlarının yorumlanmasında transgenik olma etkisinin kontrol edilmesi amacıyla kontrol grubundaki 3 Thy1-ChR2-YFP pozitif fare ile 3 Thy1-ChR2-YFP negatif farenin davranış test sonuçları birbiriyle karşılaştırıldı. Bu analiz sonucunda iki grup arasında herhangi bir davranışsal parametrede istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı. Buna dair grafikler Şekil 4-7, Şekil 4-8 ve Şekil 4-9' da görülmektedir.



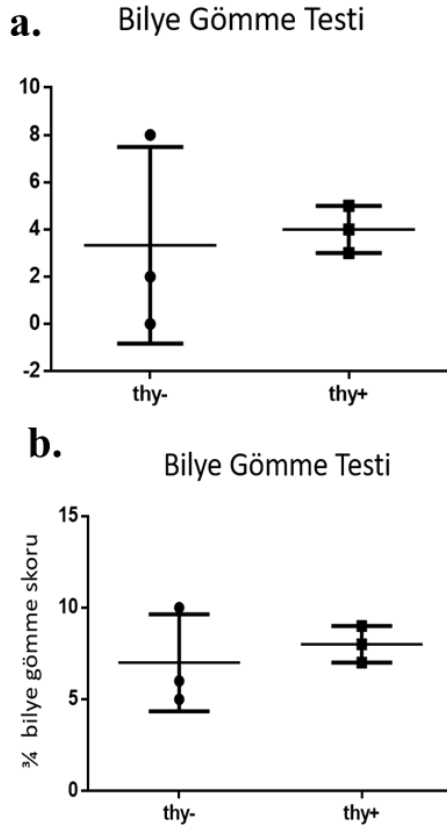
Şekil 4-7 Kontrol grubu içindeki Thy *background*una göre ayrılmış hayvan gruplarının davranış analiz bulguları

Kontrol grubu (n:6) içindeki Thy1-ChR2-YFP *background*una göre ayrılmış hayvan gruplarının davranış analiz sonuçlarından üç bölmeli sosyalizasyon testinde **a.** sosyal bölmede geçirilen zaman indeksi, **b.** sosyal bölmeye giriş çıkış frekansı indeksi **c.** sosyal bölmeye ilk geçiş latansı **d.** sosyal yaribölmede geçirilen zaman indeksi **e.** sosyal yaribölmeye giriş çıkış frekansı indeksi **f.** sosyal bölmeye ilk geçiş latansı dağılımına dair grafikler görülmektedir. (Thy1-ChR2-YFP negatif n:3, Thy1-ChR2-YFP pozitif n:3)



Şekil 4-8 Kontrol grubu içindeki Thy *background*duna göre ayrılmış hayvan gruplarının davranış analiz bulguları.

Kontrol grubu (n:6) içindeki Thy *background*duna göre ayrılmış hayvan gruplarının davranış analiz sonuçlarından **a.** Lokomotor testinde katedilen mesafeler (cm) **b.**Yeni nesne tanıma testinde (YOTT) yeni nesne etrafında geçirilen süre indeksi, **c.** yeni nesne alanına giriş çıkış frekans indeksi ve **d.**yeni nesne alanına giriş latans indekslerinin dağılımına dair grafikleri göstermektedir. (Thy1-ChR2-YFP negatif n:3, Thy1-ChR2-YFP pozitif n:3)



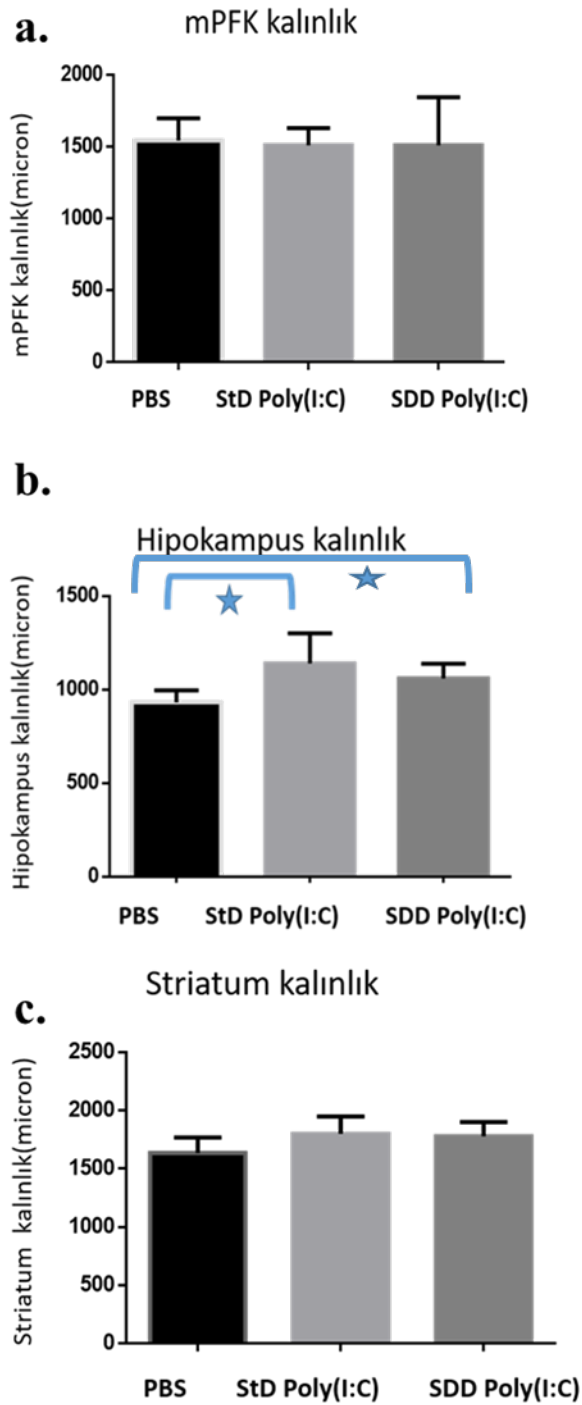
Şekil 4-9 Kontrol grubu içindeki Thy *backgrounduna* göre ayrılmış hayvan bilye gömme testi bulguları.

Kontrol grubu (n:6) içindeki Thy *backgrounduna* göre ayrılmış hayvan gruplarının davranış analiz sonuçlarından bilye gömme testinde (BG) **a.** tam bilye gömme ve **b.** (¾) bilye gömme skorlarının dağılımına dair grafikler gösterilmektedir. (Thy1-ChR2-YFP negatif n:3, Thy1-ChR2-YFP pozitif n:3)

4.4 Bölgesel Kalınlık İlişkili Veriler

4.4.1 Bölgesel Kalınlık Ölçümleri

Davranış değişikliklerinin beyinde morfolojik bir değişiklik olarak karşılığı olup olmadığını görmek için hipokampus, striatum ve medyal PFK bölgelerinde bölgesel kalınlık ölçümü yapıldı. İmmunohistokimya için seçilen 12 hayvandan her hayvan için toplam 18 sagittal kesitte veriye kör bir değerlendirmeci tarafından *Slideviewer* programıyla ölçüm yapılarak kortikal kalınlıklar değerlendirildi. Bu ölçümlerden elde edilen ortalama ve standart sapma değerleri 3 grup için beyin bölgelerine göre Tablo 5'te gösterilmiştir. Medyal PFK, striatum ve hipokampusta kalınlık ölçümlerinin gruplara göre dağılımı ve Kruskal Wallis analizi Şekil 4-10' de gösterilmektedir.



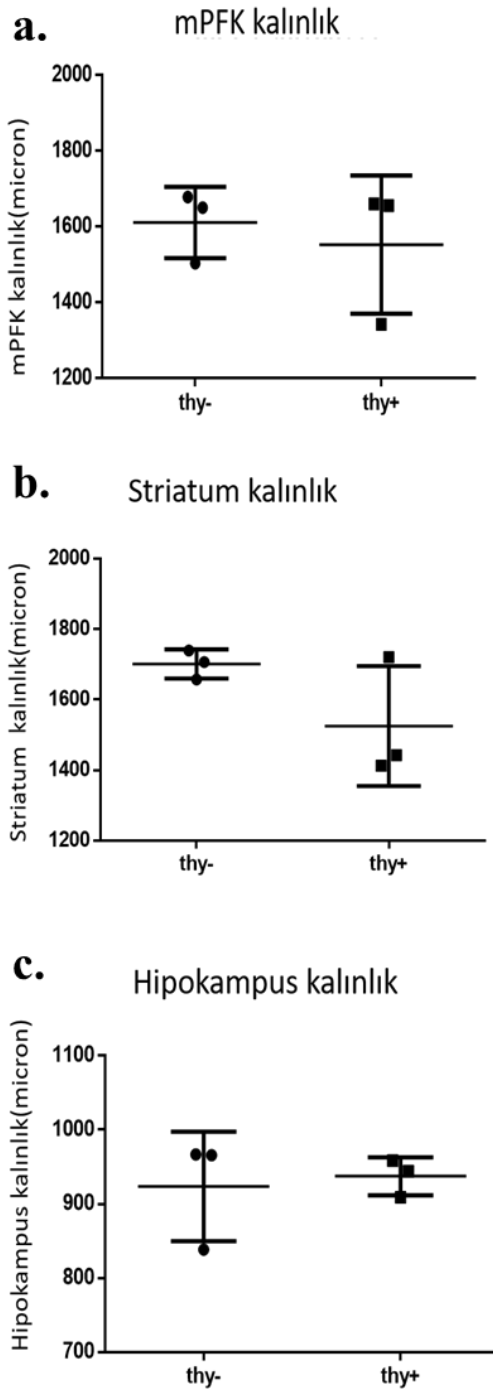
Şekil 4-10 Beyin bölgeleri kalınlık ölçümlerinin gruplara göre dağılımı.

Yapılan Kruskal Wallis analizinde 3 grup arasında bölgesel kalınlık değişikliği **a.**medyal PFK ($p=0,926$) ve **c.** Striatumda ($p=0,232$) gözlenmedi. **b.** İstatistiksel anlamlılık farkı gösteren tek bölge hipokampus olarak tespit edildi ($p=0,021$). Ayrıca hipokampus kalınlığının Mann Whitney U testiyle yapılan ikili gruplar arası karşılaştırmalarında, PBS-StD Poly(I:C) grubu arasında ($p=0,021$) ve PBS-SDD Poly(I:C) grupları arasında ($p=0,021$) istatistiksel anlamlı farklılık gözlemlendi.

Tablo 5 Bölgelere göre kalınlık verilerinin dağılımı
(Veriler ortalama±standard sapma olarak verilmektedir.)

Bölge	PBS Grup			StD Poly(1:C) Grup			SDD Poly(1:C) Grup		
	ort	n	SS	ort	n	SS	ort	n	SS
mPFK	1543,64 mikron	4	154,75	1511,54 mikron	4	118,64	1510,48 mikron	4	335,19
Striatum	1636,88 mikron	4	133,46	1800,67 mikron	4	148,48	1780,34 mikron	4	121,13
Hipokampus	932,40 mikron	4	62,67	1138,77 mikron	4	162,44	1059,93 mikron	4	77,99

PBS kontrol grubunda Thy1-ChR2-YFP pozitif ve Thy1-ChR2-YFP negatif farelerin OSB-benzeri davranışları açısından fark tespit edilmediği davranış analizleri sonuçları kısmında belirtilmiştir. Bununla beraber gruplar arasında Thy1-ChR2-YFP ilişkili bir yapısal bir değişiklik olup olmadığını göstermek üzere, bölgelere göre kalınlık ölçümleri Thy1-ChR2-YFP pozitif ve Thy1-ChR2-YFP negatif hayvanlar arasında karşılaştırılmış ve iki grup arasında istatistiksel olarak yine anlamlı bir fark saptanmamıştır (mPFK için $p=0,827$, hipokampus için $p=0,513$; striatum için $p=0,275$) (Şekil 4-11).

