

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PRENATAL DÖNEMDE MARUZ KALINAN
ELEKTROMANYETİK ALANIN DAVRANIŞ
VE SİNAPTİK PROTEİNLER ÜZERİNE
ETKİSİ VE ÇİNKO DESTEĞİNİN ROLÜ**

BURCU AÇIKGÖZ

FİZYOLOJİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

İZMİR-2019

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc2015970016

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PRENATAL DÖNEMDE MARUZ KALINAN
ELEKTROMANYETİK ALANIN DAVRANIŞ
VE SİNAPTİK PROTEİNLER ÜZERİNE
ETKİSİ VE ÇİNKO DESTEĞİNİN ROLÜ**

FİZYOLOJİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BURCU AÇIKGÖZ

Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. Müge KIRAY

Bu araştırma DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından
2018.KB.SAG.113 kodu ile desteklenmiştir.

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc2015970016

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans programı öğrencisi Burcu AÇIKGÖZ '**PRENATAL DÖNEMDE MARUZ KALINAN ELEKTROMANYETİK ALANIN DAVRANIŞ VE SİNAPTİK PROTEİNLER ÜZERİNE ETKİSİ VE ÇİNKO DESTEĞİNİN ROLÜ**' konulu Yüksek Lisans tezini 03.07.2019 tarihinde başarılı olarak tamamlamıştır.



BAŞKAN

Prof. Dr. Müge KIRAY

Dokuz Eylül Üniversitesi

Tıp Fakültesi

Fizyoloji AD



ÜYE

Doç. Dr. Ayfer DAYI

Dokuz Eylül Üniversitesi

Tıp Fakültesi

Fizyoloji AD



ÜYE

Dr. Öğr. Üyesi Özden GÖKDEMİR

İzmir Ekonomi Üniversitesi

Tıp Fakültesi

Fizyoloji AD

YEDEK ÜYE

Doç. Dr. İlkay AKSU

Dokuz Eylül Üniversitesi

Tıp Fakültesi

Fizyoloji AD

YEDEK ÜYE

Dr. Öğr. Üyesi Melis KARTAL YANDIM

İzmir Ekonomi Üniversitesi

Tıp Fakültesi

Tıbbi Biyoloji AD

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER.....	i
TABLOLAR DİZİNİ.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	v
KISALTMALAR.....	vi
TEŞEKKÜR.....	vii
ÖZET	1
ABSTRACT	3
1. GİRİŞ VE AMAÇ	5
2. GENEL BİLGİLER	7
2.1. Elektromanyetik Alan (EMA)	7
2.1.1. EMA Oluşumundaki Temel Teoriler.....	7
2.1.2. EMA Ölçü Birimleri.....	8
2.1.3. EMA'nın İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri	8
2.1.4. EMA'nın Merkezi Sinir Sistemi Üzerine Etkileri	9
2.1.5. EMA'nın Olası Etki Mekanizmaları.....	12
2.2. Merkezi Sinir Sistemi	13
2.2.1. Prefrontal Korteks, Hipokampal Formasyon, Amigdala Yapısı ve Fonksiyonları.....	13
2.2.2. Sinaps Yapısı ve Türleri	15
2.3. Otizm Spektrum Bozukluğu (OSB).....	15
2.3.1. Otizm Benzeri Davranışlar ve Ortaya Çıkış Mekanizmaları.....	16
2.3.2. Deney Hayvanlarında Otizm Benzeri Davranışların Değerlendirilmesi	17
2.3.3. Otizm Benzeri Davranışlar ve Sinaptik Proteinler	18
2.4. Çinkonun Yapısı ve Metabolik İşlevleri.....	19
2.4.1. Çinkonun Merkezi Sinir Sistemi Üzerine Etkileri.....	19
3. GEREÇ VE YÖNTEM	23
3.1. Araştırmanın Tipi	23
3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı	23
3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi / Çalışma Grubu	23
3.4. Çalışma Materyali	23
3.5. Araştırmanın Değişkenleri.....	23

3.6. Veri Toplama Araçları.....	23
3.6.1. Çalışma Grupları	24
3.6.2. EMA Oluşturulması.....	24
3.6.3. Çinko Desteği	25
3.6.4. Davranış Deneyleri	25
3.6.4.1. Sosyal Davranış Testi	25
3.6.4.2. Açık Alan Testi.....	26
3.6.4.3. Yükseltilmiş Artı (+) Labirent Testi	26
3.6.4.4. Zorlu Yüzme (Porsolt) Testi.....	27
3.6.5. Sakrifikasyon ve Dokuların Ayrılması	27
3.6.6. Biyokimyasal Değerlendirme	27
3.6.6.1. NLGN3 ve SHANK3 Ölçümleri	27
3.6.6.2. Çinko Ölçümü	28
3.6.6.3. Total Protein Ölçümü	28
3.6.7. Histolojik İncelemeler	29
3.6.7.1. Doku Takibi	29
3.6.7.2. Krezil Viyole ile Boyama	29
3.6.7.3. İmmunhistokimyasal İnceleme.....	30
3.6.8. Elektron Mikroskopik İnceleme	31
3.7. Araştırma Planı ve Takvimi.....	33
3.8. Verilerin Değerlendirilmesi	33
3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları	33
3.10. Etik Kurul Onayı	33
4. BULGULAR	34
4.1. Davranış Deneyleri	34
4.1.1. Sosyal Davranış Testi Sonuçları.....	34
4.1.2. Açık Alan Testi Sonuçları	37
4.1.3. Yükseltilmiş Artı Labirent Testi Sonuçları	39
4.1.4. Zorlu Yüzme (Porsolt) Testi Sonuçları	41
4.2. Biyokimyasal Değerlendirme Sonuçları.....	42
4.2.1. Doku NLGN3 Seviyeleri	42
4.2.2. Doku SHANK3 Seviyeleri	43
4.2.2. Plazma Çinko Seviyeleri	44
4.3. Histolojik İnceleme Sonuçları	45

4.4. Elektron Mikroskopik İnceleme Sonuçları.....	48
5. TARTIŞMA.....	51
5.1. EMA Maruziyeti ve Davranışa Etkisi	51
5.2. OSB, Çinko, Sinaptik Proteinler ve Davranış	56
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	65
7. KAYNAKLAR.....	67
8. EKLER	80
EK-1. Etik Kurul Onayı.....	80
EK-2. Özgeçmiş	81



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. EMA frekansları ve özellikleri.....	8
Tablo 2. Rutin doku takibi protokolü.....	29
Tablo 3. Krezil viyole ile boyama protokolü	30
Tablo 4. Araştırmada kullanılan cihaz listesi.....	32
Tablo 5. Gruplardaki dişi ve erkek yavru sayıları.....	34



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. SHANK3 dinamikleri ve aktivasyon durumunun çinko-bağımlı düzenleme modeli..	20
Şekil 2. Çalışmada kullanılan yöntemlerin akış şeması	24
Şekil 3. Sosyal davranış testi düzeneği.	26
Şekil 4. Elektron mikroskopik incelemede değerlendirilen özellikler.	31
Şekil 5. Elektron mikroskopik inceleme örneği.	32
Şekil 6. Sosyal ve boş alanlara giriş sayısı (frekans).	35
Şekil 7. Sosyal ve boş alanlarda geçirilen süreler (sn).	36
Şekil 8. Açık alan testinde toplam katedilen mesafe.....	37
Şekil 9. Açık alan testinde orta alanda geçirilen süreler.	38
Şekil 10. Yükseltilmiş artı labirent testinde katedilen toplam mesafeler.	39
Şekil 11. Yükseltilmiş artı labirent testinde açık kollarda geçirilen süreler.....	40
Şekil 12. Yükseltilmiş artı labirent testinde açık kollara giriş sayısı (frekans).	41
Şekil 13. Zorlu yüzme testinde hareketsiz geçirilen zaman.	42
Şekil 14. Doku NLGN3 seviyeleri (ng/mg protein).	43
Şekil 15. Doku SHANK3 seviyeleri (ng/mg protein).	44
Şekil 16. Plazma çinko seviyeleri (nmol/μl).	45
Şekil 17. NLGN3 immunreaktivitesi.....	45
Şekil 18. Dişilerde NLGN3 immunreaktivitesi.	46
Şekil 19. Erkeklerde NLGN3 immunreaktivitesi.	46
Şekil 20. SHANK3 immunreaktivitesi.	47
Şekil 21. Dişilerde SHANK3 immunreaktivitesi.	47
Şekil 22. Erkeklerde SHANK3 immunreaktivitesi.	48
Şekil 23. Sinaps (aktif zon) uzunluğu (nm).....	48
Şekil 24. Postsinaptik kalınlık (nm).	49
Şekil 25. Sinaptik aralık (genişlik, nm).....	50

KISALTMALAR

BDNF: Beyin Kökenli Nörotrofik Faktör

CA: Cornu Ammonis

EMA: Elektromanyetik Alan

ELF: Çok Düşük Frekans

GABA: γ -aminobutirik asit

IF: Ara Frekans

μ T: Mikrotesla

mT: Militesla

NLGN: Neuroligin

NMDA: N-metil-D-aspartat

NRXN: Neurexin

OSB: Otizm Spektrum Bozukluğu

RF: Radyo Frekansı

SHANK: SH3 and multiple ankyrin repeat domains

T: Tesla

USV: Ultrasonik Ses Emisyonu

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam boyunca beni destekleyen, yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen, bu kısıtlı ve yoğun zamanda benimle birlikte gece gündüz demeden çalışan, güleryüzlü ve her daim neşeli danışman hocam Prof. Dr. Müge KİRAY'a,

Eğitim sürecimde bilgi ve deneyimlerini aktaran, emeği geçen tüm Dokuz Eylül Üniversitesi Fizyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerine,

Tez çalışmamda yardımlarını esirgemeyen, sakrifikasyon sürecini neşelendiren hocalarım Prof. Dr. Amaç KİRAY ve Doç. Dr. İlkey AKSU'ya,

Elektron mikroskopik incelemeler sırasında bilgi ve deneyimlerini aktaran Prof. Dr. Alper BAĞRIYANIK'a, bana güvenerek çalışma ortamını açan, elektron mikroskopisinde karşılaştığım en ufak sorunumda bile benimle birlikte çözüm arayan, neşesi ve enerjisiyle çalışmaya motive eden İBG Elektron Mikroskopi Birim Yöneticisi Defne ÖZTÜRK'e ve doku takibinde yardımlarından dolayı Nevin ERSOY'a,

Bu yoğun ve zorlu süreçte bana destek olan ve yardımlarını esirgemeyen çalışma arkadaşlarım Pelin ÇOMAK, Bahar DEMİRBAŞ, Başar KOÇ, Güven GÜVENDİ, Sevim KANDİŞ, Beyza ÇALIŞKAN ve Sinem YAPRAK'a,

Hayvan çalışmalarımda ve deneylerimde her an yardıma hazır olan Ferhan Oral'a,

Her zaman yanımda olan, maddi, manevi ve bilimsel desteğini hiçbir zaman esirgemeyen aileme çok teşekkür ederim.

PRENATAL DÖNEMDE MARUZ KALINAN ELEKTROMANYETİK ALANIN DAVRANIŞ VE SİNAPTİK PROTEİNLER ÜZERİNE ETKİSİ VE ÇİNKO DESTEĞİNİN ROLÜ

Burcu AÇIKGÖZ, Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Fizyoloji
Anabilim Dalı, 35340, Inciraltı, İzmir

ÖZET

Amaç: İnsanlar, yaşamları boyunca çeşitli kaynaklardan elektromanyetik alana (EMA) maruz kalmaktadırlar. Gelişim sürecindeki yavrular, çevresel etkenlerden daha kolay etkilenebileceği için EMA'nın gelişen beyinde yapısal ve fonksiyonel değişikliklerle birlikte davranış değişikliklerine neden olabileceği düşünülmektedir. Bu çalışmanın amacı, prenatal ve postnatal dönemde EMA maruziyeti ile otizm benzeri davranışlar arasındaki bağlantıyı ve sinaptik proteinlerden NLGN3 ve SHANK3 ile ilişkisini varsa cinsiyet farklılığıyla birlikte ortaya koymak ve çinko desteğinin etkilerini araştırmaktır.

Yöntem: Çalışmada dört grup gebe sıçandan doğan yavrular kullanıldı: Kontrol grubu (n=4), EMA grubu (n=6, 5 gün/hf, 4 saat/gün EMA maruziyeti uygulandı), Kontrol+Çinko grubu (n=3, 5 gün/hf, 5 mg/kg/gün dozunda çinko uygulandı), EMA+Çinko grubu (n=5, 5 gün/hf, 4 saat/gün EMA maruziyeti ve 5 mg/kg/gün dozunda çinko uygulandı). Yavru sıçanların EMA maruziyeti, gebeliğin ilk gününde başlatılıp postnatal 28. güne kadar sürdürüldü. 28 ve 42. günlerde davranış deneyleri uygulandı. Deneylerin ardından kan ve beyin dokusu örnekleri alındı. Kanda çinko seviyeleri, dokuda NLGN3 ve SHANK3 düzeyleri ELISA yöntemiyle ölçüldü. Elektron mikroskopik inceleme ile beyin bölgelerindeki sinaptik yapılar incelendi.

Bulgular: Davranış testleri, EMA maruziyetinin yavru sıçanlarda sosyal davranış üzerine etkisi olmadığını, fakat aktivite ve keşif davranışını olumsuz yönde etkilediğini ve anksiyete oluşumunu arttırdığını, bununla birlikte çinko desteğinin dişi yavrularda kısmi olarak olumlu etki sağlarken, erkek yavrularda olumlu etki sağlamadığını gösterdi. SHANK3 ve NLGN3 proteinleri EMA gruplarında anlamlı olarak düşük bulundu ($p<0.05$) ve çinko desteğinin olumlu etki oluşturmadığı gösterildi ($p>0.05$).

Sonuç: Sonuç olarak; EMA maruziyeti, gelişen beyinde sinaptik proteinlerin seviyelerini değiştirerek cinsiyet farkıyla birlikte davranışsal değişikliklere yol açabilir. Farklı dozlarda

kullanılabilecek çinko desteği, EMA 'ya bağlı davranışsal ve yapısal etkilerin değerlendirilmesi açısından daha yararlı olacaktır.

Anahtar sözcükler: Elektromanyetik Alan, Davranış, Sinaps, SHANK3, Neuroligin3, Çinko.



THE EFFECT OF ELECTROMAGNETIC FIELD EXPOSURE IN THE PRENATAL PERIOD ON BEHAVIOR AND SYNAPTIC PROTEINS AND THE ROLE OF ZINC SUPPORT

Burcu AÇIKGÖZ, Dokuz Eylül University, Graduate School of Health Sciences,
Department of Physiology, 35340, Inciraltı, Izmir

ABSTRACT

Aim: People are exposed to electromagnetic fields (EMF) from various sources throughout their lives. Since the offspring in the developmental process may be more easily affected by environmental factors, it is thought that EMF may cause structural and functional changes on the developing brain and as a result, behavioural changes. We aimed to research the relationship between autism-like behaviours and EMF exposure as an environmental factor during the prenatal and postnatal periods, the role of synaptic proteins such as NLGN3 and SHANK3, gender differences and the effects of zinc supplementation.