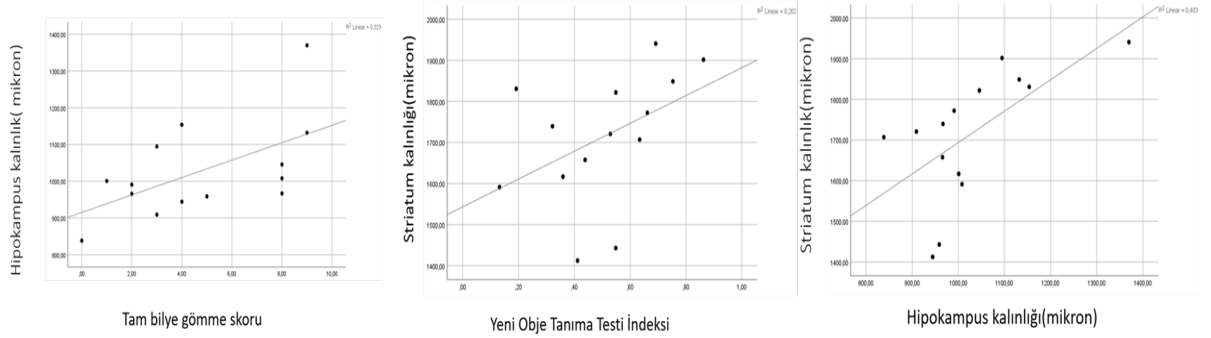


Şekil 4-11 Thy1-ChR2-YFP *background*ına göre ikiye ayrılan kontrol grubunun bölgesel kalınlıkları.

Thy *background*ına göre ikiye ayrılan kontrol grubunun bölgesel kalınlıkları **a.** Medyal prefrontal korteks, **b.** Striatum, **c.** Hipokampusta gösterilmektedir. Yapılan Mann Whitney U analizinde 2 grup arasında bölgesel kalınlıklarda istatistiksel olarak anlamlı değişiklik gözlenmedi. Veriler ortalama±standard sapma olarak görülmektedir.

4.5 Bölgesel kalınlık korelasyonları

Bölgesel kalınlık ile davranış testleri sonuçlarının korelasyonuna Spearman testi ile bakıldığında, hipokampus kalınlığı ile total bilye gömme skoru arasında pozitif korelasyon saptandı ($p=0,040$, $r=0,554$). YOTT indeksi ve striatum kalınlığı arasında pozitif korelasyon saptandı ($p=0,029$, $r= 0.582$). Hipokampus kalınlığının da striatum kalınlığı ile pozitif yönde güçlü bir korelasyonu olduğu görüldü ($p=0,003$, $r=0,723$) (Şekil 4-12).



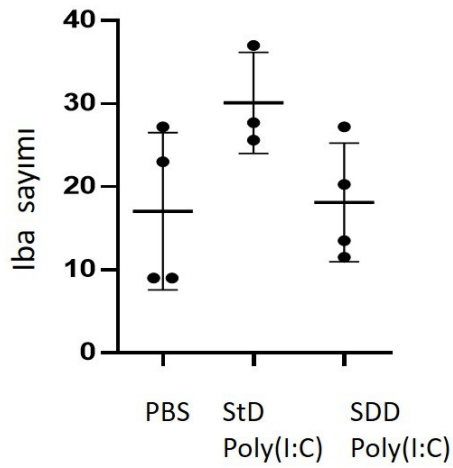
Şekil 4-12 Bölgesel Kalınlıklar ile Davranış Testi Parametreleri Arasında Çıkan Korelasyonlara Dair Grafikler

Grafikte hipokampus kalınlığı ile total bilye gömme skoru arasında, YOTT indeksi ve striatum kalınlığı arasında ve hipokampus kalınlığının da striatum kalınlığı ile pozitif yönde korelasyonu olduğu görülmektedir.

4.6 İmmünohistokimyasal Sonuçlar:

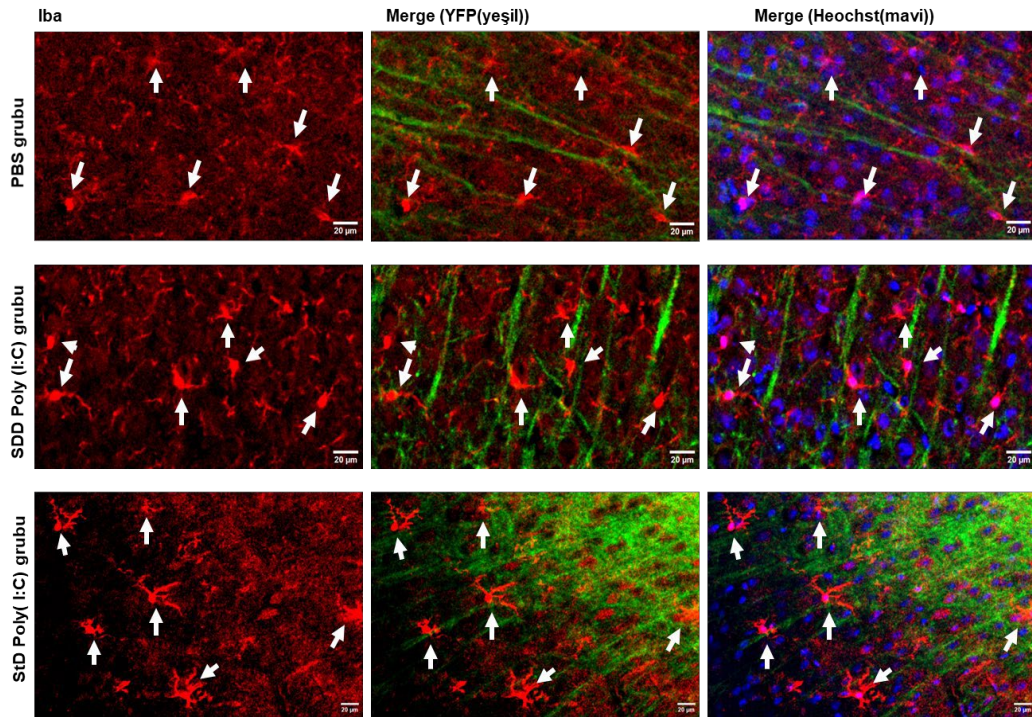
4.6.1 İba işaretlemesine ilişkin sonuçlar

PBS grubunda Iba-1 sayım ortalaması $11,2\pm6,6$ ve Poly (I:C) grubunun sayım ortalaması $16,3\pm5,5$ bulundu. İki grup Mann Whitney U ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı ($p=0,133$). Üç grup olarak araştırma grubuna bakıldığında, PBS grubunda ortalama ($13,7\pm6,8$), StD grubunda ortalama ($14,01\pm7,8$), SDD grubunda ortalama ($14\pm4,7$) olarak bulundu. Kruskal Wallis ile Iba-1 sayımları karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0,722$) (Şekil 4-13).



Şekil 4-13 3 grupta Iba sayımının karşılaştırılmasına dair ortalama ve standart sapma olarak verilmiş grafik.

Iba 1 işaretlemesine ilişkin örnek görüntüler Şekil 4-14'te yer almaktadır. Bu görüntüden mikroglial hücrelerin dendritik ağaçla yakın ilişkili olduğu görülebilir.



Şekil 4-14 Iba-1 işaretlemesine ilişkin örnek bir görüntüler.

(StD: stereotipik hareket dominant, (SDD: sosyal defisit dominant, PBS: kontrol). Yeşil renkte Thy1-ChR2-YFP (+) sinyali görülmektedir. (Görüntüler 25xlik objektifle konfokal mikroskopta alınmış, 20 mikron ölçekleme ile yapılmıştır).

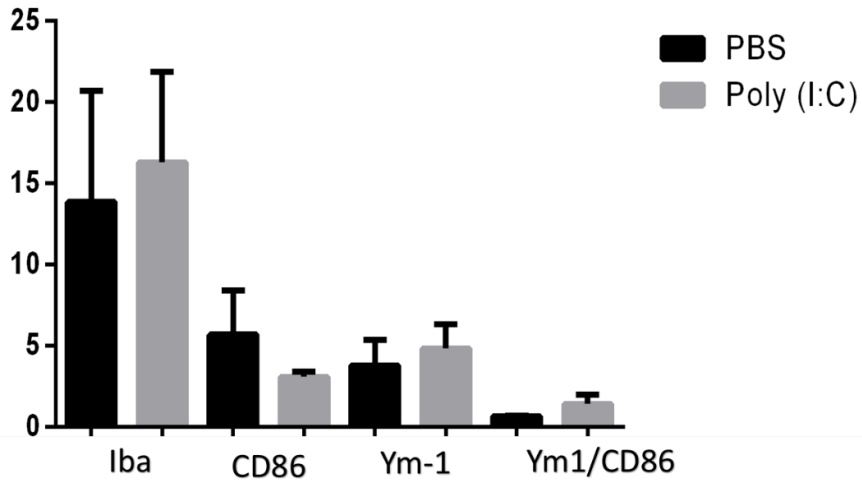
Kontrol grubu içinde 3 Thy1-ChR2-YFP pozitif ve 3 Thy1-ChR2-YFP negatif hayvan olduğu için bu hayvanlar Iba-1 sayımı açısından Mann Whitney U testi ile karşılaştırıldığında anlamlı bir fark görülmedi ($p=0,268$). Dolayısıyla Thy1-ChR2-YFP olan farelerin mikroglia sayılarının yabancı tiplerden farklı olmadığı sonucuna varıldı.

4.6.2 CD86 ve Ym1 işaretlemesine ilişkin sonuçlar:

CD86 ve Ym1 işaretlemeleri için kullanılacak sekonder antikor Thy1-ChR2-YFP pozitif hayvan beyinlerinde aynı renkte ışığa verdikleri için, bu değerlendirmeye sadece Thy1-ChR2-YFP negatif hayvan beyinlerinden alınan kesitlerin dahil edilmesine karar verildi. PBS grubunda 3, StD Poly (I:C) grubunda 1, SDD grubunda 3 Thy1-ChR2-YFP negatif hayvan bulunması sebebiyle, Iba boyaması gibi 3 grupta yapılan analiz CD86, Ym1 işaretlemeleri için tekrarlanamadı. Dolayısıyla, CD86 ve Ym1 işaretlemeleri sadece Thy1-ChR2-YFP negatif olgulardan oluşan PBS kontrol grubundan ve Poly (I:C) grubundan seçilen 3'er hayvandan ikişer kesit ve her kesitten alınan 2 görüntüde incelendi (Tablo 1).

PBS grubunda CD86 sayım ortalaması $5,69 \pm 2,7$ ve Poly(I:C) grubunun sayım ortalaması $3,08 \pm 0,3$ bulundu. Ym1 için ise PBS grubunda sayım ortalaması $3,79 \pm 1,59$ ve Poly (I:C) grubunun sayım ortalaması $4,83 \pm 1,49$ bulundu. CD86, Ym1 sayımları ve Ym1/CD86 oranı iki grup arasında Mann Whitney U testi ile karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı (sırasıyla $p=0,1$; $p=0,4$, $p=0,1$). (Tablo 6, Şekil 4-15).

İHK Sayımları



Şekil 4-15 Grafikte PBS ve Poly(I:C) gruplarında ortalama immunohistokimya(İHK) sayımları

Veriler ortalama \pm standard deviasyon (SD) olarak görülmektedir.

İHK: İmmunohistokimya

Tablo 6 Gruplara göre CD86, Ym1 sayımlarının ve Ym1/CD86 oranı dağılımı

Veriler ortalama \pm standard sapma olarak verilmiştir.

	PBS Grup			Poly(I:C) Grup		
	ort	n	SS	ort	n	SS
CD86	5,69	3	2,7	3,08	3	0,3
Ym1	3,79	3	1,59	4,83	3	1,49
Ym1/CD86	0,67	3	0,03	1,43	3	0,56

5 TARTIŞMA

5.1 Davranış bulguları

Bu çalışmada, midgestasyonel Poly (I:C) uygulamasıyla oluşturulan MİA modelinde, yavrular postnatal 24-28. günlerde değerlendirildiğinde, sosyalleşme davranışında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılaşma tespit edilmemiştir. Ancak toplumda gözlemlendiği gibi davranış sonuçlarının geniş bir varyasyonda dağıldığı gözlenmiştir. Bu varyasyondan yola çıkılarak, hayvanlar davranış test sonuçlarına göre gruplanmıştır. Sosyal bölmede geçirilen zaman indeksi ve bilye gömme skorları alt grupları ayırmada yararlanan parametreler olmuştur. Poly (I:C)'ye doğum öncesi maruz kalan farelerin yalnızca bir alt grubunun OSB benzeri davranış geliştirmesi bunun için olası bir açıklamadır, çünkü benzer alt gruplar klinikte de OSB hastalarında görülebilir. Aynı çevresel etkene aynı zamanda maruz kalan yavruların hepsinde aynı otizm benzeri davranışlar görülmemektedir. Stereotipik hareket baskın ikinci Poly (I:C) grubundaki olguların, belirgin stereotipik hareketleri ve hafif sosyalizasyon bozukluğu olan, normal/yüksek IQ' ya sahip yüksek fonksiyonlu otizm olarak adlandırılan grubu temsil edebileceği düşünülmüştür. Sosyalizasyon defisiti baskın Poly (I:C) grubunun ise ağır sosyalizasyon bozukluğuna, düşük/ normal IQ skorları ve değişken düzeyde stereotipik davranışın eşlik ettiği düşük fonksiyonlu otizm olarak adlandırılan grubu temsil edebileceği düşünülmüştür (83, 84). Bu grupların davranış testlerinde de birbirinden farklılaştığını istatistiksel analizlerimizde teyit edilmiştir.

Bu çalışmanın güçlü yanlarından biri, OSB belirtilerinin ortaya çıktığı yaş döneminde davranışların değerlendirilmiş olmasıdır. MİA modelinde erişkin farelerde davranış değişikliklerinin gen ekspresyonu, nöroanatomi, nörokimyasal etkileri tutarlı biçimde ortaya konmuştur (19,20), ancak bu çalışmalar erişkinlik çağına kadar gerçekleşmiş olabilecek adaptif değişikliklerin etkisi dışlanarak değerlendirilememektedir. Ayrıca C57BL/6 genetik altyapısına sahip farelerle oluşturulmuş nöropsikiyatrik hastalık modellerinde, fetal beyin gelişimine ilişkin değişikliklerin hepsinin erişkin yaşta yakalanmasının mümkün olmadığı gösterilmiştir (85, 86). Bununla birlikte bu çalışmada, davranış deneylerinin yapılabilmesi için yavruların anneden ayırılmasına bağlı stres oluşturma riski nedeniyle süttten kesme

öncesinde değerlendirme yapılmamıştır. İleri çalışmalarda bu riski taşımayan farklı otizm modelleri kullanılarak değerlendirmelerin daha erken zamansal noktalarda yapılması önerilir.

MİA modellerinde Poly(I:C) kullanımının zamanlaması ve dozajı da davranış ve immünolojik yanıt üzerinde etkisi olduğu tespit edilen faktörlerdendir (87). Çalışmamızda, literatürde genel olarak kullanılan gebelikte iki kez ip 5 mg/kg dozajı uygulanmıştır (88). Önceki çalışmalarda daha yüksek doz Poly (I:C) kullanımının sosyalleşmede azalma, stereotipide artış, öğrenmede bozulma gibi otizm benzeri davranışsal farklılıklarla ilişkili bulunduğu gösterilmiştir (104) ancak bu çalışmalarda genellikle sıçanlar kullanılmış ve değerlendirmeler yetişkinlik döneminde yapılmıştır. Bu etmen de çalışmamızda PBS ve Poly (I:C) grubu arasında davranış açıdan farklılık bulamamanın bir diğer olası açıklaması olabilir. Bununla beraber, gebe hayvanlarda yavru kaybı riski nedeniyle modelin immun sistem üzerindeki etkisini değerlendirmek üzere biyokimyasal bir analiz yapılmamıştır (IL-6 düzeyi bakmak vb). Ayrıca çalışmamızdaki gebe fareler aynı genetik kökenden olmalarına (C57), aynı kaynaktan, aynı yaş ve kiloda alınmalarına rağmen, çalışmada kullanılan yavrular gibi, aynı anneden doğan yavrular değillerdir. Dolayısıyla fare kökenindeki genetik değişkenliğin de sonuçlarımız üzerinde etkisi olmuş olabilir.

Araştırmamızda dendritik çıkıntılarının sayımı için dendritlerinde sarı floresan protein (YFP) ifade eden Thy1-ChR2-YFP transgenik erkek fareler, yabanıl tip C57BL/6 ile çiftleştirildiği için elde edilen yavruların davranış sonuçlarının yorumlanmasında transgenik olma etkisinin kontrol edilmesi amacıyla kontrol grubundaki 3 Thy1-ChR2-YFP pozitif fare ile 3 Thy1-ChR2-YFP negatif farenin davranış test sonuçları birbiriyle karşılaştırılmıştır. Bu analiz sonucunda iki grup arasında herhangi bir davranışsal parametrede istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır. Bu nedenle yavrulardaki davranış farklılıklarında Thy1-ChR2-YFP transgeninin varlığının anlamlı etkisi olmadığı sonucuna varılmıştır.

5.2 Bölgesel kalınlık ve Bölgesel Kalınlık Davranış Korelasyon Bulguları

Çevresel faktörlerin beyine etkisinin bölgeye özgül olduğu gösterilmiştir. Dolayısıyla, MİA da çevresel faktörleri modellediğinden, belirli beyin alanlarındaki

değişikliklerin dikkate alınması gerekir. Örneğin, OSB'li ikizlerde yapılmış bir insan nörogörüntüleme çalışmasında orbitofrontal kortekste ve anterior singulat kortekste gri cevher kalınlığı OSB belirtileriyle ilişkili bulunmuştur. Özellikle stereotipik davranışlarla orbitofrontal korteks kalınlığı ilişkili çıkmıştır(89). Medial PFK, hipokampus, striatum OSB çalışmalarında en sık çalışılan ve sosyal davranış, kısıtlı ilgi alanı, tekrarlayıcı davranış, ve duyuşsal entegrasyon sorunlarıyla ilişkileri gösterilmiş bölgelerdir (90, 91). Erken çocukluk döneminde semptomların başlangıcında baş çevresi, beyin hacmi ve korteksteki nöron sayısının arttığı insan OSB çalışmalarında gösterilse de (3, 92) morfolojik veya işlevsellik farkı gösteren belirli beyin alanlarındaki değişikliklerin bozukluğun sonuçları mı nedenleri mi olduğu açık değildir. Olası bir açıklama olarak, doğum öncesi immun aktivasyonun, özellikle nörogelişimdeki kritik hassas dönemlerde patogeneizde rol oynadığı varsayılmaktadır. Bu ilişkiyi doğrulamak için MİA hayvan modeli çalışma bulguları, annenin immun aktivasyonu ile kortikal gelişim arasında bir bağlantı olduğunu göstermektedir (24, 93).

Şaşırtıcı bir şekilde mPFK kalınlığı gruplar arasında farklı bulunmamış ve MPFK ile otistik benzeri davranışlar arasında bir ilişki bulunamamıştır. Bu, farelerin ömründe yürümeye başlayan çocuk aşamasına karşılık gelen deneylerimizin zamanlaması (PN24-28. gün) ile ilgili olabilir. Deneylerimizi prefrontal korteks olgunlaşmasından önce olabilecek bu yaş aralığında yapmamız, medial prefrontal korteks kalınlığında farklılık bulamamamızın nedenlerinden biri olabilir. Prefrontal korteks beyin gelişim sıralamasına göre düzenlenecek en son bölgedir. Ayrıca araştırmamızda kullanılan ölçüm yönteminin yeterince hassas olmaması (radyolojik görüntüleme gibi), örneklem büyüklüğünün küçük olması ve denekler arasındaki değişkenlik, sonuçlarımızın yorumlanmasını sınırlamış olabilir.

Davranışların morfolojik farklılıklarla ilişkisini incelediğimizde, hipokampusta stereotipik davranış dominant Poly (I:C) grubunda anlamlı bir kalınlık farkı gözlenmiştir. Araştırmamızdaki bu bulguyu destekler şekilde Poly(I:C) ile oluşturulan MİA modellerinde hipokampal morfoloji ve fonksiyonun önemli bir etkiye sahip olduğu daha önce gösterilmiştir. Örneğin, bu modelle hipokampusun CA1 bölgesindeki parvalbumin-pozitif internöronların yoğunluğunun ve doğum sonrası erken dönemde inhibisyonunun güçlü bir şekilde azaldığı gösterilmiştir (94). Ek

olarak, yine bu modelde hipokampustaki mikroglial sayı ve aktivasyonda fark görülmemesine rağmen presinaptik sinaptofizin ve fagot yoğunluğunun azalması yetişkinlikte hipokampal sinaptik fonksiyon üzerindeki etkiyi ortaya koymaktadır (95). Poly(I:C) ile oluşturulan MIA modelinde, yavruların hipokampusunda miyelinasyon ve aksonal gelişimi geciktirdiği gösterilmiştir (96). Başka bir Poly (I:C) MIA çalışmasında da yine hipokampusa özel sitokin değişiklikleri olduğu gösterilmiştir. Bununla beraber MIA geçirmiş beyinlerde erişkinlik döneminde neokortikal ve hipokampal kalınlıkta azalmalar rapor edilmiştir (97). Araştırmamıza benzer şekilde, hipokampusta kalınlık artışı olduğunu sadece erkek farelerde gösteren Nfl^{+/-} genetik nörogelişimsel bozukluk modelinde bir çalışma da bulunmaktadır (98). Bu bulguyu daha iyi yorumlayabilmek için daha geniş örneklemler ve cinsiyetleri de gözeten Poly (I:C) ile oluşturulmuş MIA modeli çalışmalarında, daha hassas ölçüm sağlayan ve moleküler yöntemlerle birleştirilmiş metodolojiye sahip araştırmalara ihtiyaç vardır.

Stereotipik davranış ile hipokampus kalınlığı ilişkili bulunmuştur. OSB' de beyinde görülen morfolojik değişikliklerinin sinaptik ayıklanma sürecinin aksamıyla ilişkili olabileceği düşünülmüştür (32,33). Mikrogliaların hipokampusta 14 ve 28. postnatal günler arasında önemli histolojik farklılıklar göstermesinin sinaptik budanmada mikrogliaların etkili olabileceği, hipokampus CA1 CA2 bölgelerinin lezyonlarının veya bu bölgelerde protein sentezi inhibisyonunun sosyal bellek bozukluğuyla ilişkisi gösterilmiştir (99). Çalışmamızda StD Poly (I:C) grubunda hipokampus kalınlığında gördüğümüz farklılık, bu kritik zamanlama ile ilişkili olabilir. Ayrıca Poly (I:C) gruplarını ikili karşılaştırdığımızda PBS grubu ile hem StD hem SDD grubu arasında hipokampus kalınlığı anlamlı olarak farklı bulunmuştur. Bu bulgular hipokampusun sosyal bellek ve öğrenmeyle de ilişkili olduğuna işaret etmektedir (100). Bununla beraber bu bulguyu destekleyecek şekilde dendritik çıkıntı sayımı süreci teknik sorunlar nedeniyle tamamlanamamıştır, ileride yapılacak çalışmalarda dendritik çıkıntı sayısı değerlendirilerek gruplar arasında karşılaştırılmalıdır.