Methods: Rat pups born from four groups of pregnant rats were used in the study; Control group (n=4), EMF group (n=6, 5 days/wk, 4 h/day EMF-exposure applied), Control+Zinc group (n=3, 5 days/wk, 5 mg/kg/day zinc applied), EMF+Zinc group (n=5, 5 days/wk, 4 h/day EMF-exposure and 5 mg/kg/day zinc applied). EMF exposure of rat pups was initiated on the first day of pregnancy and continued until the 28th postnatal day. Behavioral experiments were performed on days 28 and 42. Blood and brain tissue samples were taken after the experiments. Zinc levels in blood, NLGN3 and SHANK3 levels in tissue were measured by ELISA method. Synaptic structures in brain regions were examined by electron microscopic examination.

Results: Behavioral tests showed that EMF exposure had no effect on social behavior in offspring, but adversely affected activity and exploratory behavior and increased anxiety formation, while zinc supplementation had a partially positive effect on female offspring, but not positively on male offspring. SHANK3 and NLGN3 proteins were significantly lower in EMF groups ($p<0.05$) and zinc supplementation was not found to have a positive effect ($p>0.05$).

Conclusion: As a result; exposure to EMF may alter the levels of synaptic proteins in the developing brain, leading to behavioral changes with gender differences. Zinc supplementation,

which can be used in different doses, will be more useful for evaluating EMF-related behavioral and structural effects.

Key Words: Electromagnetic Field, Behaviour, Synapsis, SHANK3, Neuroligin3, Zinc.

.



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Günlük hayatta sıkça maruz kaldığımız elektromanyetik alanların (EMA) hücresele seviyede değişikliklere, sosyal ve bilişsel bozukluklar gibi davranışsal değişikliklere yol açabileceği bilinmektedir. Prenatal ve postnatal dönemde yavrular, çevresel etkenlerden daha kolay etkilenebileceği için EMA'nın gelişen beyinde yapısal ve fonksiyonel değişiklikler ve bunlara bağlı olarak davranış değişikliklerine neden olabileceği düşünülmektedir (1-3). Prenatal, postnatal ve adölesan dönemde EMA maruziyetinin etkilerinin incelendiği insan çalışmaları, çocuklarda nörogelişim ve davranışın olumsuz etkilendiğini göstermektedir (4, 5).

Nörogelişimsel bir bozukluk olan otizm spektrum bozukluğu (OSB) ve EMA maruziyeti patofizyolojisinin benzer yanlarının olması ve çocuklarda otizm benzeri davranışsal sorunların artışının EMA maruziyetindeki artışla birliktelik göstermesi EMA maruziyetinin çevresel bir faktör olarak otizme neden olabileceğini düşündürmektedir (6-8). Literatürde EMA maruziyeti-OSB ilişkisinin araştırıldığı tek *in vivo* çalışma, maruziyet sonrası yavrularda normal sosyalleşmenin yok olduğu ve keşif davranışının azaldığını göstermektedir. Çalışmadan perinatal EMA maruziyetinin otizm benzeri anormalliklere neden olabileceği sonucu çıkarılmış, ancak bu sonucun kesin olmadığı, çalışmanın daha geniş örneklem, daha fazla davranış deneyleri ve moleküler testler ile tekrarlanması gerektiği belirtilmiştir (9).

Sinaptik proteinlerden neurexin (NRXN), neuroligin (NLGN) ve “SH3 and multiple ankyrin repeat domains protein” (SHANK) proteinlerini oluşturan genlerdeki mutasyon ya da delesyon gibi genetik değişiklikler sinaptik fonksiyonda değişikliğe neden olmaktadır ve buna bağlı olarak otizm benzeri davranışlar görülebilmektedir. Bu nedenle sinaptik homeostazda meydana gelen anormallikler ya da sinaptik disfonksiyonun, OSB için bir risk faktörü olabileceği düşünülmektedir (10-12).

Prenatal ve postnatal dönemdeki mineral dengesizliğinin, OSB'ye neden olan çevresel etmenlerden biri olabileceği düşünülmektedir. Çinko azlığı, OSB'de etkili olan çevresel etmenlerden biri olarak öne sürülmektedir. Literatürde çinko takviyesinin otizme karşı koruyucu bir önlem olarak kullanılabileceğini belirten çalışmalar bulunmaktadır (13-15). Otizm benzeri davranışlar, çinko ve NRXN-NLGN-SHANK yolağının ilişkili olduğu çalışmalarda gösterilmiş olsa da otizm için bir önlem veya tedavi amacı ile çinko takviyesi kullanılmamaktadır (16, 17).

Bu çalışmanın amacı prenatal ve postnatal dönemde çevresel etmen olarak EMA maruziyeti ile otizm benzeri davranışsal bozukluklar arasındaki bağlantının davranışsal yönden incelenmesi, EMA maruziyetinin sinaptik proteinlerden NLGN3 ve SHANK3'e etkilerini varsa cinsiyet farklılığı ile birlikte ortaya koymak ve gebelikteki çinko desteğinin etkilerinin araştırılmasıdır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Elektromanyetik Alan (EMA)

İnsanlar, yaşamları boyunca farklı kaynaklardan çeşitli yollarla EMA'ya maruz kalmaktadırlar. Teknolojinin hızla gelişmesi ve elektrikli aletlerin günlük hayatta kullanımının artması ile maruz kalma süresi ve dozu da artmıştır. Yıllardır araştırılan EMA maruziyetinin insan sağlığı üzerine etkileri konusunda henüz kesin bir sonuca varılamamıştır. Çalışmalarda birçok farklı frekans ve doz denenmiş olup EMA'nın etkisiz ya da zararlı olabileceğinin yanı sıra bazı hastalıkların tedavisinde kullanılabileceği sonuçları elde edilmiştir.

EMA, voltaj farkından oluşan elektrik alan ve elektrik akımına bağlı olarak oluşan manyetik alanın bir araya gelmesi ile oluşur. EMA kaynakları, doğal ya da yapay olabilir. EMA'nın doğal kaynaklarına gök gürültüsü ve Dünya'nın manyetik alanı örnek verilebilirken, elektrik ve çeşitli dalga boylarının kullanıldığı cihazlar yapay kaynaklardır. Frekans ve dalga boyu, EMA'nın temel karakteristik özellikleridir (18). Dalga boyu, art arda gelen iki dalga döngüsü arasındaki mesafedir. Boş alanda, frekansla ilgilidir (dalga boyu = ışık hızı / frekans). Frekans 50 Hz iken dalga boyu çok uzundur (50 Hz: 6000 km, 60 Hz: 5000 km). Buna karşılık, 100 kHz frekansındaki bir radyo dalgası, 3 km'lik bir dalga boyuna sahiptir (19).

Elektromanyetik spektrumda yüksek frekans ve kısa dalga boyu iyonize radyasyon, düşük frekans ve uzun dalga boyu iyonize olmayan radyasyon olarak sınıflandırılmaktadır. İyonize radyasyon, mor ötesi ışınlar, X ışınları ve gama ışınları şeklinde sınıflandırılmaktadır. İyonize olmayan radyasyon kaynakları frekans özelliklerine göre statik, çok düşük frekans (ELF), ara frekans (IF), radyo frekansı (RF), mikrodalgalar ve görünür ışık şeklinde sınıflandırılabilir (20). EMA frekansları ve özellikleri özet olarak Tablo 1'de gösterilmiştir.

2.1.1. EMA Oluşumundaki Temel Teoriler

Elektromanyetizmin temeli hareket eden yüklü partiküllerin kendi çevrelerinde manyetik alan oluşturmalarına dayanmaktadır. Manyetik alanın yönünün belirlenmesi için fizikte sağ el kuralı uygulanmaktadır. Bu kurala göre sağ el telin çevresinde başparmak akım yönünü gösterecek şekilde sarılır ve bu sayede parmaklar bir çembere dik olacak şekilde manyetik alanın yönünü gösterir. Selonoid olarak tanımlanan uzun tellerin sıkıca sarılmasıyla oluşturulmuş sarmal bobin sistemlerinde akımın geçmesiyle manyetik alan oluşmaktadır. Bu

sistemlerde selonoidin uzunluğu çapından daha önemli olup sağ el kuralı uygulanarak manyetik alanın yönü bulunabilmektedir. İdeal bir selonoidde selonoid dışındaki manyetik alan sıfırdır. Bir diğer sistem olan toroidler ise içi boş bir halkanın veya bobinin etrafının kullanılan telin iki ucu birleşecek şekilde sarılmasıyla elde edilir ve toroidin içindeki manyetik alanın yönünün saptanması için sağ el kuralı uygulanır (21).

Tablo 1. EMA frekansları ve özellikleri.

Frekans bantları	Frekans (Hz)	Maruziyet kaynaklarına örnekler
Radyo frekansı	100 kHz – 300 GHz	Kablosuz ağ, ısıtıcılar, radar, haberleşme kaynakları
Ara frekans	300 Hz – 100 kHz	Mağaza alarmları, handsfree cihazlar
Çok düşük frekans	0 Hz – 300 Hz	Güç hatları, elektrikli ev aletleri
Statik	0 Hz	Manyetik rezonans görüntüleme, nükleer manyetik rezonans

2.1.2. EMA Ölçü Birimleri

Elektrik alan şiddeti birimi metre başına volt (V/m) veya metre başına kilovolt (kV/m) ve manyetik alanlar için akı yoğunluğu tesla (T) veya daha yaygın olarak militesla (mT) ya da mikrottesla (μ T) kullanılır. Evlerde ortalama manyetik alan Avrupa'da 0,025-0,07 μ T, ABD'de ise 0,055-0,11 μ T arasında değişmektedir. Evdeki elektrik alanının ortalama değerleri metre başına birkaç on volt aralığındayken, bazı cihazların yakınında ani manyetik alan değerleri birkaç yüz μ T kadar olabilir. Enerji hatlarının yakınında iken ise manyetik alanlar yaklaşık 20 μ T'ye ve elektrik alanları metre başına birkaç bin volta kadar ulaşır (19).

2.1.3. EMA'nın İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri

EMA maruziyetinde RF, IF, ELF ve statik frekans bantlarının insan sağlığı üzerine etkilerinin değerlendirildiği pek çok çalışma bulunmaktadır. 2015 yılında Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks (SCENIHR) tarafından yayınlanan “Potential health effects of exposure to electromagnetic fields (EMF)” kitapçığında bazı alanlardaki çalışmalardan elde edilen bilgilerin yeterli olduğu, bazı alanlarda ise tutarlı ve yeterli bilgi olmaması nedeniyle araştırılmaya devam edilmesi gerektiği belirtilmiştir (22).

Literatürde EMA maruziyetinin elektromanyetik hipersensitiviteye neden olduğunu, sitotoksik ve genotoksik etki gösterdiğini, kansere neden olduğunu, endokrin sistem, kardiyovasküler sistem, sinir sistemi ve üreme sistemini etkilediğini, işitsel ve oküler etkilerinin olduğunu, uyku parametrelerini etkilediğini gösteren çeşitli çalışmalar bulunmaktadır (23). Çalışmaların bir kısmı EMA'nın DNA hasarı, mutasyonlar ve kromatin yapıyı etkileyerek genotoksik etkiye neden olduğunu belirtirken, diğer çalışmalarda EMA maruziyetine bağlı olarak genotoksisiteye rastlanmadığı belirtilmektedir. Bu durum her ne kadar kanser ile ilişkisinin araştırıldığı çalışmalar için geçerli olsa da EMA'nın olası karsinojen (Grup 2B) olarak değerlendirildiği epidemiyolojik çalışmalar ve hayvan çalışmaları ağır basmaktadır. Üreme sistemine etkilerinin incelendiği çalışmalarda insanlarda sperm sayısı, hareketliliği ve yapısını etkilediği, deney hayvanlarında oksidatif hasar ve DNA hasarı ile sperm hareketliliği ve canlılığını azalttığı, kadınlarda düşük yapmak ile EMA maruziyeti arasında ilişkili olduğu bulunmuştur. Sürekli EMA maruziyetine bağlı olarak kişilerde uyku problemleri, baş ağrısı, sinirlilik, yorgunluk, stres ve konsantrasyon zorluğu gibi spesifik sağlık problemleri görülebilmektedir. Bu durum elektromanyetik hipersensitivite olarak adlandırılmaktadır ve günlük hayatta EMA maruziyeti fazla olan iş yerlerinde çalışan kişilerde görülmektedir. Hastalık nedeni olarak EMA maruziyetinin saptanması zor olsa da kişinin verdiği bilgiler, muayene, çeşitli biyokimyasal ölçümler ve yaşam alanındaki EMA maruziyetinin ölçülmesi gibi yöntemler kullanılabilir ve uygun tedavi uygulanabilir (24).

2.1.4. EMA'nın Merkezi Sinir Sistemi Üzerine Etkileri

Elektrik sinyalleri kullanarak işlev gördüğünden beyin ve sinir sisteminin, düşük frekanslı EMA, elektrik alanlar ve akımlarına karşı daha hassas olduğu düşünülmektedir. Deneysel olarak gönüllü kişi ve hayvanlara uygulanan zayıf EMA maruziyetinin bilişsel, davranışsal ve nöroendokrin tepkiler dahil olmak üzere sinir sistemi fonksiyonlarına etkileri araştırılmıştır. Ayrıca, EMA maruziyetinin intihar ve depresyon ile ilişkisini gösteren epidemiyolojik çalışmalar da bulunmaktadır (19). İnsan çalışmalarının bazılarında dikkat, algı ve bellekte kognitif performansın düştüğü, motor korteks uyarılabilirliğinin etkilendiği; hayvan çalışmalarında ise nöronal uyarılabilirliğin arttığı, öğrenme ve belleğin bozulduğu, hipokampusun CA bölgesinde piramidal hücre sayısında azalma, kan beyin bariyeri geçirgenliğinde bozulma olduğu gibi pek çok sonuç elde edilmiştir (23).