Araştırmamızda gruplarımız arasında striatum kalınlığında farklılık bulunmamıştır. Aslında striatum stereotipik hareket ile ilişkisi en sık gösterilen beyin bölgesidir ancak araştırmamızda YOTT indeksi ile striatum kalınlığı arasında pozitif

korelasyon gösterilmiştir. Bu bulgumuz striatumun bellek üzerindeki düzenleyici etkisiyle ilişkili olabilir (101). Hipokampus ve striatum kalınlıklarının güçlü pozitif korelasyon göstermesi de, öğrenme ve stereotipik davranış bağlamında, sosyal davranışı düzenlemek için karşılıklı konuşan bu alanlar arasındaki ilişkilerin sonucu olabilir. Bu aynı zamanda hipokampus kalınlığı ile bilye gömme skorlarının pozitif ilişkili bulunmasını da açıklıyor olabilir. Buna ek olarak, yüksek striatum kalınlığının yüksek YOTT indeksleriyle ilişkili bulunması, yüksek fonksiyonel otistik insanlarda görülen daha iyi IQ puanlarının bir görünümü olarak da düşünülebilir. Bu, ilk Poly (I:C) grubundaki (StD) daha iyi sosyalleşme puanlarının ardındaki kompanzatuvar mekanizmanın sonucu da olabilir; çünkü sosyal davranışlar temel olarak öğrenme olmadan değerlendirilemez.

5.3 İmmunohistokimya bulguları

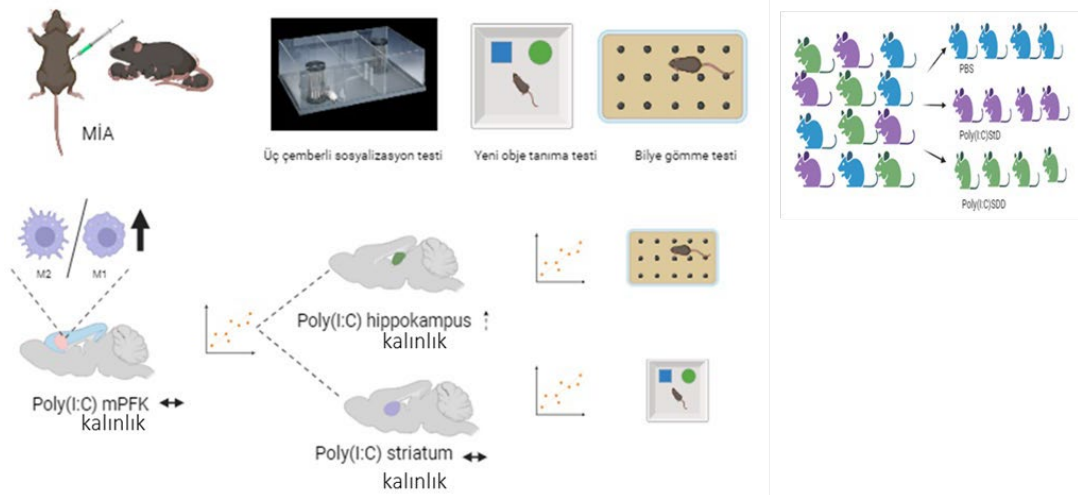
Araştırmamızda sinaptik budanma ile mikroglial aktivite ilişkisini hücresele düzeyde göstermek üzere immunohistokimyasal analizler yapılmıştır. OSB de en çok değişiklik bildirilen bölge olarak medyal PFK incelenmek üzere seçilmiştir. Buna yönelik olarak mikroglial aktiviteyi göstermek için seçilen Iba-1 antikoruyla yapılan işaretlemelerde oluşturulan hem kontrol ve Poly (I:C) grupları arasında, hem de oluşturulan üç alt grup arasında fark saptanmamıştır. Bu sonuç, gruplar arasında medyal PFK kortikal kalınlıkta istatistiksel olarak anlamlı fark görülmemesiyle birlikte ele alındığında, çalışmanın yapıldığı erken dönemde medyal PFK gelişiminin henüz tamamlanmamış olması ile ilişkili olabilir. Ayrıca, ölçümlerdeki geniş varyasyon ve örneklem sayısının azlığı da istatistiksel anlamlılığa ulaşmayı engellemiş olabilir. Iba işaretlemesi için CY3 sekonder antikor kullanıldığından her 3 grupta Iba1 işaretlemesi, sayımı ve analizi yapılabilmektedir. Ancak, antiCD86 ve antiYm1 antikorlarına yönelik elimizde bulunan Cy2 sekonder antikor ile yapılan işaretlemeler Thy1-ChR2-YFP farelerdeki YFP sinyalleri ile yakın dalga boyunda olduğundan, bu antikorların immunohistokimyasal incelemesine sadece Thy1-ChR2-YFP negatif farelerle devam edilmiştir. Bu durumda fare sayısı çok azaldığından poly (I:C) grubu alt gruplara ayrılmadan değerlendirilmiştir. Bunlara ek olarak bu tezin konusu dışında kalan hipokampus bölgesinin kalınlığında gruplar arasında bir farklılık gözlenmesi, bu alanda yapılacak immunohistokimyasal incelemede farklı bir sonuca ulaşabileceğini düşündürmektedir. İnsanlarda yapılan ölüm sonrası çalışmalarda, OSB olan bireylerin beyin dokusunda nöroinflamasyon mikroglial aktivite ilişkisi gösterilmiştir (29, 93). Ancak maternal immun aktivasyon modellenen hayvan çalışmalarını gözden geçiren bazı çalışmalarda da çalışmamızla benzer şekilde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde Iba-1 aktivitesinde değişiklik bulunmayan çalışmalar da bildirilmiştir (102, 103).

Araştırmamızda mikroglial fenotipinde M2 yönünde artacağı hipotez edilerek, M2 mikroglialar Ym1 ve M1 mikroglialar CD86 antikoruyla işaretlenmiştir. Hem Ym1, CD86 sayılarına hem de Ym1/CD86 oranlarına baktığımızda, Poly (I:C) ve PBS grupları arasında fark bulunmamıştır. Bu durum, ölçümlerdeki geniş varyasyon ve örneklem azlığı ile ilişkili görünmekle birlikte, araştırmamızda bölgesel kalınlık ölçümünün radyolojik ölçüm gibi sensitif bir yöntem ile yapılmamış olması ile de ilgili olabilir. Ayrıca sinaptik plastisite ile ilgili bir bulgu verebilecek olan dendrit

görüntülemesi aşamasının tamamlanıp dendritik çıkıntı sayımı yapılamaması, kortikal katmanlara veya bölgelerin alt bölümlerine göre spesifik bir analiz yapılmaması da sonuçlarımızın yorumlanmasını kısıtlamıştır.

Bu bağlamda, ileride daha büyük fare örneklerinde gelişimin çocukluktan erişkinliğe farklı aşamalarında ve farklı beyin bölgelerinde değerlendirmelerin moleküler analizlerle teyit edildiği deneylere ihtiyaç vardır. Bunun yanı sıra nöroinflamasyonda mikroglia harici glia hücrelerin ve nöronların da rol alabildiği, bu hücre tipleri arasında bir karşılıklı etkileşim (*cross-talk*) olduğu bilinmektedir (104). Dolayısıyla araştırmamızın kapsamına girmeyen hücre türleri ve hücreler arası etkileşim patofizyolojide etkiliyse de burada gösterilememiş olabilir. Diğer yandan, mikroglial M1-M2 fenotiplendirmesinin doğru bir yaklaşım olmadığını savunan görüşler de mevcuttur. Bu görüşe göre mikroglial fenotip değişimi dinamik bir süreçtir, mikroglialar aynı zamanda her iki fenotipe dair protein ifadesi gösterebilmektedir (105). Araştırmamızda hipotez edildiği şekilde mikroglial fenotiplerdeki değişiklik sinaptik plastisite üzerinde kritik bir etkiye sahip olmayabilir. İleride yapılacak çalışmalarda M1/M2 fenotipleri çoklu belirteçlerle, farklı gelişim dönemlerinde, beyin bölgelerinde ve kortikal katmanlarda incelenmelidir.

Özetle çalışma bulgularımız, hamilelik döneminde 2 kez uygulanan Poly (I:C)'nin, insandakine benzer biçimde doğan yavruların sadece bir kısmında ve ilginç biçimde klinikte görülene benzer klinik heterojenitede Otizm benzeri davranışları artırdığı saptanmıştır. Dolayısıyla bu model klinik heterojenitenin altında yatan moleküler mekanizmaların incelenmesi için uygun bir modeldir. Bunun yanısıra mPFC'te gruplar arasında toplam mikroglia sayıları ve M2/M1 oranlarının değişmediği bulunmuştur. Ayrıca ölçülen mPFC kalınlıklarında bir değişim saptanmamıştır (Şekil 5-1).



Şekil 5-1 Araştırmamızın basamaklarının grafik özeti.

MIA uygulaması ardından yavrulara üç bölmeli sosyalleşme testi, yeni obje tanıma testi, bilye gömme testi uygulandı. Uygulanan davranış testleri analiz edildiğinde belirtilerde kliniğe benzer bir heterojenite görüldü. PBS grubunda sosyalizasyonu iyi olanlar, Poly(I:C) StD grubunda stereotipik davranış baskın olanlar ve Poly(I:C) SDD grubunda ise sosyal defisiti baskın olanlar dahil edilerek gruplandı. Sonrasında ölçülen medyal prefrontal korteks (mPFK) ve striatum kalınlığı değişmezken, hipokampus kalınlığı StD Poly(I:C) olgularda istatistiksel anlamlı düzeyde artmış bulundu. Hipokampus kalınlığı ile stereotipik davranış arasında, striatum kalınlığı ile öğrenme, bellek arasında pozitif korelasyon saptandı. Hipokampus kalınlığı ile striatum kalınlığı da pozitif ilişkili bulundu.

Bu durum mPFK'nın gelişiminin daha geç tamamlanması ile ilişkili olabileceği gibi kullanılan ölçüm yönteminin küçük farklılıkları tespit etmede yeterli çözünürlükte olmaması ile de açıklanabilir. Bu konuların daha ileri çalışmalarla incelenmesine ihtiyaç vardır. Sonuç olarak; OSB de beyin etkilenmesinin zamanlamasına bağlı olarak farklı beyin bölgelerinin etkilendiği ve bu beyin bölgelerinin de farklı belirti gruplarıyla ilişkili olabileceği, gruplar arasında İba sayımları açısından fark görülmediği, M1 ve M2 mikrogliya fenotiplerinden herhangi birinin mPFK'da baskın olarak gözlenmediği, sinaptik budanma ve mikrogliyal aktivite değişikliği dışında araştırmamızda yer almayan bazı diğer patofizyolojik mekanizmaların da hücresel düzeyde etkili olabileceği düşünülmüştür.