EMA maruziyeti sonrası beyindeki nörotransmitter düzeyindeki değişikliklerin hayvanlarda davranış değişimlerine neden olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. EMA maruziyetinin sıçan beyni üzerine etkisinin incelendiği bir çalışmada, korteks ve striatumda postsinaptik membranlarda N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptör düzeyinde azalma ile nörotransmitter reseptörlerinde biyokimyasal değişimler bulunmuştur (25). Çok düşük frekans EMA maruziyetinin nörotransmitterlere etkisinin değerlendirildiği bir diğer çalışmada sıçanların dopamin ve serotonin düzeyleri frontal kortekste kontrole göre yüksek, korpus striatumda ise düşük bulunmuş, değişimlerin davranışı etkileyebileceği belirtilmiştir (26). Düşük frekans EMA maruziyetinin farelere etkilerinin değerlendirildiği bir çalışmada ise anksiyete davranışı ile birlikte hipokampus ve hipotalamusta γ -aminobutirik asit (GABA) ve glutamat düzeylerinde artış bulunmuştur (27). Cep telefonu manyetik alanına maruz kalan sıçanlardaki nörotransmitter değişimlerinin incelendiği bir çalışma ile maruziyet sonrası sıçanların hipokampus, hipotalamus, orta beyin ve medulla oblongata bölgelerindeki dopamin, norepinefrin ve serotonin düzeylerinin etkilendiği gösterilmiştir (28).

EMA, nörotransmitter değişikliklerinin yanı sıra nöronal dejenerasyona ve buna bağlı olarak davranış değişikliklerine de neden olmaktadır. Mikrodalga maruziyetinin öğrenme ve bellek üzerine etkilerinin incelendiği çalışmada maruziyet sonrası sıçanlarda hipokampal nöronlarda dejenerasyon ve sinaptik veziküllerde azalmanın yanı sıra uzun süreli potansiyasyon ve öğrenmede bozulma olduğu gösterilmiştir (29). Bir başka çalışmada kronik mikrodalga maruziyeti sonrası sıçanlarda beyin elektriksel aktivitesinin baskılanması ile birlikte spasyal öğrenme ve belleğin bozulduğu, hipokampus nöronlarının dejenerasyonu ve nörotransmitter dağılımının bozulduğu gösterilmiştir (30). RF EMA maruziyetinin nöral etkilerinin incelendiği bir çalışmada maruziyet sonrası farelerde kortikal nöron demiyelinizasyonu, otofaji ve hiperaktivite benzeri davranış gözlenmiştir. Çalışmada miyelinizasyonun prenatal ve erken postnatal süreçte gerçekleştiği için bu dönemde EMA maruziyeti sonucu demiyelinizasyona bağlı olarak davranış bozukluklarının gelişebileceğine dikkat çekilmiştir (31).

Gelişim sürecindeki yavrular, çevresel etkenlerden daha kolay etkilenebileceği için EMA'nın gelişen beyinde yapısal ve fonksiyonel değişiklikler ve bunlara bağlı olarak davranış değişikliklerine neden olabileceği düşünülmektedir. Gebelik döneminde EMA maruziyetinin nörogelişime etkisinin incelendiği çalışmada yavrularda öğrenmede bozulma, hipokampusta küçülme, CA1 ve CA3 bölgelerinde sitolojik ve morfolojik bozulmalar saptanmıştır (32).

Prenatal EMA maruziyetinin yavruların nörogelişimine etkilerinin incelendiği bir başka çalışmada farelerde bellekte bozulma ve hiperaktivite gözlenmiştir. Bu davranış bozukluklarına maruziyete bağlı olarak gerçekleşen glutamaterjik sinaptik transmisyondaki bozulmanın neden olabileceği ileri sürülmüştür (33).

Literatürde EMA'nın nöronlarda fonksiyon bozukluğuna bağlı davranış değişikliklerine neden olabileceğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Sıçanlarda embriyonik ve erken postnatal dönemde çok düşük frekans EMA maruziyetinin etkilerini inceleyen bir çalışmada basit nöronal fonksiyonlarda ve sinaptik plastisitede değişimlere neden olduğu sonucu elde edilmiştir (34). Prenatal EMA maruziyetinin yavru sıçanların serebellumuna etkisinin incelendiği çalışmada Purkinje hücrelerinin uyarılabilirliği azalmışken, serebellumla ilişkili davranışları açısından bir fark bulunmamıştır. Bu iki sonuçtan yola çıkılarak Purkinje hücrelerinin elektrofizyolojik özelliklerindeki bu değişimin davranışı etkileyecek kadar şiddetli olmadığı düşünülmektedir (35). Sıçanlarda gebelik dönemi boyunca kronik EMA maruziyetinin yavrularda hipokampal fonksiyona etkisinin incelendiği çalışmada, yavrularda nöral uyarılabilirlikte azalma ile öğrenme ve bellek fonksiyonlarında bozulma olduğu gösterilmiştir (36). Prenatal EMA maruziyetinin yavruların gelişimi ve davranışına etkisinin incelendiği bir çalışmada, sıçanlarda nöromotor olgunlaşmanın etkilendiği, anksiyete gelişimi, motor ve keşif davranışında bozulma olduğu, oksidatif stres ve biyokimyasal bozulma olduğu gösterilmiştir (37). EMA'nın beyin gelişimini nasıl etkilediğinin araştırıldığı çalışmalardan ortak bir sonuca varılamaması nedeniyle bu konuda daha çeşitli çalışmalar yapılması gerekmektedir.

Prenatal, postnatal ve adölesan dönemde EMA maruziyetinin etkilerinin incelendiği insan çalışmaları, çocuklarda nörogelişim ve davranışın etkilendiğini göstermektedir. Prenatal dönemde cep telefonundan kaynaklanan EMA maruziyetinin nörogelişime etkisinin incelendiği bir çalışmada, cep telefonu kullanan ve kullanmayan annelerin çocuklarının nörogelişim skorlarında az da olsa bir fark bulunmuştur. Çalışmada cep telefonu kaynaklı EMA etkisi ile çocukların zihinsel gelişim skorlarında artış, psikomotor gelişim skorlarında azalma saptanmıştır (3). Prenatal ve postnatal dönemde cep telefonu kaynaklı EMA maruziyeti ile çocuklardaki davranışsal problemler arasındaki ilişkinin incelendiği bir diğer çalışma sonucunda maruziyetin hiperaktivite ve duygusal problemler gibi davranış bozukluklarına neden olabileceği belirtilmiştir. Hamilelik ve çocukluk çağı beyin gelişimi için önemli

dönemler olduğu için, EMA maruziyetinin çocuklarda davranış sorunlarına neden olabilecek bir risk faktörü olduğuna dikkat çekilmiştir (1). Aynı araştırmacılar, dahil edilen kişi sayısını arttırarak yaptıkları bir başka çalışmada benzer şekilde cep telefonu kullanımı ve çocuklarda davranış problemlerinin ilişkili olduğu sonucunu elde etmişlerdir (2).

İlkokul öğrencilerinde cep telefonu kullanımı ile dikkat eksikliği ve hiperaktivite bozukluğu arasındaki ilişkinin değerlendirildiği bir çalışmada sesli arama sırasında telefondan yayılan RF EMA'nın dikkat eksikliği ve hiperaktivite bozukluğu gelişiminde risk oluşturabileceği belirtilmiştir (4). Bir başka çalışmada çevresel RF EMA maruziyetinin 10 yaşındaki erkek çocukların nörodavranışsal fonksiyonuna etkisi incelenmiş, çalışma sonucunda yüksek RF'ye maruz kalan çocukların sözlü ifade ve anlama skorlarının düşük, içselleşme ve total problem skorları ile obsesif kompulsif bozukluk ve travma sonrası stres skorlarının yüksek olduğu bulunmuştur (5).

2.1.5. EMA'nın Olası Etki Mekanizmaları

EMA'nın termal ve termal olmayan etkisinde, hücrelerdeki moleküler bağların kırılması için gereken enerji olmadığından etkilerin dolaylı ve diğer uyarılmış biyokimyasal modifikasyonlara ikincil yolla olduğu varsayılmaktadır. Termal ya da termal olmayan EMA etkisi frekansa ve güce bağlıdır. Termal etkide, vücut dokularında bulunan suyun ısınması söz konusu olduğundan göz merceği ve testis gibi damarlanması ya da su miktarı az olan dokuların sıcaklıktaki ufak artışlardan bile etkilenebileceği belirtilmektedir (23).

EMA'nın DNA hasarı, oksidatif stres ve diğer biyokimyasal değişiklikler gibi hücresel değişiklikler ile sosyal ve bilişsel bozukluklar gibi davranış değişikliklerine neden olduğuna ilişkin literatürde pek çok veri bulunmaktadır. Çok düşük frekans EMA etkilerinin değerlendirildiği *in vivo* çalışmalarda maruziyetin hormonal değişiklikler ve davranış değişikliklerine neden olduğu gösterilmiştir. Bu alanda gerçekleştirilen bir çalışmada, kısa süreli maruziyet sonrası sıçanlarda hormonal stres göstergesi bulunmamış, uzun süreli maruziyet sonrası proopiomelanokortin düzeyi artmış ve hayvanlarda depresyon benzeri davranış gözlenmiştir (38). Bir diğer çalışmada ise maruziyet sonrası farelerde artmış kortikosteron düzeyi ile birlikte depresyon ve anksiyete benzeri davranışların varlığı bildirilmiştir (39).

Bu iki ana etkinin dışında EMA'nın melatonin seviyesini azaltması, kalsiyum akışını azaltması ve moleküler mekanizmalarda değişikliklere neden olması da olası etki mekanizmalarındandır. EMA maruziyetinin hücrel strese ve buna bağlı olarak DNA hasarının yanı sıra apoptoz yollarında bozulmaya neden olduğu gösterilmiştir (23).

2.2. Merkezi Sinir Sistemi

Merkezi sinir sistemi 100 milyardan fazla sinir hücresi ağından oluşan tepkilerimizi ve çevre algımızı kontrol eden bir sistemdir (40).

Beyin, beyin sapı ve medulla spinalisten (omurilik) oluşan merkezi sinir sistemi incelendiğinde dışta gri ve içte beyaz cevher yapıları görülür. Beyaz cevherde daha çok miyelinsiz sinir lifleri, gliya hücreleri ve miyelinli fibril demetleri bulunurken gri cevherde daha çok sinir hücresi gövdeleri bulunmaktadır (41).

Gri cevherden oluşan korteks altı alt tabakadan oluşmaktadır. Bu tabakalar ve tabakalardaki özelleşmiş nöron tipleri şu şekildedir:

- En dıştaki tabaka olan moleküler tabaka, horizontal hücreler ile bu hücrelerin uzantılarından meydana gelir.
- Dış granüler tabaka, sıkıca paketlenmiş ve çoğunlukla granüler hücrelerden oluşmaktadır.
- Dış piramidal tabakada geniş piramidal hücreler ve granüler hücreler bulunmaktadır.
- İç granüler tabaka, çoğu küçük olmak üzere bir kısmı büyük granüler hücrelerden oluşmaktadır.
- İç piramidal tabaka, orta ve büyük piramidal hücreleri içerir.
- En iç tabaka olan multiform tabaka, çoğu iğ şeklinde ve çeşitli şekillerdeki hücreleri barındırır (42).

2.2.1. Prefrontal Korteks, Hipokampal Formasyon, Amigdala Yapısı ve Fonksiyonları

İnsan beyninin en büyük kısmı olan serebral hemisferler serebral korteks, altındaki beyaz cevher ve iç yüzeydeki bazal gangliyonlar, amigdala ve hipokampal formasyon yapılarından oluşur. Serebral hemisferler algısal ve motor fonksiyonlar, bellek ve emosyon da dahil kognitif fonksiyonlarda görev alır (43).

Limbik sistem hayatta kalma, bellek, üreme ve beslenme gibi basit fonksiyonlarda merkezi role sahiptir. Orbital ve mediyal prefrontal korteks, insular korteks, singulat korteks, parahipokampal girus, bazal gangliyonların ventral kısımları, talamusun mediodorsal nükleusu, hipotalamusta mamillar cisim, hipokampus ve amigdala limbik sisteme ait yapılardır (44). Başlıca frontal, parietal, temporal ve oksipital loblardan oluşan serebral korteks günlük hayattaki eylemlerin planlanması ve yürütülmesinde görev alır. Amigdala emosyon ifadesi ile ilgiliyken, hipokampus bellek oluşumu ile ilgilidir. Bu iki subkortikal yapı aynı zamanda kortikal aktiviteyi düzenlemektedir (43).

Frontal lobun motor ve premotor alanlarının önündeki kısma prefrontal korteks denmektedir. Dorsal ve lateral bölümler olmak üzere iki ana bölgeye ayrılan prefrontal korteks, duysal ve motor korteksin yanı sıra bazal gangliyonlar ve serebellum ile bağlantılı olup uyarılara verilen dikkat ve motor tepkileri düzenler. Prefrontal korteksin ventral (inferior) ve medial kısımları, amigdala, hipotalamus ve nükleus accumbense bağlanır ve duyguların düzenlenmesinden sorumludur (45).

Hipokampal formasyon lateral ventrikülün inferior veya temporal boynuzunun zemininde, temporal lobun medial yüzeyine katlanmış kavisli bir korteks tabakasıdır. Denizatına benzerliğinden adını alan “Hipokampus”un uzunluğu yaklaşık 5 cm’dir. Hipokampal formasyon subikulum, ammon boynuzu ve dentat girus olmak üzere üç ana bölümden oluşur (45). Ammon boynuzu da (cornu ammonis – CA) CA1, CA2, CA3 ve CA4 olmak üzere dört kısımdan oluşur (46). Hipokampal formasyon, günlük deneyimlerimizle ilgili uzun süreli hafızanın yani epizodik hafızanın oluşumundan sorumludur, ancak burası hafıza için kalıcı saklama alanı değildir. Hipokampusun zarar görmesi, insanların yeni anılar oluşturma yeteneğine engel olurken, eski anıları hatırlama yeteneğini önemli ölçüde bozmaz (43).

Amigdala bazolateral çekirdek, santral çekirdek, kortikomediyal çekirdek, stria terminalis ve ventral amigdo-fugal liflerden oluşmaktadır (45). Amigdala, duysal uyarıların duygusal veya motivasyonel önemini analizinde rol oynar. Doğrudan büyük duyu sistemlerinden girdi alır ve amigdaladaki nöronlar neokorteks, bazal gangliyonlar, hipokampus ve hipotalamus dahil olmak üzere çeşitli subkortikal yapılara yansır. Beyin sapına gelen yansımalar, duygunun somatik ve visseral bileşenlerini değiştirerek amigdalanın aracılık ettiği

tehlikeye karşı kalp atış hızı, solunum ve pupilla dilatasyonundaki bilinçdışı değişikliklerin yanı sıra bilinçli korku algısına neden olabilir (43).

2.2.2. Sinaps Yapısı ve Türleri

İki nöronal hücre arasındaki temas sinaps olarak adlandırılır. Aksiyon potansiyelleri bir nörondan diğerine sinapslar aracılığıyla aktarılır ve ileti bu şekilde merkezi sinir sisteminde ilerler. Sinapslar, iki nöron arasında sinapsın gerçekleştiği yere bağlı olarak aksodendritik, aksosomatik ya da aksoaksonik olarak sınıflandırılmaktadır (45).