6 SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Çalışmamızda MIA modelinin klinik heterojeniteyi iyi temsil ettiği gösterilmiştir. Prenatal Poly (I:C) maruziyetinin bir alt-grup farede stereotipik davranışı arttırırken bir alt-grup farede sosyalleşmeyi bozduğu gözlenmiştir. Böylece oluşturulan alt grupların klinik fenotiplere benzer şekilde kendi içlerinde de varyasyon gösterdikleri görülmüştür. Bu modeli, farklı klinik heterojenitenin altında yatan nörobiyolojik süreçlerin kullanılması için öneriyoruz.
2. Belirti heterojenitesi göz önüne alınarak, ileride MIA modeliyle yapılacak OSB çalışmalarında daha geniş örneklem ile farklı gelişimsel evrelerde altta yatan mekanizmalara yönelik detaylı moleküler incelemeler eklenmesinin de faydalı olacağı kanısına varılmıştır.
3. Sütten kesme dönemi öncesinde OSB-benzeri davranışların incelenmemiş olması literatürdeki önemli bir eksiktir. İleride yapılacak araştırmalarda davranış testlerinin oluşturabileceği anneden ayırma stresini azaltmaya yönelik ultrasonik vokalizasyon testi gibi testlerin kullanılması veya yeni testler geliştirilmesi OSB'nin gelişim boyunca nörobiyolojik mekanizmalarının daha iyi anlaşılmasına katkı sağlayacaktır. Bunun yanı sıra beyin gelişimine dair elde edilebilecek moleküler ve morfolojik verinin, davranış testleriyle korelasyonlarını incelemenin de araştırmalarda yer almasının bu tür çalışmalara önemli bilgiler sağlayacağı düşünülmüştür.
4. Yapılan bölgesel kalınlık değerlendirmelerinde, mPFK kalınlığında gruplar arasında fark bulunmamıştır. Ancak stereotipik davranışları dominant alt grupta hipokampus kalınlığının anlamlı olarak arttığı gözlenmiştir. Hipokampal kalınlık değişikliği stereotipik davranış ile ve striatum kalınlığı da öğrenme ile pozitif ilişkili gözlenmiştir. Hipokampus kalınlığının da striatum kalınlığı ile pozitif korelasyonu olduğu görülmüştür.
5. mPFK'te toplam mikroglia sayıları gruplar arasında fark göstermemiştir. Ayrıca gruplar arasında Ym1, CD86 sayımları ve Ym1/CD86 oranları açısından fark olmadığı görülmüştür. İleride yapılacak çalışmalarda bu bulgunun sosyal defisit baskın ve stereotipik davranış baskın gruplarla genişletilmesi, başka M1, M2 belirteçleriyle incelenmesi önerilir.

7 KAYNAKLAR

1. Baio J, Wiggins L, Christensen DL, Maenner MJ, Daniels J, Warren Z, et al. Prevalence of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years - Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2014. *MMWR Surveill Summ.* 2018;67(6):1-23.
2. American Psychiatric Association D, Association AP. *Diagnostic and statistical manual of mental disorders: DSM-5: American psychiatric association* Washington, DC; 2013.
3. Schumann CM, Nordahl CW. Bridging the gap between MRI and postmortem research in autism. *Brain research.* 2011;1380:175-86.
4. Courchesne E, Mouton PR, Calhoun ME, Semendeferi K, Ahrens-Barbeau C, Hallet MJ, et al. Neuron number and size in prefrontal cortex of children with autism. *Jama.* 2011;306(18):2001-10.
5. Courchesne E, Redcay E, Morgan JT, Kennedy DP. Autism at the beginning: microstructural and growth abnormalities underlying the cognitive and behavioral phenotype of autism. *Development and psychopathology.* 2005;17(3):577-97.
6. Bell TJ, Welbanks L, Schlawin E, Line MR, Fortney JJ, Greene TP, et al. Methane throughout the atmosphere of the warm exoplanet WASP-80b. *Nature.* 2023;623(7988):709-12.
7. Wegiel J, Flory M, Kuchna I, Nowicki K, Ma SY, Imaki H, et al. Stereological study of the neuronal number and volume of 38 brain subdivisions of subjects diagnosed with autism reveals significant alterations restricted to the striatum, amygdala and cerebellum. *Acta Neuropathol Commun.* 2014;2:141.
8. Nickl-Jockschat T, Habel U, Michel TM, Manning J, Laird AR, Fox PT, et al. Brain structure anomalies in autism spectrum disorder--a meta-analysis of VBM studies using anatomic likelihood estimation. *Hum Brain Mapp.* 2012;33(6):1470-89.
9. Patriquin MA, DeRamus T, Libero LE, Laird A, Kana RK. Neuroanatomical and neurofunctional markers of social cognition in autism spectrum disorder. *Hum Brain Mapp.* 2016;37(11):3957-78.
10. Fenlon LR, Liu S, Gobius I, Kurniawan ND, Murphy S, Moldrich RX, et al. Formation of functional areas in the cerebral cortex is disrupted in a mouse model of autism spectrum disorder. *Neural Dev.* 2015;10:10.

11. Dodero L, Damiano M, Galbusera A, Bifone A, Tsafaris SA, Scattoni ML, et al. Neuroimaging evidence of major morpho-anatomical and functional abnormalities in the BTBR T+TF/J mouse model of autism. *PLoS One*. 2013;8(10):e76655.
12. Prata J, Santos SG, Almeida MI, Coelho R, Barbosa MA. Bridging Autism Spectrum Disorders and Schizophrenia through inflammation and biomarkers - pre-clinical and clinical investigations. *J Neuroinflammation*. 2017;14(1):179.
13. Ashwood P, Krakowiak P, Hertz-Picciotto I, Hansen R, Pessah I, Van de Water J. Elevated plasma cytokines in autism spectrum disorders provide evidence of immune dysfunction and are associated with impaired behavioral outcome. *Brain Behav Immun*. 2011;25(1):40-5.
14. Fagan K, Crider A, Ahmed AO, Pillai A. Complement C3 Expression Is Decreased in Autism Spectrum Disorder Subjects and Contributes to Behavioral Deficits in Rodents. *Mol Neuropsychiatry*. 2017;3(1):19-27.
15. Stevens B, Allen NJ, Vazquez LE, Howell GR, Christopherson KS, Nouri N, et al. The classical complement cascade mediates CNS synapse elimination. *Cell*. 2007;131(6):1164-78.
16. Estes ML, McAllister AK. Maternal immune activation: Implications for neuropsychiatric disorders. *Science*. 2016;353(6301):772-7.
17. Lammert CR, Lukens JR. Modeling Autism-Related Disorders in Mice with Maternal Immune Activation (MIA). *Methods Mol Biol*. 2019;1960:227-36.
18. Bergdolt L, Dunaevsky A. Brain changes in a maternal immune activation model of neurodevelopmental brain disorders. *Prog Neurobiol*. 2019;175:1-19.
19. Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature*. 2001;413(6857):732-8.
20. Cunningham C, Champion S, Teeling J, Felton L, Perry VH. The sickness behaviour and CNS inflammatory mediator profile induced by systemic challenge of mice with synthetic double-stranded RNA (poly I:C). *Brain Behav Immun*. 2007;21(4):490-502.
21. Ratnayake U, Quinn TA, Castillo-Melendez M, Dickinson H, Walker DW. Behaviour and hippocampus-specific changes in spiny mouse neonates after treatment

of the mother with the viral-mimetic Poly I:C at mid-pregnancy. *Brain Behav Immun.* 2012;26(8):1288-99.

22. Smith SE, Elliott RM, Anderson MP. Maternal immune activation increases neonatal mouse cortex thickness and cell density. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2012;7(3):529-32.

23. Mandour DA, Tolba AM, El-Bestawy EM. Maternal exposure to the environmental pollutant "BDE-47" impairs the postnatal development of rat cerebellar cortex by modulating neuronal proliferation, synaptogenesis, NGF and BDNF pathways. *Histol Histopathol.* 2022;37(6):555-73.

24. Cieslik M, Gassowska-Dobrowolska M, Jesko H, Czapski GA, Wilkaniec A, Zawadzka A, et al. Maternal Immune Activation Induces Neuroinflammation and Cortical Synaptic Deficits in the Adolescent Rat Offspring. *Int J Mol Sci.* 2020;21(11).

25. Cunningham CL, Martinez-Cerdeno V, Noctor SC. Microglia regulate the number of neural precursor cells in the developing cerebral cortex. *J Neurosci.* 2013;33(10):4216-33.

26. Coull JA, Beggs S, Boudreau D, Boivin D, Tsuda M, Inoue K, et al. BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain. *Nature.* 2005;438(7070):1017-21.

27. Patterson PH. Maternal infection and immune involvement in autism. *Trends Mol Med.* 2011;17(7):389-94.

28. Courchesne E, Pierce K, Schumann CM, Redcay E, Buckwalter JA, Kennedy DP, et al. Mapping early brain development in autism. *Neuron.* 2007;56(2):399-413.

29. Morgan JT, Chana G, Pardo CA, Achim C, Semendeferi K, Buckwalter J, et al. Microglial activation and increased microglial density observed in the dorsolateral prefrontal cortex in autism. *Biol Psychiatry.* 2010;68(4):368-76.

30. Lee AS, Azmitia EC, Whitaker-Azmitia PM. Developmental microglial priming in postmortem autism spectrum disorder temporal cortex. *Brain Behav Immun.* 2017;62:193-202.

31. Gupta S, Ellis SE, Ashar FN, Moes A, Bader JS, Zhan J, et al. Transcriptome analysis reveals dysregulation of innate immune response genes and neuronal activity-dependent genes in autism. *Nat Commun.* 2014;5:5748.

32. Zhan Y, Paolicelli RC, Sforazzini F, Weinhard L, Bolasco G, Pagani F, et al. Deficient neuron-microglia signaling results in impaired functional brain connectivity and social behavior. *Nat Neurosci.* 2014;17(3):400-6.
33. Paolicelli RC, Bolasco G, Pagani F, Maggi L, Scianni M, Panzanelli P, et al. Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science.* 2011;333(6048):1456-8.
34. Zhao Q, Wang Q, Wang J, Tang M, Huang S, Peng K, et al. Maternal immune activation-induced PPARgamma-dependent dysfunction of microglia associated with neurogenic impairment and aberrant postnatal behaviors in offspring. *Neurobiol Dis.* 2019;125:1-13.
35. Pang Y, Dai X, Roller A, Carter K, Paul I, Bhatt AJ, et al. Early Postnatal Lipopolysaccharide Exposure Leads to Enhanced Neurogenesis and Impaired Communicative Functions in Rats. *PLoS One.* 2016;11(10):e0164403.
36. Lord C, Elsabbagh M, Baird G, Veenstra-Vanderweele J. Autism spectrum disorder. *Lancet.* 2018;392(10146):508-20.
37. Maenner MJ, Warren Z, Williams AR, Amoakohene E, Bakian AV, Bilder DA, et al. Prevalence and Characteristics of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years - Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2020. *MMWR Surveill Summ.* 2023;72(2):1-14.
38. Postorino V, Kerns CM, Vivanti G, Bradshaw J, Siracusano M, Mazzone L. Anxiety Disorders and Obsessive-Compulsive Disorder in Individuals with Autism Spectrum Disorder. *Curr Psychiatry Rep.* 2017;19(12):92.
39. Tick B, Bolton P, Happe F, Rutter M, Rijdsdijk F. Heritability of autism spectrum disorders: a meta-analysis of twin studies. *J Child Psychol Psychiatry.* 2016;57(5):585-95.
40. Gentile S. Risks of neurobehavioral teratogenicity associated with prenatal exposure to valproate monotherapy: a systematic review with regulatory repercussions. *CNS Spectr.* 2014;19(4):305-15.
41. Lam J, Sutton P, Kalkbrenner A, Windham G, Halladay A, Koustas E, et al. A Systematic Review and Meta-Analysis of Multiple Airborne Pollutants and Autism Spectrum Disorder. *PLoS One.* 2016;11(9):e0161851.

42. Wu S, Wu F, Ding Y, Hou J, Bi J, Zhang Z. Advanced parental age and autism risk in children: a systematic review and meta-analysis. *Acta Psychiatr Scand.* 2017;135(1):29-41.
43. Xiang AH, Wang X, Martinez MP, Page K, Buchanan TA, Feldman RK. Maternal Type 1 Diabetes and Risk of Autism in Offspring. *JAMA.* 2018;320(1):89-91.
44. Ornoy A, Weinstein-Fudim L, Ergaz Z. Prenatal factors associated with autism spectrum disorder (ASD). *Reprod Toxicol.* 2015;56:155-69.
45. Chess S. Follow-up report on autism in congenital rubella. *J Autism Child Schizophr.* 1977;7(1):69-81.
46. Boulanger-Bertolus J, Pancaro C, Mashour GA. Increasing Role of Maternal Immune Activation in Neurodevelopmental Disorders. *Front Behav Neurosci.* 2018;12:230.
47. Jones HF, Ho ACC, Sharma S, Mohammad SS, Kothur K, Patel S, et al. Maternal thyroid autoimmunity associated with acute-onset neuropsychiatric disorders and global regression in offspring. *Dev Med Child Neurol.* 2019;61(8):984-8.
48. Brown AS, Meyer U. Maternal Immune Activation and Neuropsychiatric Illness: A Translational Research Perspective. *Am J Psychiatry.* 2018;175(11):1073-83.
49. Fiorentino M, Sapone A, Senger S, Camhi SS, Kadzielski SM, Buie TM, et al. Blood-brain barrier and intestinal epithelial barrier alterations in autism spectrum disorders. *Mol Autism.* 2016;7:49.
50. Liu G, Yu Q, Tan B, Ke X, Zhang C, Li H, et al. Gut dysbiosis impairs hippocampal plasticity and behaviors by remodeling serum metabolome. *Gut Microbes.* 2022;14(1):2104089.
51. Liu W, Li L, Xia X, Zhou X, Du Y, Yin Z, et al. Integration of Urine Proteomic and Metabolomic Profiling Reveals Novel Insights Into Neuroinflammation in Autism Spectrum Disorder. *Front Psychiatry.* 2022;13:780747.
52. Gozal E, Jagadapillai R, Cai J, Barnes GN. Potential crosstalk between sonic hedgehog-WNT signaling and neurovascular molecules: Implications for blood-brain barrier integrity in autism spectrum disorder. *J Neurochem.* 2021;159(1):15-28.

53. Shen Y, Zhong JG, Lan WT, Li YH, Gong JH, Zhao BX, et al. Bibliometric study of neuroinflammation in autism spectrum disorder. *Front Psychiatry*. 2023;14:1086068.
54. Kern JK, Geier DA, Sykes LK, Geier MR. Relevance of Neuroinflammation and Encephalitis in Autism. *Front Cell Neurosci*. 2015;9:519.
55. Lucchina L, Depino AM. Altered peripheral and central inflammatory responses in a mouse model of autism. *Autism Res*. 2014;7(2):273-89.
56. Nakagawa Y, Chiba K. Involvement of Neuroinflammation during Brain Development in Social Cognitive Deficits in Autism Spectrum Disorder and Schizophrenia. *J Pharmacol Exp Ther*. 2016;358(3):504-15.
57. Greene RK, Walsh E, Mosner MG, Dichter GS. A potential mechanistic role for neuroinflammation in reward processing impairments in autism spectrum disorder. *Biol Psychol*. 2019;142:1-12.
58. Careaga M, Rogers S, Hansen RL, Amaral DG, Van de Water J, Ashwood P. Immune Endophenotypes in Children With Autism Spectrum Disorder. *Biol Psychiatry*. 2017;81(5):434-41.
59. Zawadzka A, Cieslik M, Adameczyk A. The Role of Maternal Immune Activation in the Pathogenesis of Autism: A Review of the Evidence, Proposed Mechanisms and Implications for Treatment. *Int J Mol Sci*. 2021;22(21).
60. Bjorklund G, Saad K, Chirumbolo S, Kern JK, Geier DA, Geier MR, et al. Immune dysfunction and neuroinflammation in autism spectrum disorder. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 2016;76(4):257-68.
61. Smith SE, Li J, Garbett K, Mirnics K, Patterson PH. Maternal immune activation alters fetal brain development through interleukin-6. *J Neurosci*. 2007;27(40):10695-702.
62. Choi GB, Yim YS, Wong H, Kim S, Kim H, Kim SV, et al. The maternal interleukin-17a pathway in mice promotes autism-like phenotypes in offspring. *Science*. 2016;351(6276):933-9.
63. Tsukada T, Shimada H, Sakata-Haga H, Iizuka H, Hatta T. Molecular mechanisms underlying the models of neurodevelopmental disorders in maternal immune activation relevant to the placenta. *Congenit Anom (Kyoto)*. 2019;59(3):81-7.

64. Bilbo SD. The diverse culinary habits of microglia. *Nat Neurosci.* 2018;21(8):1023-5.
65. Hameete BC, Fernandez-Calleja JMS, de Groot M, Oppewal TR, Tiemessen MM, Hogenkamp A, et al. The poly(I:C)-induced maternal immune activation model; a systematic review and meta-analysis of cytokine levels in the offspring. *Brain Behav Immun Health.* 2021;11:100192.
66. Wang X, Yang J, Zhang H, Yu J, Yao Z. Oral probiotic administration during pregnancy prevents autism-related behaviors in offspring induced by maternal immune activation via anti-inflammation in mice. *Autism Res.* 2019;12(4):576-88.
67. Onore CE, Schwartzer JJ, Careaga M, Berman RF, Ashwood P. Maternal immune activation leads to activated inflammatory macrophages in offspring. *Brain Behav Immun.* 2014;38:220-6.
68. Tay TL, Bechade C, D'Andrea I, St-Pierre MK, Henry MS, Roumier A, et al. Microglia Gone Rogue: Impacts on Psychiatric Disorders across the Lifespan. *Front Mol Neurosci.* 2017;10:421.
69. Petrelli F, Pucci L, Bezzi P. Astrocytes and Microglia and Their Potential Link with Autism Spectrum Disorders. *Front Cell Neurosci.* 2016;10:21.
70. Kim HJ, Cho MH, Shim WH, Kim JK, Jeon EY, Kim DH, et al. Deficient autophagy in microglia impairs synaptic pruning and causes social behavioral defects. *Mol Psychiatry.* 2017;22(11):1576-84.
71. Xu ZX, Kim GH, Tan JW, Riso AE, Sun Y, Xu EY, et al. Elevated protein synthesis in microglia causes autism-like synaptic and behavioral aberrations. *Nat Commun.* 2020;11(1):1797.
72. Edmonson CA, Ziats MN, Rennert OM. A Non-inflammatory Role for Microglia in Autism Spectrum Disorders. *Front Neurol.* 2016;7:9.
73. Ishizuka K, Fujita Y, Kawabata T, Kimura H, Iwayama Y, Inada T, et al. Rare genetic variants in CX3CR1 and their contribution to the increased risk of schizophrenia and autism spectrum disorders. *Transl Psychiatry.* 2017;7(8):e1184.
74. Theoharides TC, Asadi S, Patel AB. Focal brain inflammation and autism. *J Neuroinflammation.* 2013;10:46.

75. Ciernia AV, Careaga M, LaSalle JM, Ashwood P. Microglia From Offspring of Dams With Allergic Asthma Exhibit Epigenomic Alterations in Genes Dysregulated in Autism. 2017.
76. Rodríguez JI, Kern JK. Evidence of Microglial Activation in Autism and Its Possible Role in Brain Underconnectivity. *Neuron Glia Biology*. 2011.
77. Koyama R, Ikegaya Y. Microglia in the Pathogenesis of Autism Spectrum Disorders. *Neuroscience Research*. 2015.
78. Ferreira MaL, Loyacono N. Rationale of an Advanced Integrative Approach Applied to Autism Spectrum Disorder: Review, Discussion and Proposal. *Journal of Personalized Medicine*. 2021.
79. Yang M, Zhodzishsky V, Crawley JN. Social deficits in BTBR T+tf/J mice are unchanged by cross-fostering with C57BL/6J mothers. *Int J Dev Neurosci*. 2007;25(8):515-21.
80. Rein B, Ma K, Yan Z. A standardized social preference protocol for measuring social deficits in mouse models of autism. *Nature protocols*. 2020;15(10):3464-77.
81. Zou D, Chen L, Deng D, Jiang D, Dong F, McSweeney C, et al. DREADD in parvalbumin interneurons of the dentate gyrus modulates anxiety, social interaction and memory extinction. *Current molecular medicine*. 2016;16(1):91-102.
82. Ecker C, Marquand A, Mourao-Miranda J, Johnston P, Daly EM, Brammer MJ, et al. Describing the brain in autism in five dimensions--magnetic resonance imaging-assisted diagnosis of autism spectrum disorder using a multiparameter classification approach. *J Neurosci*. 2010;30(32):10612-23.
83. Chakrabarti B. Commentary: Critical considerations for studying low-functioning autism. *Journal of Child Psychology and Psychiatry*. 2017;58(4):436-8.
84. Mazzone L, Ruta L, Reale L. Psychiatric comorbidities in asperger syndrome and high functioning autism: diagnostic challenges. *Ann Gen Psychiatry*. 2012;11(1):16.
85. Haida O, Al Sagheer T, Balbous A, Francheteau M, Matas E, Soria F, et al. Sex-dependent behavioral deficits and neuropathology in a maternal immune activation model of autism. *Transl Psychiatry*. 2019;9(1):124.

86. Eltokhi A, Kurpiers B, Pitzer C. Behavioral tests assessing neuropsychiatric phenotypes in adolescent mice reveal strain- and sex-specific effects. *Sci Rep.* 2020;10(1):11263.
87. Haddad FL, Patel SV, Schmid S. Maternal Immune Activation by Poly I:C as a preclinical Model for Neurodevelopmental Disorders: A focus on Autism and Schizophrenia. *Neurosci Biobehav Rev.* 2020;113:546-67.
88. Atanasova E, Arevalo AP, Graf I, Zhang R, Bockmann J, Lutz AK, et al. Immune activation during pregnancy exacerbates ASD-related alterations in Shank3-deficient mice. *Mol Autism.* 2023;14(1):1.
89. Hegarty JP, 2nd, Pegoraro LFL, Lazzeroni LC, Raman MM, Hallmayer JF, Monterrey JC, et al. Genetic and environmental influences on structural brain measures in twins with autism spectrum disorder. *Mol Psychiatry.* 2020;25(10):2556-66.
90. Banker SM, Gu X, Schiller D, Foss-Feig JH. Hippocampal contributions to social and cognitive deficits in autism spectrum disorder. *Trends in neurosciences.* 2021;44(10):793-807.
91. Li X, Zhang K, He X, Zhou J, Jin C, Shen L, et al. Structural, Functional, and Molecular Imaging of Autism Spectrum Disorder. *Neurosci Bull.* 2021;37(7):1051-71.
92. Courchesne E, Karns C, Davis H, Ziccardi R, Carper R, Tigue Z, et al. Unusual brain growth patterns in early life in patients with autistic disorder: an MRI study. *Neurology.* 2001;57(2):245-54.
93. Varghese M, Keshav N, Jacot-Descombes S, Warda T, Wicinski B, Dickstein DL, et al. Autism spectrum disorder: neuropathology and animal models. *Acta Neuropathol.* 2017;134(4):537-66.
94. Ducharme G, Lowe GC, Goutagny R, Williams S. Early alterations in hippocampal circuitry and theta rhythm generation in a mouse model of prenatal infection: implications for schizophrenia. *PLoS One.* 2012;7(1):e29754.
95. Giovanoli S, Weber-Stadlbauer U, Schedlowski M, Meyer U, Engler H. Prenatal immune activation causes hippocampal synaptic deficits in the absence of overt microglia anomalies. *Brain Behav Immun.* 2016;55:25-38.