Sinapsların transfer yönüne bağlı olarak isimlendirilen presinaptik ve postsinaptik olmak üzere iki yüzü bulunur. Presinaptik tarafta genellikle akson terminali, postsinaptik alanda ise diğer nöronun dendrit ya da soması bulunur. Bu alanda gerçekleşen aktarıma sinaptik iletim denir. İleti akson boyunca elektriksel impuls olarak ilerleyerek akson terminalindeki sinaptik yarıktaki kimyasal sinyale dönüştürülür. Nörotransmitter olarak adlandırılan, akson terminalinde sinaptik veziküllerde depolanan ve salınan bu kimyasal sinyaller postsinaptik membranda tekrar elektriksel iletiye çevrilir (46).

Merkezi sinir sistemindeki sinapslar presinaptik ve postsinaptik membran farklılaşmalarına göre ikiye ayrılır ve bu ayrım elektron mikroskopunda yüksek büyütmede incelenebilir (46). Genel olarak sinapslar Gray's tip I ya da asimetric sinapslar da denen glutamaterjik ve eksitator sinapslar ile Gray's tip II ya da simetric sinapslar olarak adlandırılan inhibitör sinapslar olmak üzere ikiye ayrılır (47).

2.3. Otizm Spektrum Bozukluğu (OSB)

Son yıllarda görülme sıklığı artmakta olan OSB, sosyal iletişimde bozulma ve kısıtlı ve tekrarlı davranışlar ile karakterize nörogelişimsel bir bozukluktur. Otizmin çoğunlukla genetik kaynaklı meydana geldiği düşünülse de mutasyonlar, epigenetik değişimler ya da çevresel faktörlerin de etkili olabileceği düşünülmektedir (48).

Otizm ve EMA maruziyeti patofizyolojisinde pek çok benzerlik bulunmaktadır. İmmün sistem ve hormonal sistemde bozulma, kan-beyin bariyerinin bozulması, hücrel ve oksidatif stres, DNA hasarı, kalsiyum kanallarında işlev bozukluğu, sirkadiyen ritmin bozulması, kognisyon, uyku ve beyin dalgaları aktivitesindeki bozulmalar hem otizmde hem de EMA maruziyeti sonrası görülebilir. EMA maruziyetine bağlı olarak üreme sisteminde gerçekleşen

bozuklukların otizm görülme sıklığındaki artış ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir (7, 8). Günümüzde otizm görülme sıklığındaki bu artışın, yaygın olan EMA maruziyetine paralel olduğuna dikkat çekilmektedir. Nörogelişimsel bir bozukluk olduğu için embriyonun çevresel faktörlerden etkilenmesinin, otizm gelişimine neden olabileceği düşünülmektedir. Gebelik sürecinde EMA maruziyeti, embriyoda gözle görülemeyen hasarlara neden olabilmektedir. Amniyon sıvısının embriyoyu RF radyasyonuna karşı tam olarak koruyamadığı ve pelvik yapının RF radyasyonunun penetransını kolaylaştırdığı için gelişim sürecindeki embriyonun RF radyasyonunu absorbe ettiği düşünülmektedir (6).

Literatürde EMA maruziyeti-otizm ilişkisinin araştırıldığı tek *in vivo* çalışma, ELF EMA maruziyeti sonrası yavrularda normal sosyalleşmenin yok olduğu ve keşif davranışının azaldığını göstermektedir. Çalışmada yavrularda anksiyete, motor koordinasyon ve koku alma duyuları ile ilgili olarak maruziyete bağlı bir fark bulunmamıştır. Çalışmadan perinatal ELF EMA maruziyetinin otizm benzeri anormalliklere neden olabileceği sonucu çıkarılmıştır. Ancak bu sonucun kesin olmadığı, çalışmanın daha geniş örneklem, daha fazla davranış deneyleri ve moleküler testler ile tekrarlanması gerektiği belirtilmiştir (9).

2.3.1. Otizm Benzeri Davranışlar ve Ortaya Çıkış Mekanizmaları

OSB tanısal olarak başlıca üç davranış kategorisi ile karakterizedir: Sosyal etkileşimi sürdürmede zorluk çekme ve ilgisizliği içeren karşılıklı iletişimdeki anormallikler, göz kontağı kurma ve mimik kullanmada bozukluk; genellikle geç konuşma, dili anlama ve cevap vermedeki sorunlardan kaynaklı sözel iletişim kurmada bozukluk; değişime izin vermeyen, nesnelerin tekrarlayan kullanımı ve ritüeller gibi motor stereotipik davranışlar (49).

Amerikan Psikiyatri Derneği'nin DSM-5 (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders) son versiyonuna göre OSB şu iki grup belirtiyeye göre tanımlanmaktadır: A) sosyal etkileşim ve iletişimde bozulma; B) kısıtlı, tekrarlı davranış, ilgi ya da aktiviteler (50). OSB'li hastalarda bu kriterlere eşlik eden, anksiyete, epileptik nöbetler veya gastrointestinal bozukluklar gibi semptomlar da bulunmaktadır. Ayrıca otizmlili hastalar özellikle stresli durumlarda depresyon ya da toplumsal çekiniklik gibi psikiyatrik semptomlar da göstermektedir (51).

Beyindeki yapıların aktivitesi nörotransmitter ve nöromodülatörler tarafından düzenlendiğinden bu moleküllerin seviyeleri, reseptör yoğunluğu ve salımlarındaki

farklılıklar davranışı etkileyebilir (52). Bu anlamda farklı yaklaşımlarda pek çok hayvan modeli önerilmektedir. Bu yaklaşımlardan biri nörotransmitterler ve gelişimde etkili olan genlerin mutasyona uğratılmasıyla oluşan davranış değişikliklerinin incelenmesi şeklindedir. Bir diğer yaklaşım kişilerin OSB benzeri semptomlar gösterdiği (Angelman Sendromu, Frajil X Sendromu gibi) farklı hastalık tiplerine yönelik çalışmaları içermektedir. Başka bir yaklaşımda ise nörotransmitterlerde veya beyin bölgelerindeki OSB’de görülenlere benzer nörokimyasal veya anatomik anormallikler hedef alınmaktadır (53).

2.3.2. Deney Hayvanlarında Otizm Benzeri Davranışların Değerlendirilmesi

Rodentler biyokimya, fizyoloji, anatomi ve genetik açıdan insanlara oldukça benzer oldukları için sıçanlar ve fareler biyomedikal çalışmalarda translasyonel sistemler olarak sıkça kullanılmaktadır. OSB fare modellerinin risk genlerindeki mutasyonların davranışsal ve biyolojik sonuçlarını ortaya koyması sayesinde sonraki adım olarak OSB hayvan modelleri kullanılarak yeni terapötiklerin klinik çalışma öncesinde araştırılması hedeflenmektedir (50).

Otizmde genetik faktörler önemli olduğu için mutant hayvan modelleri kullanılarak otizm benzeri davranışların altında yatan mekanizmalar incelenmeye çalışılmaktadır. OSB’de görülen davranış bozukluklarının başında karşılıklı iletişimde zorluk çekme, sözel iletişimdeki eksiklikler ve tekrarlı davranışlar görülmektedir. Crawley ve arkadaşları sosyal davranışların incelenebilmesi için üç odalı bir düzenek geliştirmiştir. Crawley’nin üç odalı sosyalleşme ve sosyal yenilik testleri olarak da geçen bu davranış testleri ile OSB benzeri davranışlar incelenabilmektedir. Sosyal davranış testinde deneğin üç odalı düzenekte sağ veya sol bölmede kafes içinde duran yabancı hayvana ne kadar ilgi gösterdiği incelenirken sosyal yenilik tercihi testinde deneğin aynı düzenekte boş duran kafese konan yeni yabancı hayvana olan ilgisi incelenmektedir. Sosyal iletişimin incelenmesi için bunlara ek olarak ultrasonik vokalizasyon ölçümünün yapılmasının faydalı olacağı belirtilmektedir (53).

Deney hayvanlarında otizm benzeri davranışlar çeşitli davranış testleri kullanılarak değerlendirilmektedir. Kriter A grubuna göre tanı koymak için sosyal iletişim bozukluklarının değerlendirilmesi aşağıdaki şekilde yapılabilir:

- Ultrasonik ses emisyonu (USV): Rodentler yaşamları süresince farklı sosyal durumlarda USV yayarlar. Negatif sosyal durumlarda düşük frekanslı USV tespit edilmektedir. USV insanlar tarafından duyulamaz fakat laboratuvar ortamında çalışılabilir (43).

- Sosyal oyun davranışı: Özellikle adölesan sıçanlar zamanlarının çoğunu akranlarıyla oynayarak geçirmektedir. Sosyal oyun spesifik davranışların frekans ve süresini ölçerek kolayca değerlendirilebilmektedir (43).

Kriter B grubuna göre tanı koymak için tekrarlayıcı ve stereotipik davranışların değerlendirilmesi aşağıdaki şekilde yapılabilir:

- Rodentler de insanlara benzer şekilde gösterdikleri stereotipik davranışlar ile değerlendirilebilirler. Yüksekçe sıçrama, dönme, kazma, tımar etme gibi davranışların açık alanda süre ve sıklıkları değerlendirilmektedir (43).
- Tekrarlayıcı ve saplantılı davranışlar, bilye gömme, T-labirent ve su labirenti testleri ile ölçülebilmektedir (43).
- Otistik hastalarda en fazla eşlik eden semptomlardan olan anksiyete, sıçan ve farelerde yükseltilmiş artı labirent ile değerlendirilmektedir. Açık alan testi stereotipik davranışların yanı sıra anksiyete davranışını da değerlendirmek için kullanılmaktadır. Depresif davranışları değerlendirmek için de zorlu yüzme testi kullanılmaktadır (46, 47).

2.3.3. Otizm Benzeri Davranışlar ve Sinaptik Proteinler

Otizm ile ilgili olarak pek çok gen hedef gösterilmesine rağmen henüz biyobelirteç olarak kullanılabilecek bir gen ya da genetik değişiklik bulunmamaktadır. Yapılan çalışmalarda NRXN, NLGN ve SHANK proteinlerinde meydana gelen bozulmaların otizm ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir.

NRXN ve NLGN, sırasıyla pre ve postsinaptik membranda bulunan, karşılıklı etkileşim halinde olup sinaps oluşumu ve olgunlaşmasını indükleyen transmembran proteinleridir (54). Bu proteinler eksitator glutamaterjik ve inhibitör GABAerjik sinapsların düzenlenmesinde görev alırlar (10). Glutamaterjik sinapslarda bulunan SHANK proteinleri, NLGN proteinine bağlanarak dendritik omurganın boyutu ve şeklini belirleyen postsinaptik iskelet (scaffolding) proteinleridir (10, 11). SHANK proteinlerinin akson terminalinde presinaptik alanda bulunması, bu proteinlerin sadece postsinaptik iskelet proteini görevinde olmadığı, aynı zamanda aksonal büyüme ile presinaptik gelişim ve fonksiyonunda önemli rolü olabileceğini göstermektedir (50). Son yıllarda yapılan çalışmalar ile NLGN3 ve SHANK3'te meydana gelen genetik bozuklukların otizm benzeri davranışlara neden olduğu gösterilmiştir (12, 55, 56). SHANK3

mutasyonlarının *de novo* özellikte olduğu düşünülmektedir. Genellikle çerçeve kayması (frameshift) ya da anlamsız (nonsense) mutasyonlar sonucu SHANK3 proteini olması gerektiği gibi sentezlenememektedir. Buna bağlı olarak dendritik ve sinaptik morfolojide bozulmalar ortaya çıkmaktadır (57).

NRXN-NLGN-SHANK yolağı, sinaptogenez dışında eksitator ve inhibitör akım arasındaki dengesizlikle de ilişkilidir. Bu yolağın, sinapsın nöronal aktiviteye yanıt verme sürecinin dengelenmesinde etkili olduğu düşünülmektedir (10). NLGN3, SHANK3 ve NRXN1 genlerindeki mutasyon ya da delesyon gibi genetik değişikliklerin, sinaptik fonksiyonda değişikliğe neden olmasına bağlı olarak OSB gelişebilir (10, 58). Bu nedenle sinaptik homeostazda meydana gelen anormallikler ya da sinaptik disfonksiyonun OSB için bir risk faktörü olabileceği düşünülmektedir.

2.4. Çinkonun Yapısı ve Metabolik İşlevleri

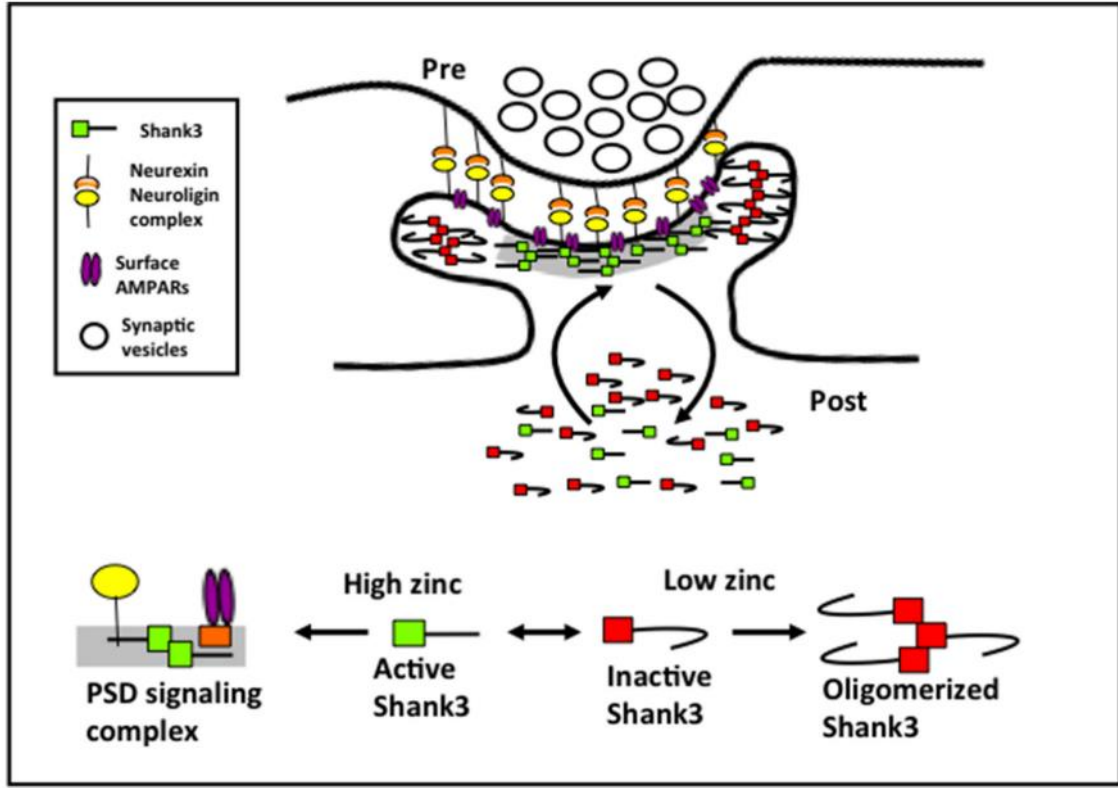
Çinko (Zn^{+2}), vücutta ikinci en çok bulunan iz element olup nükleik asit ve protein sentezi, hücre bölünmesi ve farklılaşması, doku gelişimi ve tamiri süreçlerinde önemli rol oynamaktadır. Çinko, beyinde eksitator nöron terminalindeki presinaptik veziküllerde glutamat ile birlikte depolanır ve postsinaptik membranda bulunan eksitator glutamat reseptörlerinin aktivitesini kontrol eder (13). Beyindeki çinko düzeyinin yüksek olmasının epileptogenezle, düşük olmasının depresyon ve OSB ile ilişkili bulunduğu çalışmalar vardır (59).

2.4.1. Çinkonun Merkezi Sinir Sistemi Üzerine Etkileri

Literatürde postsinaptik yoğunluktaki çinko ve SHANK proteinlerinin ilişkisini araştıran çeşitli araştırmalar yer almaktadır (60, 61). Çinkonun SHANK3 konsantrasyonunu arttırdığı ve postsinaptik yoğunluktaki SHANK3 uyarılmasının ardındaki mekanizmanın çinkonun SHANK-SHANK birliğinin güçlendirmesiyle postsinaptik yoğunluktaki SHANK3'ü stabilize etmesi olduğu düşünülmektedir (61). Çinko seviyeleri düşük olduğunda SHANK3'ün aktif olmadığı, aktive edilmiş SHANK3'ün sinaptik iletim sırasında veziküllerden veya hücre içi depolardan salınan çinko aracılığıyla postsinaptik yoğunluğa alınması mekanizma olarak ileri sürülmektedir (Şekil 1) (60).

Gelişmekte olan nöronların çinkoya duyarlı olduğu ve SHANK2 ve SHANK3'e bağımlılığı literatürde gösterilmiş olup, erken gelişim sırasında genetik mutasyonlar ve çevresel

etmenlerin OSB etiolojisinin altında yatan sinaptik olgunlaşmayı ve gelişimi bozabileceği düşünülmektedir (62).



Şekil 1. SHANK3 dinamikleri ve aktivasyon durumunun çinko-bağımlı düzenleme modeli (60).

Yapılan bir çalışma farelerde postsinaptik çinko azlığının, korteks, hipokampus, striatum ve serebellumda SHANK3 proteinlerinde azalma ile glutamat ve AMPA reseptörlerinde downregülasyona neden olduğunu göstermektedir. Bu yapı ve fonksiyon değişimlerinin farelerde OSB benzeri davranış anomalilerine neden olduğu belirtilmiş, çinko eksikliği ve çinko bağlayan SHANK proteinlerinin yeniden düzenlenmesinin otizm için risk faktörü olabileceğine dikkat çekilmiştir (16). OSB olan hastalarda çinko eksikliğinin, glutamaterjik sinapslardaki çinko bağlayan SHANK proteinlerinin değişimi aracılığıyla NRXN-NLGN-SHANK yolağının etkilenmesine neden olduğu bilinmektedir. Bir başka çalışmada prenatal çinko eksikliğinin farelerde artmış anksiyete ve sosyal davranış bozukluklarına neden olduğu görülmüştür. Çalışmadan OSB'ye genetik duyarlılığın olmadığı durumlarda da prenatal çinko eksikliğinin farelerde otizm spektrum bozukluğu benzeri davranışlara neden olabileceği sonucuna varılmıştır (17). Bir başka çalışmada SHANK3

22q13.3 delesyonu bulunan, otizm spektrum bozukluğu hastalıklarından Phelan McDermid Sendromu olan kişilerde plazma çinko düzeyleri düşük bulunmuştur (63).

Prenatal çinko takviyesinin otizme etkisinin değerlendirildiği çalışmalarda sıçanlarda lipopolisakkarit maruziyeti ile geliştirilmiş otizm modeli kullanılmıştır. Çalışmaların sonucu olarak prenatal çinko takviyesi sonrası yavrularda görülen otizm benzeri davranışların ortadan kaldırılabileceği gösterilmiş, çinkonun otizme karşı bir önlem olarak kullanılabileceği önerilmiştir (64, 65). Gram-negatif bakterilerin neden olduğu enfeksiyonları taklit eden lipopolisakkaritlere doğum öncesi maruziyetinin OSB benzeri davranışlara neden olduğu, prenatal lipopolisakkarit maruziyeti uygulanan sıçanların OSB modeli olarak kullanıldığı çalışmada yavrularda iletişim bozukluğu (ultrasonik vokalizasyon) ile plazmada beyin kökenli nörotrofik faktör (BDNF) düzeyinde artış saptanmıştır. Prenatal dönemde subkutan olarak 2 mg/kg dozundaki uygulanan çinko sülfat takviyesinin ise yavru sayısında artış sağlaması ile bozulmuş üreme performansını düzelttiği, iletişim bozukluğunu ve BDNF düzeylerindeki bozukluğu düzelttiği belirtilmiştir (65). Valproik asit ile indüklenmiş otizm modelinde de prenatal tek doz subkutan 2 mg/kg çinko uygulaması sonrası ultrasonik vokalizasyon, tekrarlı hareketler, sosyal oyun davranışı gibi OSB benzeri davranış bozukluklarının azaldığı belirtilmiştir (66).

Prenatal ve postnatal dönemdeki mineral dengesizliği, otizme neden olan çevresel etmenlerden biri olabilir. Bu alanda yapılan çalışmalarda OSB'li çocukların bir kısmında çinko düzeyi sağlıklı çocuklara göre düşük bulunmuştur (15, 67). OSB olan çocuklarda plazma çinko seviyeleri düşük bulunurken serum bakır seviyeleri yüksek bulunmuş, bu durumun gebelikte annenin ağır metallerle maruz kalmasından kaynaklanabileceği ve özellikle çinko eksikliği olan çocuklarda tedavi bileşeni olarak çinko kullanımının önemli olduğu belirtilmiştir (68). Çinko eksikliğinin pek çok beyin fonksiyonunu etkilediği ve nöronal olgunlaşmada meydana gelen bozulmalar ile birlikte öğrenme ve bellekte bozulma gibi şiddetli beyin disfonksiyonlarına neden olabileceğine dair pek çok çalışma bulunmaktadır. Çinkonun, otizm konusunda çevre ilişkisinin bir parçası olabileceği, maternal çinko eksikliğinin otizm için risk faktörü olabileceği ve otizmde bir biyobelirteç olarak çinkonun araştırılması gerektiği düşünülmektedir (14). Postnatal 8-22 gün arası çevresel etmen olarak hava kirliliği partiküllerine maruz bırakılan erkek sıçanlarda iletişim eksikliği, sosyal davranışta bozulma ve sosyal yenilikten kaçınma

davranışları ile birlikte SHANK3 ekspresyonunda downregülesyon ve nöroinflamasyonda artış görüldüğü için bu durumun OSB ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir (69).

Prenatal çinko takviyesinin maternal cıva maruziyetine karşı koruyucu olduğunu gösteren çalışmada, gebeliğin 6-9. günleri arasında intragastrik yolla günlük 1, 5 ve 10 mg/kg olmak üzere üç ayrı doz çinko sülfat uygulanmış, sonuç olarak uygun dozda çinkonun fetüs gelişimi ve büyümesi için faydalı olduğu belirtilmiştir (70).

Sıçan adipoz dokusu kökenli mezenkimal kök hücrelerin kullanıldığı bir çalışmada bir grup hücreye 21 gün boyunca günde 30 dk ELF EMA (50 Hz, 20 mT) uygulanmış, diğer gruba ise EMA ve çinko sülfat uygulanmıştır. EMA grubunda hücre çoğalması azalırken, çinko kontrol ve çinko-EMA gruplarında hücre çoğalmasının arttığı bulunmuş, ELF EMA'nın hücre büyümesi ve çoğalmasını etkileyebileceğine dikkat çekilmiştir (71). Elektromanyetik titreşimin erkek sıçanların serum element düzeylerine etkisinin değerlendirildiği çalışmada uygulanan dozların serum çinko düzeyini etkilemediği ancak daha uzun süre uygulamaların da değerlendirilmesi gerektiği belirtilmiştir (72).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Tipi

Araştırma deneysel bir çalışmadır.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Araştırma, Nisan 2018 – Haziran 2019 tarihleri arasında, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Deneysel Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi. Araştırmanın elektron mikroskopisi ile ilgili bölümü İzmir Biyotıp ve Genom Merkezi Elektron Mikroskopi Birimi'nde yapıldı.

3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi / Çalışma Grubu

Çalışma deney hayvanları ile gerçekleştirdiğinden araştırmanın evreni ve örneklemi yoktur.

3.4. Çalışma Materyali

Araştırmada Nisan 2018 – Haziran 2019 tarihleri arasında Fizyoloji Anabilim Dalı Deneysel Araştırmalar Birimi'nde bulunan 250-350 g ağırlığında yetişkin dişi Sprague-Dawley cinsi sıçanlardan doğan yavrular kullanıldı. Tüm hayvanlar standart koşullarda barındırıldı ve beslendi. Gebeliğin ilk gününden itibaren sıçanlar Kontrol grubu, Kontrol+Çinko grubu, EMA grubu ve EMA+Çinko grubu olmak üzere dört gruba ayrıldı.

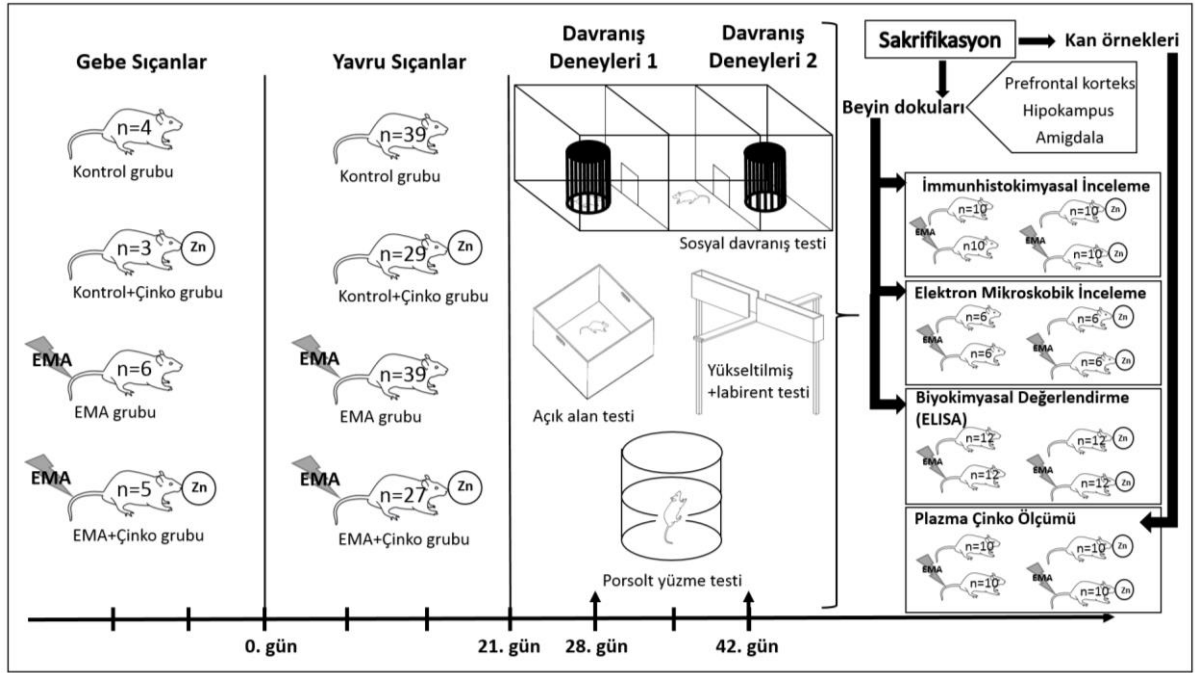
3.5. Araştırmanın Değişkenleri

Bağımlı değişkenler: Otizm benzeri davranışlar, NLGN3 ve SHANK3 sinaptik protein düzeyleri, çinko düzeyi.

Bağımsız değişkenler: EMA, cinsiyet.

3.6. Veri Toplama Araçları

Çalışmada kullanılan yöntemlerin akış şeması Şekil 2'de gösterilmiştir.



Şekil 2. Çalışmada kullanılan yöntemlerin akış şeması

3.6.1. Çalışma Grupları

Gebe bırakılacak dişilerden alınan vajinal smear örnekleri incelendi ve östrus dönemindeki dişiler erkek sıçanlar ile çiftleştirildi.

Çalışmada kullanılan gebe sıçanlar dört gruba ayrıldı:

1. grup: Kontrol grubu (n=4).
2. grup: EMA grubu (n=6). Haftada 5 gün, günde 4 saat EMA maruziyeti uygulandı.
3. grup: Kontrol+Çinko grubu (n=3). Haftada 5 gün, 5 mg/kg/gün dozunda çinko desteği intragastrik gavaj yoluyla uygulandı.
4. grup: EMA+Çinko grubu (n=5). Haftada 5 gün, günde 4 saat EMA maruziyeti ve maruziyet süresince 5 mg/kg/gün dozunda çinko desteği intragastrik gavaj yoluyla uygulandı.

3.6.2. EMA Oluşturulması

EMA oluşturmak için 50 Hz frekanslı alternatif akım ile 3 mT EMA meydana getiren Helmholtz bobin sistemi kullanıldı. EMA'nın şiddeti bir transformatör ve teslametre (FW Bell, 5170) aracılığıyla kontrol edildi. EMA sistemi, birbirinden 33 cm aralıklı yerleştirilen 95 cm çaplı iki bakır bobin ile oluşturuldu. Bobinler ahşap bir çerçeveye monte edilen 320 sarımlı, 2,5 mm çaplı bakır tellerden oluşturuldu. Sıçan kafesleri bobinlerin arasına yerleştirildi. Kullanılan

sistem, günlük yaşantımızda maruz kaldığımız 50 Hz frekanslı akım oluşturmaktadır. Helmholtz bobin sisteminin özelliği akım dalgalarının sadece bobin merkezinde oluşması dışarıya yayılmamasıdır, bu nedenle ek önlem alınmasını da gerektirmemektedir (73-75).

EMA ve EMA+Çinko gruplarındaki sıçanlar haftada 5 gün, günde 4 saat boyunca 3 mT EMA'ya maruz bırakıldı. Maruz kalma süresince tüm sıçanlar plastik kafeslere yerleştirildi. Kontrol ve kontrol+Çinko grubundaki sıçanlar aynı ortamda tutuldu fakat EMA uygulanmadı (73). EMA maruziyeti, gebeliğin ilk gününde başlatılıp postnatal 28. güne kadar sürdürüldü.