96. Makinodan M, Tatsumi K, Manabe T, Yamauchi T, Makinodan E, Matsuyoshi H, et al. Maternal immune activation in mice delays myelination and axonal development in the hippocampus of the offspring. *J Neurosci Res*. 2008;86(10):2190-200.
97. Fatemi SH, Folsom TD. The neurodevelopmental hypothesis of schizophrenia, revisited. *Schizophr Bull*. 2009;35(3):528-48.
98. Santos S, Martins B, Sereno J, Martins J, Castelo-Branco M, Goncalves J. Neurobehavioral sex-related differences in Nf1(+/-) mice: female show a "camouflaging"-type behavior. *Biol Sex Differ*. 2023;14(1):24.
99. Delpech JC, Wei L, Hao J, Yu X, Madore C, Butovsky O, et al. Early life stress perturbs the maturation of microglia in the developing hippocampus. *Brain Behav Immun*. 2016;57:79-93.
100. Wang X, Zhan Y. Regulation of Social Recognition Memory in the Hippocampal Circuits. *Front Neural Circuits*. 2022;16:839931.
101. Gzielo K, Piotrowska D, Litwa E, Popik P, Nikiforuk A. Maternal immune activation affects socio-communicative behavior in adult rats. *Sci Rep*. 2023;13(1):1918.
102. Loewen SM, Chavesa AM, Murray CJ, Traetta ME, Burns SE, Pekarik KH, et al. The Outcomes of Maternal Immune Activation Induced with the Viral Mimetic Poly I:C on Microglia in Exposed Rodent Offspring. *Dev Neurosci*. 2023;45(4):191-209.
103. Calcia MA, Bonsall DR, Bloomfield PS, Selvaraj S, Barichello T, Howes OD. Stress and neuroinflammation: a systematic review of the effects of stress on microglia and the implications for mental illness. *Psychopharmacology (Berl)*. 2016;233(9):1637-50.
104. Tian L, Ma L, Kaarela T, Li Z. Neuroimmune crosstalk in the central nervous system and its significance for neurological diseases. *J Neuroinflammation*. 2012;9:155.
105. Ransohoff RM. A polarizing question: do M1 and M2 microglia exist? *Nat Neurosci*. 2016;19(8):987-91.

8 EKLER

EK-1: Tez Çalışması Etik Kurul Onayı



T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

Sayı : 52338575 - 78

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURUL KARARI

TOPLANTI TARİHİ	: 09.07.2019 (SALI)
TOPLANTI SAYISI	: 2019/07
DOSYA KAYIT NUMARASI	: 2019/43
KARAR NUMARASI	: 2019/07- 02
ONAY BİTİŞ TARİHİ	: 09.07.2024
ARAŞTIRMA YÜRÜTÜCÜSÜ	: Doç. Dr. Emine Eren KOÇAK
HAYVAN DENEYLERİNDE	: Dr. Öğr. Üyesi Dilek ÜNAL, Doç. Dr. Emine Eren
GÖREVLİ ARAŞTIRMACILAR	: KOÇAK
DİĞER YARDIMCI	:
ARAŞTIRMACILAR	:
ONAYLANAN HAYVAN TÜRÜ ve SAYISI	: 96 Adet Thy-Ch2-YFP Fare (25-30 gr.)

Üniversitemiz Nörolojik Bilimler ve Psikiyatri Enstitüsü öğretim üyelerinden Doç. Dr. Emine Eren KOÇAK'ın araştırma yürütücüsü olduğu 2019/43 kayıt numaralı *"Otizm Spektrum Bozukluğunda Nöroinflamasyonun Sinaptik Plastiklik Üzerine Etkileri"* isimli çalışma Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi'ne göre uygun bulunarak oy birliği ile onaylanmasına karar verilmiştir.

Araştırma yürütücüsü en geç, onay bitiş tarihinden sonraki 1 ay içerisinde proje sonuç raporunu Kurulumuza teslim etmekle yükümlüdür.

Prof. Dr. Sema ÇALIŞ
Etik Kurul Başkanı

EK-2 : Tez Çalışması Orjinallik Raporu**Digital Receipt**

This receipt acknowledges that Turnitin received your paper. Below you will find the receipt information regarding your submission.

The first page of your submissions is displayed below.

Submission author: Dilek Ünal
Assignment title: DilekÜnalTez
Submission title: Tez Turnitini
File name: Dilek_U_nal_tez.pdf
File size: 3.97M
Page count: 81
Word count: 15,264
Character count: 103,096
Submission date: 12-Feb-2024 03:46PM (UTC+0300)
Submission ID: 2292781086



3:12:34, 5:45 PM Tesisler

Emine Elvan KOÇAK Kütüphane Bilgi Mevcutları yeni Öğretim - Türkiye - Topluak Yardım çık

Özetler Öğrenciler Hız Değerleri Kütüphaneler Tabulara Tanıtma İstatistikler

GÖRÜNTÜLENDİRME ANASAYFASI - DÜZENLEMEZ - DÜZENLEMEZ

Gönder: Tek Dosya Yükleme ADM ○○○

Tebrikler! Gönderdiğiniz tamamlandı. Bu sizin dijital alında belgenizdir. Bu makbuzu Doküman Görüntüleyicide yazdırabilirsiniz.

Yazar:
Dilek Onel

Ödev başlığı:
DilekOnelTez

Önderli başlığı:
Tez

Dosya adı:
Dilek Onel tez.pdf

Dosya boyutu:
3.97M

Sayfa sayısı:
51


Kelime sayısı:
10254

Karakter sayısı:
100095

Önderlin Tarihi:
12-Şub-2024 08:45:05 (UTC-0500)

Önderlin Numarası:
2292781086

1 / 51 Sayfa 1



Günlük çok sayıda alınıyor. Bilgilerinize pazarlama amaçlarıyla hiçbir hedefiyle paylaşmayız. Bilgilerinizi YALNIZCA hizmetimizi sunabilmemiz için uygun tarafla paylaşabiliriz.

Tarih: 08/11/2024 - 2024 Turnitin, LLC. Tüm Hakları Saklıdır. Gizlilik Politikası

Tez Turnitini

ORJİNALLİK RAPORU

%7 BENZERLİK ENDEKSİ **%6** İNTERNET KAYNAKLARI **%2** YAYINLAR **%2** ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

ÖRNEK KAYNAKLAR

1	openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	%3
2	Submitted to Hacettepe University Öğrenci Ödevi	%1
3	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	<%1
4	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	<%1
5	www.utsakcongress.com İnternet Kaynağı	<%1
6	Michela Dell'Orco, Jordan E. Weisend, Nora I. Perrone-Bizzozero, Andrew P. Carlson et al. "Repetitive Spreading Depolarization induces the activation of cell differentiation, synaptic plasticity and neuroprotective pathways", Cold Spring Harbor Laboratory, 2023 Yayın	<%1
7	Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) Öğrenci Ödevi	<%1

9 ÖZGEÇMİŞ

DİLEK ÜNAL

Öğrenim Durumu

2017-2024	Hacettepe Sağlık Bilimleri Nörobilim Enstitüsü- Temel Nörolojik Bilimler Doktora Programı (PhD)
2022	ÜAK Doçentlik
2009 -2013	Hacettepe Üniversitesi Çocuk ve Ergen Ruh Sağlığı ve Hastalıkları AD. Tıpta Uzmanlık

Yayınlar Listesi

Uluslararası Yayınlar

Ünal,D., Eren-Koçak, E., Bahadır-Varol A., Köse T. Bir Maternal İmmun Aktivasyon Modelinde OSB Gruplarında Görülen Davranışsal Varyasyonun Morfolojik İlintileri. Türk Nöropsikiyatri Arşivi Kabul Tarihi: 16 Kasım 2023 - DOI: 10.29399/npa.28637
(**Doktora tezinden üretilmiş yayın**)

Ünal, D., & Çelebi, F. (2023). Is There a Difference in Parental Attitudes and Attachment for ADHD-Social Phobia Comorbidity? Turk Psikiyatri Dergisi, 34(1).

Karakuş Aydos, Y., Dövençioğlu, D., Karlı Oğuz, K., Özdemir, P., Pehlivan Türk Kızıllan, M., Kanbur, N., **Ünal, D.**, Nalbant, K., Çetin Çuhadaroğlu, F., & Akdemir, D. (2023). Neural correlates of distorted body images in adolescent girls with anorexia nervosa: How is it different from major depressive disorder? *Journal of Neuropsychology*, 00, 1–19. <https://doi.org/10.1111/jnp.12340>.

Çelebi, F., & **Ünal, D.** (2021). Self esteem and clinical features in a clinical sample of children with ADHD and social anxiety disorder. *Nordic Journal of Psychiatry*, 75(4), 286-291.

Ünal, D., Çiçek, N. M., Çak, T., Sakarya, G., Artık, A., Karaboncuk, Y., Özusta H.Ş. & Kültür, E. Ç. (2021). Comparative analysis of the WISC-IV in a clinical setting: ADHD vs. non-ADHD. *Archives de Pédiatrie*, 28(1), 16-22.

F.Ünal , F.Öktem , F.Ç.Çuhadaroğlu , S. E. Ç.Kültür, D.Akdemir , D.F.Özdemir , H.T.Çak , **D.Ünal** , K.Tıraş , C.Aslan, B. M. Kalaycı, B.S.Aydos, F.Kütük, E. Taşyürek, R. Karaokur, B. Karabucak, B.Karakök, Y.Karaer, A.Artık.Okul Çağı Çocukları için Duygulanım Bozuklukları ve Şizofreni Görüşme Çizelgesi-Şimdi ve Yaşam Boyu Şekli-DSM-5 Kasım 2016 -Türkçe Uyarlamasının (ÇDŞG-ŞY-DSM-5-T) Geçerlik ve Güvenirliği.Türk Psikiyatri Dergisi 2019;30(1):42-50.

Unal, D., Çelebi, F., Bildik, H. N., Koyuncu, A., & Karahan, S. (2019). Vitamin B12 and haemoglobin levels may be related with ADHD symptoms: a study in Turkish children with ADHD. *Psychiatry and Clinical Psychopharmacology*, 29(4), 515-519.

Unal, D., Cengiz, F. P., & Emiroglu, N. (2017). Does verruca vulgaris affect social anxiety and self-esteem in adolescents?. *International Journal of Adolescent Medicine and Health*, 31(1), 20160124.

Unal, D., Emiroğlu, N., & Cengiz, F. P. (2016). Evaluation of social anxiety, self-esteem, life quality in adolescents with acne vulgaris. *International journal of adolescent medicine and health*, 30(2), 20160035.

D.Ünal, M.F.Ünal, M.Alikaşifoğlu, A. Çetinkaya. Genetic Variations in Attention Deficit Hyperactivity Disorder Subtypes and Treatment Resistant Cases. *Psychiatry Investigation*. **2016**;13(4):427-433. DOI: 10.4306/Pİ.2016.13.4.427 (**Tıpta uzmanlık tezinden üretilmiş yayın**).

D.Ünal, D. Akdemir. Tourette Sendromunun Nörobiyolojisi. *Türk Psikiyatri Dergisi* **2016**;27(4):275-85. DOI:10.5080/u13640.

D. Akdemir, A. Zeki, **D. Y. Ünal**, M.Kara, F.Ç. Çetin. Kendine zarar verme davranışı olan ergenlerde psikiyatrik belirtiler, kimlik karmaşası ve benlik saygısı. *Anadolu Psikiyatri Dergisi*. **2013**;14:69-76.DOI: 10.5455/apd.35961.

B.E. Alan, **D.Ünal**. Scientific Letter- Mania after termination of epilepsy treatment: a case report. *African Journal of Psychiatry*. **2013**;16:327. DOI: 10.4314/ajpsy.v16i5.42.

Uluslararası kongrelerde sunulan, kongre kitabında tam metni veya özeti yayınlanmış sözlü veya poster bildiriler

R.Demirkol Tunca, **Ünal,D.**, Eren-Koçak, E., Belder, N. (2023) ESCAP 29 June-1 July 2023, Copenhagen. Proinflammatory Cytokines İn Stereotypical Movement Disorder.Oral presentation.

E. S.Akbaş Aliyev, **Ünal,D.**(2022) Proteome analysis in the differential diagnosis of Tic Disorder and Stereotypic movement disorder.IACAPAP 2022, Dubai.Oral presentation.