3.6.3. Çinko Desteği

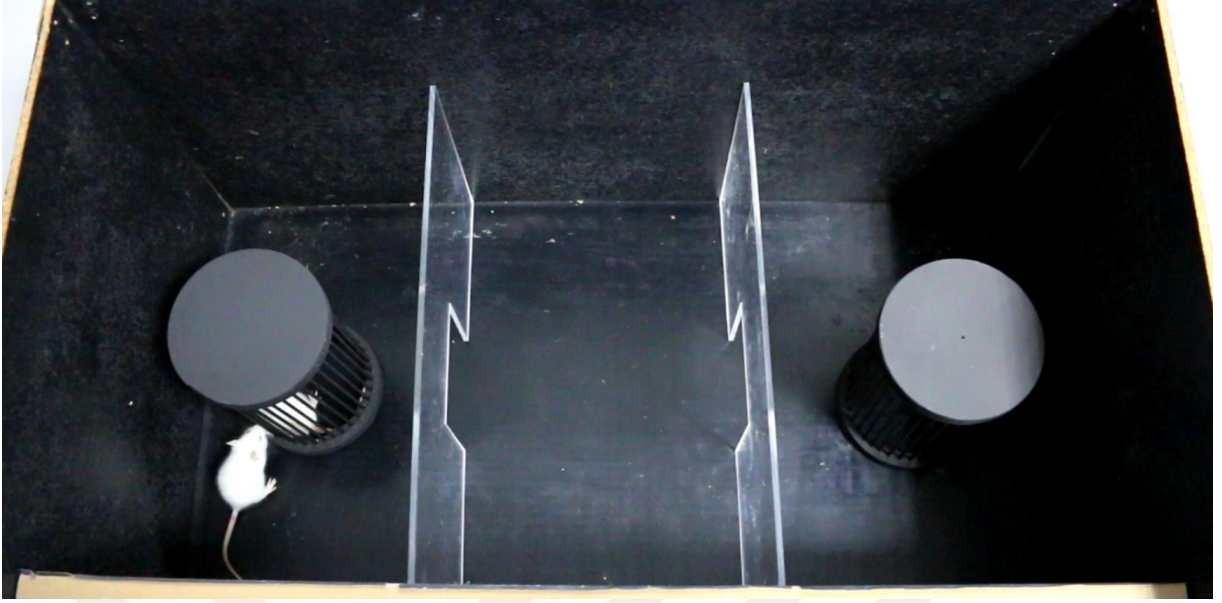
Gebe sıçanlara EMA maruziyeti süresince distile suda çözülen 5 mg/kg/gün dozunda çinko desteği, intragastrik gavaj yoluyla uygulandı (ZnSO₄, Sigma Z0635) (70). Kontrol+Çinko grubu ve EMA+Çinko grubuna gebelik süresince (22-25 gün) haftada 5 gün çinko desteği uygulanırken kontrol ve EMA gruplarına uygulanmadı. Doğumdan sonra çinko uygulamasına devam edilmedi.

3.6.4. Davranış Deneyleri

Doğumdan sonra postnatal 28. ve 42. günlerde (erken ve geç adölesan dönem) davranış testleri uygulandı.

3.6.4.1. Sosyal Davranış Testi

Sosyal davranış testi, rodentlerde sosyalleşme ve sosyal kaçınma eğilimlerinin değerlendirilmesini sağladığı için OSB ve nörogelişimsel bozuklar ile ilgili çalışmalarda kullanılmaktadır (76). Bu deney için, üç bölmesi bulunan, pleksiglas ile ayrılmış bölmeler arasında 12x12 cm'lik kapıdan geçiş sağlanabilen 90x45x25 cm boyutlarındaki kutu sistemi kullanıldı (şekil 3). Teste başlamadan önce deneğe geçişler kapalı olarak orta bölmede 5 dk alıştırma uygulandı. Daha sonra bölmelerden birine aynı cinsiyet ve yaşta yabancı bir sıçan 15x22 cm çap ve yüksekliğindeki metal bir kafes içerisinde konulurken diğer bölmedeki kafes boş bırakıldı. Alıştırma süresince kapalı duran bölmeler açıldıktan sonra test başlatıldı ve 10 dk süreyle kayıt edildi. Test sonunda her deneğin üç bölmede geçirdiği süreler ile bölmelere girip çıkma sayılarının Noldus Ethovision XT yazılımı ile analizi yapıldı. Her test sonunda alan % 70'lik alkol ile temizlendi.



Şekil 3. Sosyal davranış testi düzeneği.

3.6.4.2. Açık Alan Testi

Tüm sıçanlara lokomotor aktivite ve anksiyete davranışının test edilmesi amacıyla açık alan testi yapıldı. Test uygulanan hayvan 35 lükslük bir ışık kaynağı ile aydınlatılmış, 1x1 metrelik bir alanın tam ortasına konup 5 dakikalık test süresince alan içindeki, hareketleri kaydedilerek analiz edildi. Zemin 16 kareye bölünmüştür (12'si kenarlarda (%75), 4'ü merkezde (%25)). Test sonunda her deneğin test alanının kenarlarında ve ortasında geçirdiği süreler ile toplam kat edilen mesafe Noldus Ethovision XT yazılımı ile kaydedildi ve analizi yapıldı. Her test sonunda alan % 70'lik alkol ile temizlendi.

3.6.4.3. Yükseltilmiş Artı (+) Labirent Testi

Anksiyete davranışının değerlendirilmesi amacıyla yükseltilmiş artı labirent testi yapıldı. Merkezi bir platform alanı (10x10 cm) ile iki açık (50 cm uzunluğunda, 10 cm genişliğinde ve 0,5 cm kenar yüksekliğinde) ve iki kapalı (açık kollar ile aynı ölçüde, yalnız kenar yüksekliği 40 cm) koldan meydana gelen labirent kullanıldı. Labirentin yerden yüksekliği 50 cm'dir. Sıçanlar yüzleri açık kollara dönük olacak şekilde platforma yerleştirildi ve 5 dk süreyle kayıt sistemiyle izlendi ve analiz gerçekleştirildi (Noldus Ethovision XT). Sıçanların açık ve kapalı kollara girme sayısı ile kollarda ve merkezde geçirdiği süreler ölçüldü. Her test sonunda alan % 70'lik alkol ile temizlendi.

3.6.4.4. Zorlu Yüzme (Porsolt) Testi

Depresyon düzeyinin değerlendirilmesi için zorlu yüzme testi kullanıldı. Test için sıçanlar tek tek içi su dolu bir silindire yerleştirildi (50 cm yükseklik, 30 cm çapında). Su seviyesi sıçanların dışarıya atlayamayacağı, en fazla kuyruğu ve tek ayağının tabana değmesine izin verilecek şekilde ayarlandı (20-25 cm). Sıçanların davranışları 5 dk süreyle Noldus Ethovision XT video kayıt sistemi ile izlendi ve analiz edildi. Analiz için sıçanların toplam hareket mesafesi, hareketli ve hareketsiz durma süresi ile sayıları ölçüldü.

3.6.5. Sakrifikasyon ve Dokuların Ayrılması

Davranış testlerinin tamamlanmasının ardından tüm sıçanlar hafif eter anestezisi altında sakrifiye edildi ve kan alımını takiben beyin dokusu hızla çıkarıldı. Buzla soğutulmuş ortamda bilişsel fonksiyonlar ve sosyal davranışlarla ilişkili beyin bölgeleri olan prefrontal korteks, hipokampus ve amigdala bölgeleri disseke edildi. Her gruptaki yavruların yarısının dokuları ELISA ölçümü ve immunhistokimyasal incelemeler için diğer yarısının dokuları elektron mikroskopik değerlendirme için kullanılmak üzere ayrıldı.

3.6.6. Biyokimyasal Değerlendirme

Sinaptik bağlantıları değerlendirmek için sinaptik adezyon proteinlerinden NLGN3 ve SHANK3'ün doku seviyeleri ELISA yöntemiyle ölçüldü. Bu amaçla prefrontal korteks, hipokampus ve amigdala örneklerine sırasıyla 1:10, 1:20 ve 1:30 oranında PBS eklenerek buz üzerinde ultrasonik homojenizatör yardımıyla homojenize edildi. Homojenatlar 3000 rpm'de 20 dk santrifüjlendikten sonra kullanılmak üzere süpernatantlar ayrıldı.

Sakrifikasyon sırasında alınan kanlar EDTA'lı tüplerde toplandı. Örnekler 3500 rpm'de 15 dk santrifüjlendikten sonra çinko ölçümünde kullanılmak üzere plazma kısmı ayrıldı.

3.6.6.1. NLGN3 ve SHANK3 Ölçümleri

Neuroligin 3 ve SHANK3 seviyeleri, Rat SH3 and Multiple Ankyrin Repeat Domains Protein 3 (SHANK3) ELISA Kit (MBS9905957, MyBioSource) ve Rat Neuroligin 3 (NLGN3) ELISA Kit (MBS9341396, MyBioSource) kullanılarak ölçüldü. Duyarlılığı 1,0 ng/mL, ölçüm aralığı 3,12 ng/mL – 100 ng/mL olan kitler protokol doğrultusunda uygulandı:

- Standart ve örnekler kuyucuklara 50'şer µL pipetlendi.

- K r hariç tüm kuyucuklara 100'er  L HRP konjugat solüsyonu eklendi ve kapatıcı film ile kaplanan plak 37 C'de 1 saat bekletildi.
- Kuyucuklar 300'er  L yıkama solüsyonu ile dört kez yıkandı.
- Kuyucuklara önce 50' er  L Kromojen A solüsyonu, ardından 50' er  L Kromojen B solüsyonu ekledi ve plak kapatıcı film ile kaplanıp 37 C'de 15 dk bekletildi.
- Kuyucuklara 50' er  L stop solüsyonu eklendi.
- Absorbanslar spektrofotometrik plak okuyucuda 450 nm'de ölçüldü. Tüm değerlerden k r absorbans değeri çıkarıldı.

Sonuçlar, konsantrasyonları 3,12 ng/mL, 6,25 ng/mL, 12,5 ng/mL, 25 ng/mL, 50 ng/mL ve 100 ng/mL olan standartlar kullanılarak oluşturulan standart grafiği yardımı ile hesaplandı.

3.6.6.2. Çinko  l  m 

Plazma  inko düzeyi ölçümü için Zinc Colorimetric Assay Kit (K387, BioVision) kullanıldı ve kit protokolü doğrultusunda uygulandı:

- Standartlar ve örnekler kuyucuklara 50' er  L pipetlendi.
- Kuyucuklara 200'er  L çinko reaksiyon karışımı eklendi ve oda sıcaklığında 10 dk bekletildi.
- Absorbanslar spektrofotometrik plak okuyucuda 450 nm'de ölçüldü. Tüm değerlerden k r absorbans değeri çıkarıldı.

Sonuçlar, konsantrasyonları 1 nmol/kuyucuk, 2 nmol/kuyucuk, 3 nmol/kuyucuk, 4 nmol/kuyucuk ve 5 nmol/kuyucuk olan standartlar kullanılarak oluşturulan standart grafiği yardımı ile hesaplandı.

3.6.6.3. Total Protein  l  m 

Prefrontal korteks, hipokampus ve amigdala s pernatanlarında total protein ölçümü için Pierce BCA Protein Assay Kit (23227, Thermo Scientific) kullanıldı. Kit, protokol doğrultusunda uygulandı:

- Solüsyon A ve B 50:1 oranında karıştırılarak çalışma solüsyonu hazırlandı.
- Standart ve örneklerden 25'er  L kuyucuklara aktarıldı.
-  zerine 200  L çalışma solüsyonu eklendi, plak kapatıcı film ile kapatılıp ve 37  C'de 30 dk bekletildi.
- Absorbanslar 562 nm'de ölçüldü.

Sonuçlar 20-2000 µg/mL arasında hazırlanan standartlar kullanılarak oluşturulan standart grafiği yardımıyla hesaplandı.

3.6.7. Histolojik İncelemeler

Sinaptik adezyon proteinlerinin davranışla ilişkili beyin bölgelerindeki immunreaktivitelerini göstermek için immunhistokimyasal inceleme yapıldı. Bu amaçla rat spesifik NLGN3 ve SHANK3 antikorları kullanıldı. İmmunhistokimyasal yöntemle boyanan parafin kesitlerde antikor reaktiviteleri ışık mikroskopik görüntüleme sistemi ile değerlendirildi ve semikantitatif olarak skorlandı.

3.6.7.1. Doku Takibi

Alınan dokular oda sıcaklığında %10'luk tamponlu formalin içerisinde 48 saat tespit edilerek rutin doku takibinin ardından parafin içine gömülerek bloklandı (Tablo 2). Mikrotom yardımı ile (Finesse ME +, Thermo Scientific) beyin dokularından alınan 5 µm kalınlığındaki kesitler lizinli lamlara yerleştirildi.

Tablo 2. Rutin doku takibi protokolü.

İşlem	Kimyasal	Süre
Fiksasyon	%10'luk formalin	48 saat
Fiksatiften uzaklaştırma	Akarsu	1 gece
Dehidratasyon	%70-80-96'lık etil alkol serisi	20'şer dk
Postfiksasyon	Aseton I-II-III-IV	20'şer dk
Şeffaflaştırma	Ksilol I-II	30'ar dk
60°C'lik etüvde erimiş parafin	Parafin I-II	1'er saat
Bloklama	Sert parafin	

3.6.7.2. Krezil Viyole ile Boyama

Nöronların Nissl granüllerinin boyanması amacıyla gerçekleştirilmiştir (Tablo 3).

Tablo 3. Krezil viyole ile boyama protokolü

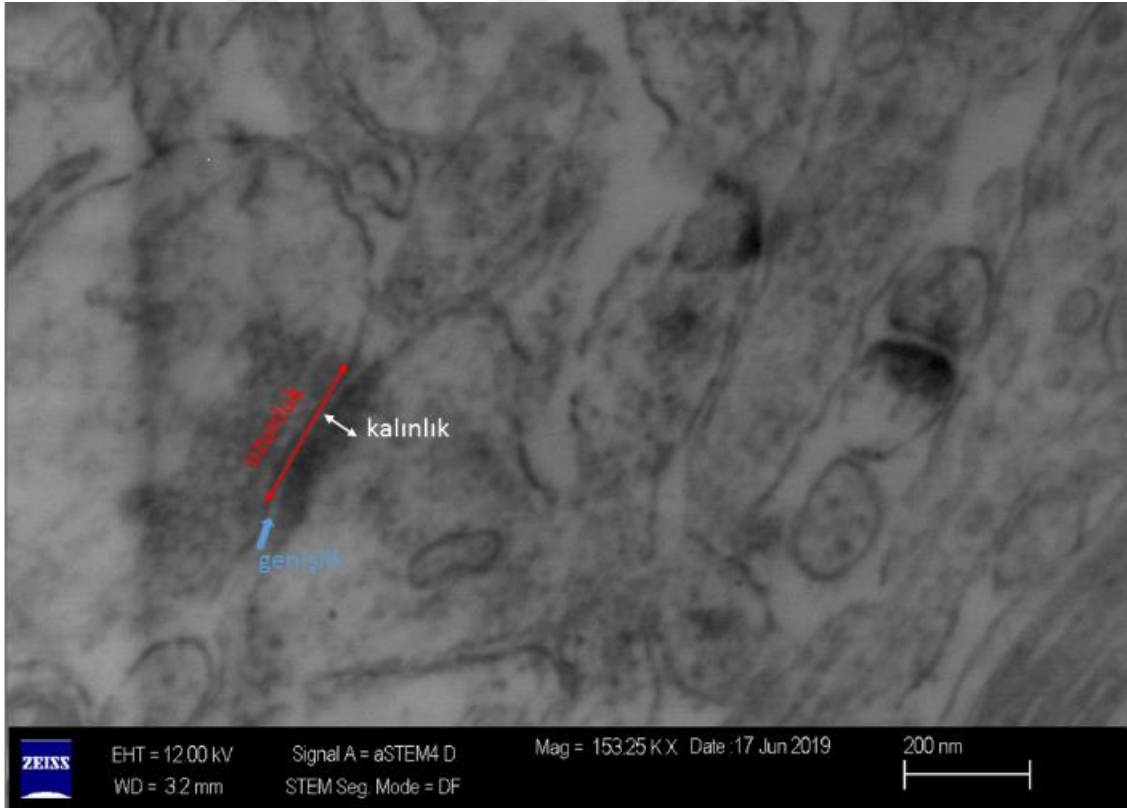
İşlem	Kimyasal	Süre
Deparafinizasyon	60°C etüvde	1 gece
Deparafinizasyon	Ksilol I (etüvde)	20 dk
Deparafinizasyon	Ksilol II-III (oda sıcaklığında)	10'ar dk
Rehidratasyon	%100-96-80-70'lik etil alkol serisi	Çalkalama
Yıkama	Distile su	5 dk
Boyama	Boyama solüsyonu	30 dk
Yıkama	%70-96'lık etil alkol serisi	Çalkalama
Şeffaflaştırma	Ksilol I-II-III	20'şer dk
Kapama	Entellan	

3.6.7.3. İmmunhistokimyasal İnceleme

Kesitler 1 gece 60°C etüvde bekletildi. Kesitlere üç değişim ksilol ile deparafinizasyon işlemi uygulandı. Azalan derecede alkol serileri ile rehidratasyonu sağlanan kesitler distile suda 5 dakika bekletildikten sonra Proteinaz K solüsyonu (Digest-All 4, Life Technologies) içinde 15 dakika tutuldu. Daha sonra doku endojen peroksidazını inhibe etmek amacıyla 5 dk %3'lük hidrojen peroksit uygulandı. Kesitler 3 defa 5'er dakika fosfat tampon solüsyonu ile yıkandıktan sonra 20 dk oda sıcaklığında bloklama solüsyonu (Histostain Plus Broad Spectrum, Life Technologies) ile inkübe edildi. Ardından rat spesifik anti-NLGN3 (1:200, Bioss Antibodies) ve SHANK3 (1:300, Bioss Antibodies) antikorları ile 1 gece 4°C'de bekletildi. Ertesi gün fosfatlı tampon solüsyonu ile 3 defa yıkanan kesitler biyotinlenmiş sekonder antikor solüsyonu (Histostain Plus Broad Spectrum, Life Technologies) eklenerek 30 dk bekletildi. Sekonder antikor enzimle işaretli (peroksidaz) avidin-biyotin kompleksi (streptavidin) solüsyonu (Histostain Plus Broad Spectrum, Life Technologies) ile bağlandıktan sonra antikor-biyotin-avidin-peroksidaz kompleksi %0.02 Diaminobenzidin (DAB) kullanılarak görünür hale getirildi. Mayer's hematoxilen ile zemin boyaması yapıldı. Kesitler, dereceli alkollerde dehidratasyon ve ksilol ile şeffaflaştırma işlemlerinden sonra entellan ile kapatıldı. Boyanan parafin kesitlerde antikor reaktiviteleri ışık mikroskopik görüntüleme sistemi ile değerlendirildi (Olympus CX-41, Olympus DP21) ve semikantitatif olarak skorlandı.

3.6.8. Elektron Mikroskopik İnceleme

Elektron mikroskopik inceleme ile amigdala bölgesindeki sinapsların ultrasükrüktürel yapısı değerlendirildi. Dokular fosfat tamponlu %2,5'lük gluteraldehit ve %4'lük paraformaldehit içeren fiksatife alındı. Dokular Sorensen's Fosfat Tamponu ile 3-4 kez değiştirilerek yıkandı. %2'lik osmium tetraoksit solüsyonu ile gerçekleştirilen postfiksasyon aşamasından sonra yıkanan dokular, %2'lik uranil asetatta bekletilerek kontrastlama gerçekleştirildi. Dokular distile su ile 3-4 kez yıkandıktan sonra artan derecelerdeki alkol serisinden geçirilerek dehidrate edildi. Propilen oksitte bekletilen dokular sırasıyla 1:1 ve 1:2 oranında hazırlanan propilen oksit:epon karışımında bekletildi. Saf eponda bekletilen dokular epon içine gömülerek 65°C etüvde polimerizasyon için 48 saat bekletildi. Bloklardan yarı ince kesitleri alınarak (Leica UC EM7) toluidin mavisiyle boyanıp alan belirlendi. Belirlenen alanlardan alanlardan alınan ince kesitler formvar kaplı gridler üzerine aktarıldı. Kesitler elektron mikroskopunda (Zeiss Sigma 500) değerlendirildi. Sinaps ultrasükrüktürel yapısının değerlendirmesi için sinaptik aralık genişliği, post-sinaptik membran kalınlığı ve aktif zon uzunluğu ölçüldü (Şekil 4 ve Şekil 5).



Şekil 4. Elektron mikroskopik incelemede değerlendirilen özellikler.



Şekil 5. Elektron mikroskopik inceleme örneği.

Araştırmada kullanılan cihazlar Tablo 4’te belirtilmiştir.

Tablo 4. Araştırmada kullanılan cihaz listesi.

Adı/Modeli	Projede Kullanım Amacı
Soğutmalı santrifüj cihazı (Hettich, Mikro 200R)	Deneylerdeki çöktürme işlemleri
Vorteks (IKA VF2)	Deneylerdeki karıştırma işlemleri
Buzdolabı	Örnek, kimyasal ve kitlerin saklanması
Derin dondurucu (-80°C)	Örneklerin saklanması
Helmholtz bobin sistemi	EMA oluşturulması
Teslametre (FW Bell, 5170)	EMA oluşturulması
Noldus Ethovision XT video tracking sistemi	Davranış testleri
Terazi (Kern EMB 1200-1)	Hayvan tartımı
Hassas terazi (Kern ABS 220-4)	Doku ve kimyasal tartma işlemleri
Ultrasonik Homojenizatör (Bandelin Sonopuls)	Homojenat hazırlanması
Spektrofotometrik Plak Okuyucu (BioTek ELx800)	ELISA
İnkübatör (J P Selecta)	İmmunhistokimyasal inceleme
Mikrotom (Finesse ME +, Thermo Scientific)	İmmunhistokimyasal inceleme
Işık mikroskobu (Olympus CX41RF)	İmmunhistokimyasal inceleme
Ultramikrotom (Leica UC EM7)	Elektron mikroskopik inceleme
Elektron Mikroskobu (Zeiss Sigma 500)	Elektron mikroskopik inceleme

3.7. Araştırma Planı ve Takvimi

Projelendirme	Haziran 2017 – Eylöl 2017
Etik Kurul Onayı	Eylöl 2017 – Aralık 2017
BAP Proje Girişi ve Kabulöl	Haziran 2018 – Kasım 2018
Malzeme Temini	Mart 2019 – Haziran 2019
Hayvan Deneyleri	Nisan 2018 – Haziran 2019
Elektron Mikroskopik İncelemeler	şubat 2019 – Haziran 2019
Histolojik İncelemeler	Nisan 2019 – Haziran 2019
Biyokimyasal Değerlendirmeler	Mayıs 2019 – Haziran 2019
İstatistiksel Analiz ve Tez Yazımı	Mayıs 2019 – Haziran 2019

3.8. Verilerin Değerlendirilmesi

Tüm veriler ortalama +/- standart hata şeklinde sunuldu. Grup ortalamaları arasındaki farklar SPSS 22.0 programı ile One-way ANOVA Post-hoc Bonferroni testi ile değerlendirildi. İkili grup karşılaştırmaları bağımlı gruplarda t-testi uygulanarak yapıldı. $p < 0.05$ anlamlılık düzeyi esas alındı.

3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları

Malzeme temininde yaşanan kısıtlılıklar ve süre kısıtlılığı nedeniyle yapılması planlanan PCR deneyleri geręekleřtirilememiřtir.

3.10. Etik Kurul Onayı

Araştırma Dokuz Eylöl Üniversitesi Tıp Faköltesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu tarafından 14.12.2017 tarih ve 26/2017 numaralı karar ile etik açıdan uygun bulunmuştur (EK-1).

4. BULGULAR

Gruplardaki dişi ve erkek yavruların dağılımı Tablo 5'te gösterilmiştir.

Tablo 5. Gruplardaki dişi ve erkek yavru sayıları.

Grup	Kontrol	EMA	Kontrol+Çinko	EMA+Çinko
Dişi (n)	13	17	18	13
Erkek (n)	26	22	11	14
Toplam	39	39	29	27

4.1. Davranış Deneyleri

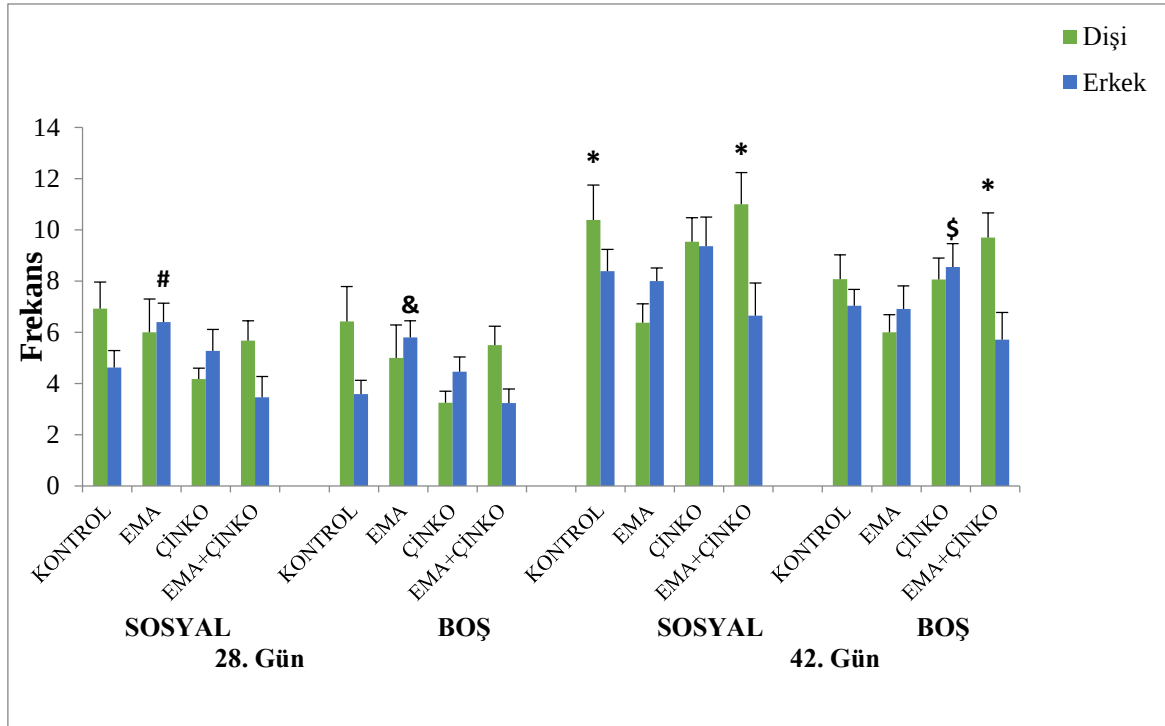
4.1.1. Sosyal Davranış Testi Sonuçları

Tüm grupların sosyal ve boş alanlara girme sayıları karşılaştırıldığında kontrol erkek grubu ($p=0,003$ ve $p=0,007$) ve çinko dişi grubunda ($p=0,020$ ve $p=0,005$) 28 ve 42. günlerde sosyal alana girme sayıları anlamlı olarak yüksek bulundu. Tüm grupların sosyal ve boş alanda geçirdikleri süreler karşılaştırıldığında kontrol dişi grubunun sadece 28. günde sosyal alanda daha fazla vakit geçirdiği belirlendi ($p=0,048$). Alanlarda geçirilen süreler 42. gün incelendiğinde kontrol erkek grubunun ($p=0,007$) ve EMA dişi grubunun ($p=0,035$) sosyal alanda anlamlı olarak daha fazla vakit geçirdiği görüldü. Her iki deney gününde de sosyal alanda daha fazla vakit geçiren gruplar EMA erkek grubu ($p=0,001$ ve $p=0,038$), çinko dişi grubu ($p=0,00$ ve $p=0,003$), çinko erkek grubu ($p=0,001$ ve $p=0,018$) ve EMA+Çinko dişi grubu ($p=0,027$ ve $p=0,002$) olarak saptandı.

Sonuç olarak, alanlara girme sayısı dikkate alındığında kontrol erkek ve çinko dişi grupları her iki ölçüm gününde de normal sosyal davranış gösterirken diğer gruplarda bu görülmedi. Alanlarda geçirilen süreler incelendiğinde ise kontrol dişi grubunun 28. günde, kontrol erkek ve EMA dişi gruplarının 42. günde, EMA erkek, çinko dişi, çinko erkek ve EMA+Çinko dişi gruplarının her iki günde de normal sosyal davranış sergilediği bulundu. EMA+Çinko erkek grubunda hiçbir anlamlı fark bulunmadığından sosyal davranışın bozulduğu görüldü.

Sosyal alana giriş sayıları 28. gün değerlendirildiği zaman dişilerde gruplar arasında anlamlı farklılık oluşmadığı gözlemlendi ($p>0.05$). Dişi kontrol ve EMA+Çinko gruplarının 42.

günde EMA grubuna göre sosyal alana anlamlı olarak daha fazla sayıda giriş yaptıkları gözlemlendi ($p=0.036$ ve $p=0.016$). EMA+Çinko grubunun 42. günde EMA grubuna göre boş alana daha fazla giriş yaptığı gözlemlendi ($p=0.015$). Erkeklerde 28. gün EMA grubunun EMA+Çinko grubuna göre sosyal alana anlamlı olarak daha fazla sayıda giriş yaptığı gözlemlendi ($p=0.020$). Boş alana ise EMA grubunun kontrol ve EMA+Çinko gruplarına göre anlamlı olarak daha fazla sayıda giriş yaptığı gözlemlendi ($p=0.012$ ve $p=0.010$). Erkeklerde 42. günde çinko grubunun EMA+Çinko grubuna göre boş alana anlamlı olarak daha fazla sayıda giriş yaptığı gözlemlendi ($p=0.040$) (Şekil 6).