R.Demirkol Tunca, A. Dursun, E.Öztürk, A.Yavuz, K.Nalbant, **D. Ünal**, F.Çuhadaroğlu Çetin. Is there a relationship between inflammation and ADHD? 11th International Congress on Psychopharmacology & 7th International Symposium on Child and Adolescent Psychopharmacology, sözel sunum, Antalya, 2019.

E.Günel, M.Ayby, **D.Ünal**,K.Nalbant.Retrospective analysis of antipsychotic drug use in preschool children with disruptive behavior disorders:preliminary results. 11th International Congress on Psychopharmacology & 7th International Symposium on Child and Adolescent Psychopharmacology, sözel sunum, Antalya, 2019.

S.Yenen, E. S.Akbaş, **D.Ünal**, K. Nalbant, N.G.Ertuğrul, D. Yalnızoğlu. Evaluation of psychotropic drug use in epileptic patients simultaneous with antiepileptic medication: preliminary results. 11th International Congress on Psychopharmacology & 7th International Symposium on Child and Adolescent Psychopharmacology, sözel sunum,Antalya, 2019.

E.Öztürk, **D.Ünal**. A case of pediatric obsessive-compulsive disorder with spiritual thoughts and neurodevelopmental comorbidities.11th International Congress on Psychopharmacology & 7th International Symposium on Child and Adolescent Psychopharmacology, poster sunumu,Antalya, 2019.

A.Yavuz, **D.Ünal**,G.Evinç.Attention-deficit/ hyperactivity disorder (ADHD) comorbidity with social anxiety disorder (SAD): an adolescent case. 11th International Congress on Psychopharmacology & 7th International Symposium on Child and Adolescent Psychopharmacology, poster sunumu,Antalya, 2019.

E.Öztürk, R. Demirkol Tunca, A. Yavuz, A. Dursun, K. Nalbant,**D. Ünal**, F. Çuhadaroglu Çetin.Evaluation of neutrophil to lymphocyte ratio in autism spectrum disorder. 18th International Congress of ESCAP,poster sunumu,Viyana,2019.

D.Ünal. DEHB’de Ailesel İşlevsellik İle Semptom İlişkisi. Sözel Sunum, Uluslararası IV. Çocuk Gelişimi Kongresi 2018, Ankara. Kongre Bildiri Kitabı tam metin syf : 675-681.

D. Unal, M.F. Unal, M. Alikasıfoğlu, A. Cetinkaya, S. Karahan. Neuropsychological correlates of ADRA2A(rs1800544) and COMT(rs4680) polymorphisms in Turkish ADHD patients. ECNP Junior Scientists Workshop, Poster Sunumu, Nice, Fransa, 2018. European Neuropsychopharmacology, 2018.

DOI:<https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2017.12.094>

Y. Karakuş, A.Yavuz, E. Öztürk, R. Demirkol, A. Dursun, G.Evinç, **D.Unal**, D.Ozdemir, F.Cuhadaroğlu. Psychiatric Characteristics of Substance Abuse Among

Turkish Adolescents. IACAPAP Kongresi, Poster Sunumu, Praq, Çek Cumhuriyeti, 2018.

D. Akdemir, T. Çak, C. Taşkiran, **D. Ünal**, M. Kara, K. Nalbant, E. Ç. Yıldırım, S. Erden, C. Aslan, B.S. Doğan, B.M. Bekler, S. Aghazade, F. Ç. Çetin. Self esteem and associated factors in a large clinical adolescent sample in Turkey. *European Child and Adolescent Psychiatry*. 2013; 22 (Suppl 2): 271.

B.E. Alan, **D.Ünal**. Manic episode after termination of epilepsy treatment: a case report. 20.IACAPAP Dünya Kongresi, Poster Sunumu, Paris. *Neuropsychiatrie de l'Enfance et de l'Adolescence*. 2012; 60(5):164.

B. E. Alan, M. Kul, D. F. Özdemir, **D. Ünal**, F.Ç. Çetin. The anorexic sisters. *European Child and Adolescent Psychiatry*. 2011; 20 (Suppl 1): 173-4.

A.Zeki, **D. Ünal**, M. Kara, M. Çakır, C. Şimşek, B.E. Alan., M. Kul, D. Akdemir, D. F. Özdemir, F. Çuhadaroğlu. Self injurious behaviour among adolescents admitted to the child and adolescent psychiatry outpatient clinic. *European Child and Adolescent Psychiatry*. 2011; 20 (Suppl 1): 222.

A. Zeki, **D. Ünal**, E.Ç. Kültür. Two SSRIs and a rare endocrine side effect; two case reports. *European Child and Adolescent Psychiatry*. 2011; 20 (Suppl 1): 205.

Ulusal Yayınlar

F. Çelebi, **D. Ünal**. (2019). Klinik Bir Çocuk-Ergen Örneğinde Dehb İlişkili Yaşam Kalitesinin Değerlendirilmesi. *Zeynep Kamil Tıp Bülteni*, 50(2), 35-38.

D.Ünal, K. Nalbant, E.Günel, M. Aybı. (2021). Okul Öncesi Dönemde Risperidon ve Metilfenidat Tedavisi Başlanan Hastaların İlaç Tedavisinden Fayda Görmeleri ve Yan Etkiler Açısından Retrospektif Taranması. *Journal of Pediatric Disease/Cocuk Hastalıkları Dergisi*, 15(4).

D. Ünal, T. Çak Esen. Anne Bebek İlişkisi ve Sağlıklı Bağlanma. Türkiye Klinikleri J Child Psychiatry-Special Topics **2018**;4(1):1-4.

D. Ünal, F. Çuhadaroğlu. Psikiyatrik Hastalıklar ve Uyku Bozuklukları. Katkı Pediatri Dergisi;37(6):**2017**;38(1):739-744.

D. Ünal, B. Uluğ. Dikkat Eksikliği/Hiperaktivite Bozukluğunun Nörobiyolojisi. Türkiye Klinikleri J psychiatry –Special Topics **2012** ;5(1):20-8.

Ulusal kongrelerde sunulan ve tam metni veya özeti yayınlanmış, sözlü veya poster bildiriler

M.Ayby, E.Günel, **D.Ünal**, K.Nalbant. Evaluation of Methylphenidate Use In Preschool Children With Disruptive Behavior Disorder: Preliminary Results Child and Adolescent Psychiatry, 29. Ulusal Çocuk ve Ergen Ruh Sağlığı ve Hastalıkları Kongresi, sözel sunum, 2019, İstanbul.

M.E.Öksüzoğlu, B.Kılıç, H. B.Devocioğlu, K.Saruhan, B.Ergül, Y.S.Çelik, **D.Ünal**, K. Nalbant. Evaluation of social responsiveness and clinical characteristics in specific learning disorder. 29.Ulusal Çocuk ve Ergen Ruh Sağlığı ve Hastalıkları Kongresi, sözel sunum, 2019, İstanbul.

F.Çelebi, **D. Ünal**. The Relationship Between Parental Attitudes and Anxiety Symptoms in ADHD. 29.Ulusal Çocuk ve Ergen Ruh Sağlığı ve Hastalıkları Kongresi, sözel sunum, 2019, İstanbul.

B.Kılıç, M.E.Öksüzoğlu, H.B.Devocioğlu, K.Saruhan, B.Ergül, Y.S.Çelik, K.Nalbant, **D.Ünal**. Investigation of children with specific learning disorder and their families in terms of expressed emotion, quality of life and clinical features. 29.Ulusal Çocuk ve Ergen Ruh Sağlığı ve Hastalıkları Kongresi, sözel sunum, 2019, İstanbul.

F. Çelebi, **D. Ünal**. Dikkat Eksikliği Hiperaktivite Bozukluğu(DEHB) Etiyolojisinde TSH'nın Yeri Var mıdır? : Bir Vaka-Kontrol Çalışması. Sözel Bildiri. 28. Ulusal Çocuk ve Ergen Ruh Sağlığı Kongresi **2018**, İstanbul. Kongre Bildiri Kitabı syf:200.

F. Ünal, F. Öktem, F. Çuhadaroğlu Çetin, S. E. Çengel Kültür, D. Akdemir, D. Foto Özdemir, H.T. Çak, **D. Ünal**, K. Tıraş, C.Aslan, M. B. Bekler, B. S. Doğan, F. Kütük, E. Yanar, R. Karaokur, B. Karabucak, B. Karakök, Y. Karaer, A. Artık. DSM-5 Tanı Ölçütleri ne Göre Yeniden Düzenlenen Okul Çağı Çocukları İçin Duygulanım Bozuklukları ve Şizofreni Görüşme Çizelgesi – Şimdi ve Yaşam Boyu Şekli - DSM-5 - Türkçe Uyarlaması'nın (ÇDŞG-ŞY-DSM-5-T) Geçerlik ve Güvenirliği. Poster Sunumu. 28. Ulusal Çocuk ve Ergen Ruh Sağlığı Kongresi **2018**, İstanbul. Kongre bildiri Kitabı syf:335-336.

E. Günal, A. S.Yenen, E. S.Akbaş, K.Nalbant, **D. Ünal**, B.Yaradanakul, B.Kılıç, H. B. Yılmaz, K. Saruhan, M. E. Öksüzöğlü, M. Aybı, Y. S. Çelik, F. Çuhadaroğlu. Geçmişten Günümüze; 2000-2013 Yılları Arasında HÜTF'ne Başvuran DSM-IV-TR'ye Göre CKB Tanısı Alan Çocukların Günümüzdeki Durumu. Poster Sunumu. 23. Ergen Günleri Ulusal Kongresi **2018**, Ankara.

A.S. Yenen, K. Nalbant, **D.Ünal**, F. Çuhadaroğlu. Konjenital Adrenogenital Sendromlu Bir Olguda Ortaya Çıkan Cinsiyet Memnuniyetsizliği. Poster Sunumu. 23. Ergen Günleri Ulusal Kongresi **2018**, Ankara.

D.Ünal, M.F.Ünal, M.Alikaşifoğlu, A. Çetinkaya. Dikkat Eksikliği Hiperaktivite Bozukluğu Alt Tiplerinde ve Tedaviye Dirençli Olgularda Genetik Farklılıklar. 25. Ulusal Çocuk ve Ergen Ruh Sağlığı ve Hastalıkları Kongresi, sözel sunum, İstanbul, 2015. Çocuk ve Gençlik Ruh Sağlığı Dergisi **2015**;22(ek sayı:1):59.

M.Z.Kara, F. Ç. Çetin, S. Kala, **D.Ünal**, M. Çakır. İntihar Girişimi Olan ve Olmayan Kendine Zarar Verme Davranışı Gösteren Ergenlerde Gelişimsel ve Psikiyatrik Özellikler. 25. Ulusal Çocuk ve Ergen Ruh Sağlığı ve Hastalıkları Kongresi, Poster sunumu, İstanbul, 2015. Çocuk ve Gençlik Ruh Sağlığı Dergisi **2015**;22(ek sayı:1):112.

E. A. Arslan, H. Topaloğlu, **D. Ünal**, K.K. Oğuz. Nörologlar İçin Tanı Koyması Güç Olan Bir Konversiyon Bozukluğu Olgusu: Fizyolojik mi? Psikolojik mi? 15. Ulusal Çocuk Nöroloji Kongresi, Sözel bildiri, Sivas, **2013**. Kongre Bildiri Kitapçığı syf: 58-59.

D.Ünal, Ö. E. Aki. Ergenlerde Kimlik Karmaşası ve Bir Olgu Sunumu. 22. Ulusal Çocuk ve Ergen Ruh Sağlığı ve Hastalıkları Kongresi, poster sunumu, Bolu, **2012**. Kongre Bildiri Kitapçığı syf: 44.

B.E. Alan, **D. Ünal.** 22. Epilepsi Tedavisi Sonlanmasının Ardından Gelişen Manik Epizod. Ulusal Çocuk ve Ergen Ruh Sağlığı ve Hastalıkları Kongresi, poster sunumu, Bolu, **2012**. Kongre Bildiri Kitapçığı syf: 40.