Şekil 6. Sosyal ve boş alanlara giriş sayısı (frekans).

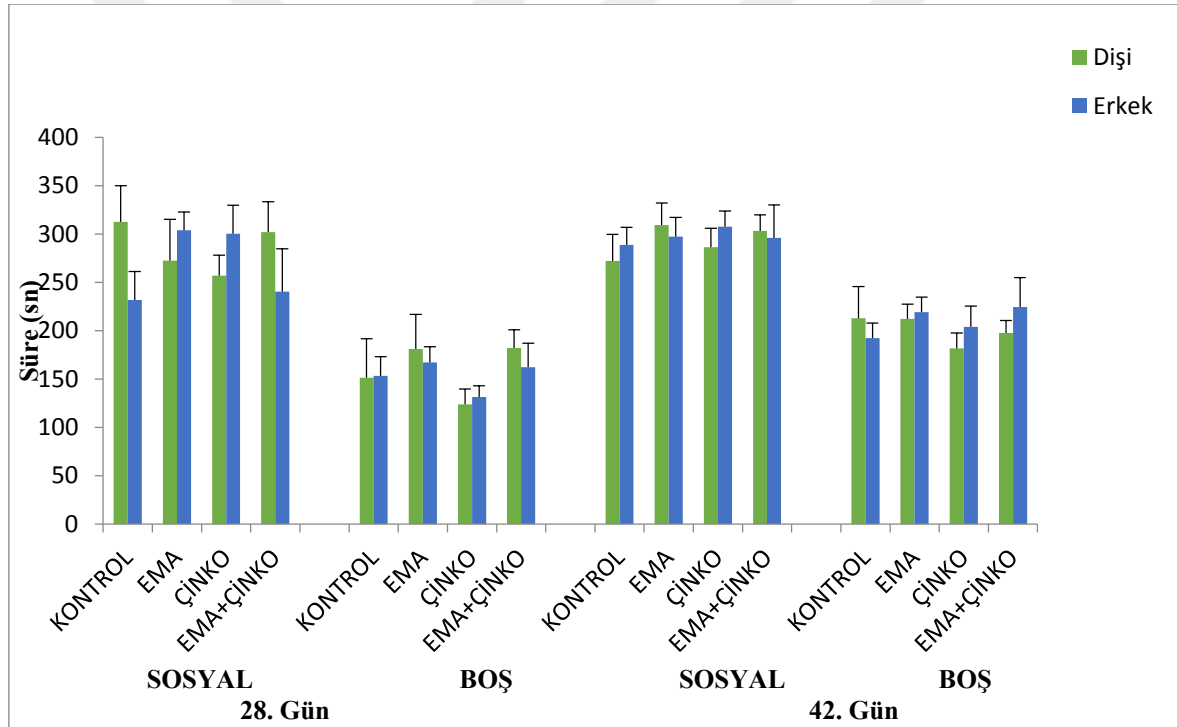
(*Dişi EMA grubuna göre anlamlı olarak farklı ($p<0.05$), #Erkek EMA+Çinko grubuna göre anlamlı olarak farklı ($p<0.05$), &Erkek Kontrol ve EMA+Çinko gruplarına göre anlamlı olarak farklı ($p<0.05$), \$Erkek EMA+Çinko grubuna göre anlamlı olarak farklı ($p<0.05$))

Dişi ve erkek grupları karşılaştırıldığı zaman 28. gün dişi kontrol grubunun erkek kontrol grubuna göre sosyal alana anlamlı olarak daha fazla sayıda giriş yaptığı gözlemlendi ($p=0.027$). Kontrol dişi grubunun 28. günde erkek kontrol grubuna göre ($p=0.004$), dişi EMA+Çinko grubunun erkek EMA+Çinko grubuna göre ($p=0.041$) boş alana anlamlı olarak daha fazla sayıda giriş yaptıkları gözlemlendi. Dişi EMA+Çinko grubunun 42. günde erkek

EMA+Çinko grubuna göre sosyal alana anlamlı olarak daha fazla sayıda giriş yaptığı gözlemlendi ($p=0.006$). Dişi EMA+Çinko grubunun 42. günde erkek EMA+Çinko grubuna göre boş alana anlamlı olarak daha fazla sayıda giriş yaptığı gözlemlendi ($p=0.002$).

Grupların 28 ve 42. günlerdeki alanlara giriş sayıları karşılaştırıldığı zaman kontrol dişi grubunun sadece sosyal alana giriş sayısında anlamlı artış saptandı ($p=0.008$). Kontrol erkek grubu ($p=0.001$ ve $p=0.001$), çinko dişi grubu ($p=0.000$ ve $p=0.000$), çinko erkek grubu ($p=0.002$ ve $p=0.001$), EMA+Çinko dişi grubu ($p=0.004$ ve $p=0.006$) ve EMA+Çinko erkek grubunda ($p=0.008$ ve $p=0.005$) sosyal ve boş alanlara giriş sayısında anlamlı artış bulundu.

Sosyal ve boş alanlarda geçirilen süreler karşılaştırıldığında dişi ve erkeklerde gruplar arasında anlamlı farklılık oluşmadığı gözlemlendi ($p>0.05$) (Şekil 7).

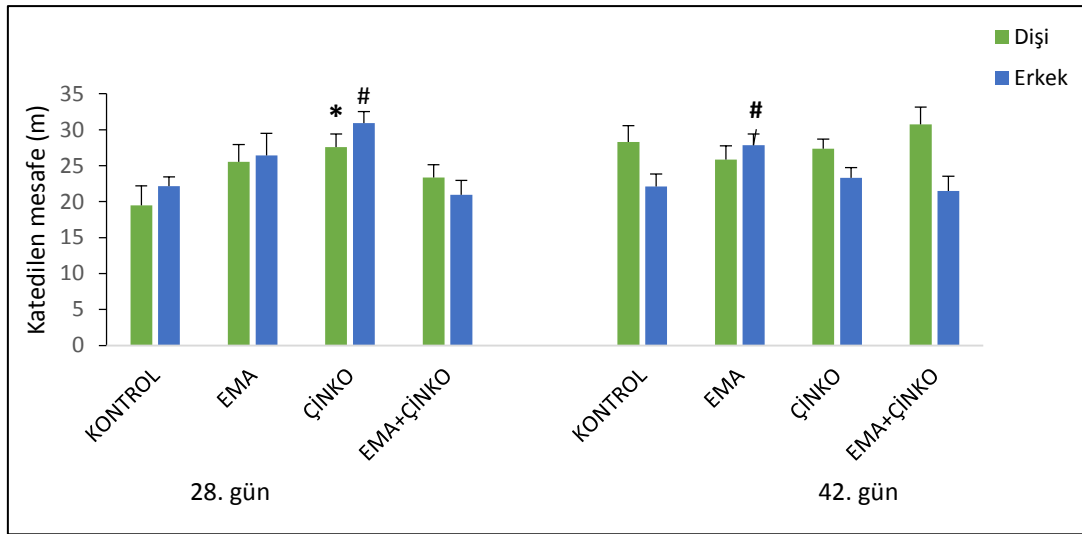


Şekil 7. Sosyal ve boş alanlarda geçirilen süreler (sn).

Alanlarda geçirilen süre bakımından 28 ve 42. günler karşılaştırıldığı zaman, EMA erkek grubunda ($p=0.023$), çinko dişi grubu ($p=0.031$) ve çinko erkek grubunda (0.015) boş alanda geçirilen süre 42. günde anlamlı olarak yüksek bulundu.

4.1.2. Açık Alan Testi Sonuçları

Açık alanda katedilen mesafeler değerlendirildiğinde, 28. gün katedilen mesafede dişi ve erkek gruplarında anlamlı fark olduğu gözlemlendi ($p<0.05$). Dişi çinko grubunun kontrol grubuna göre daha fazla mesafe katettiği gözlemlendi ($p=0.009$). Erkek çinko grubunun da kontrol grubuna göre daha fazla mesafe katettiği gözlemlendi ($p=0.002$). Dişi gruplarında 42. günde anlamlı fark oluşmadığı gözlemlendi ($p>0.05$). Erkek EMA grubunun 42. günde kontrol grubuna göre daha fazla mesafe katettiği gözlemlendi ($p=0.029$) (Şekil 8).



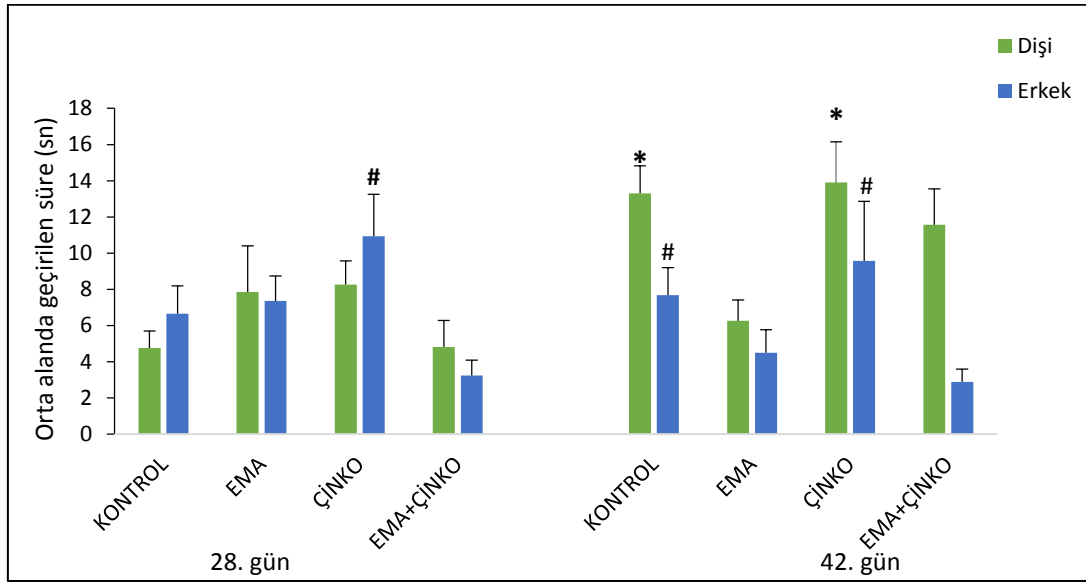
Şekil 8. Açık alan testinde toplam katedilen mesafe.

(*Dişi Kontrol grubuna göre anlamlı olarak farklı ($p<0.05$); #Erkek Kontrol grubuna göre anlamlı olarak farklı ($p<0.05$))

Dişi ve erkek grupları karşılaştırıldığı zaman 28. gün katedilen mesafede dişi ve erkek grupları arasında anlamlı fark oluşmadığı gözlemlendi ($p>0.05$). Dişi ve erkek kontrol grupları ($p=0.015$) ve dişi ve erkek EMA+Çinko grupları arasında 42. günde anlamlı fark bulundu ($p=0.001$). Dişi kontroller ve dişi EMA+Çinko grubu erkeklere göre daha fazla mesafe katettiler.

Katedilen mesafe açısından 28 ve 42. günler karşılaştırıldığı zaman, dişi EMA+Çinko grupları arasında ($p=0.039$) ve erkek çinko grupları arasında ($p=0.001$) anlamlı fark bulundu. Dişi EMA+Çinko grubu 42. günde daha fazla mesafe katetti. Erkek çinko grubu 28. güne göre daha az mesafe katetti.

Orta alanda geçirilen süreler değerlendirildiğinde, 28. gün dişi grupları arasında anlamlı fark oluşmadığı gözlemlendi ($p>0.05$). Erkek Çinko grubunun EMA+Çinko grubuna göre 28. günde orta alanda daha fazla süre geçirdiği gözlemlendi ($p=0.004$). Dişi kontrol ve çinko gruplarının 42. günde EMA grubuna göre orta alanda anlamlı olarak daha fazla süre geçirdiği gözlemlendi ($p=0.029$ ve $p=0.014$). Erkek kontrol ve çinko gruplarının 42. günde EMA+Çinko grubuna göre orta alanda anlamlı olarak daha fazla süre geçirdiği gözlemlendi ($p=0.039$ ve $p=0.019$) (Şekil 9).



Şekil 9. Açık alan testinde orta alanda geçirilen süreler.

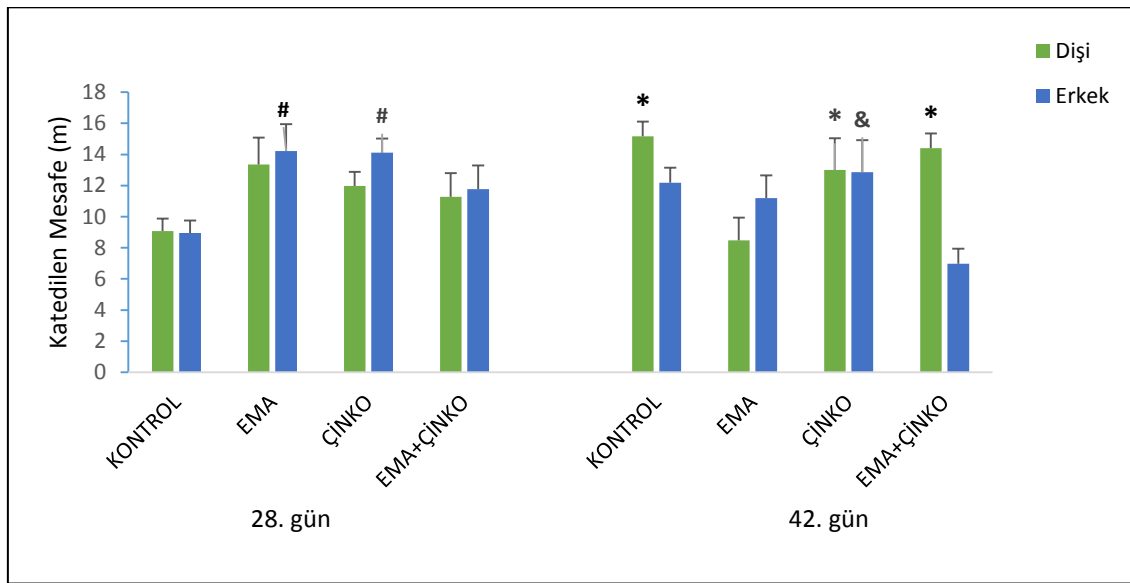
(#Erkek EMA+Çinko grubuna göre anlamlı olarak farklı ($p<0.05$), *Dişi EMA grubuna göre anlamlı olarak farklı ($p<0.05$))

Dişi ve erkek grupları karşılaştırıldığı zaman, 28. gün orta alanda geçirilen sürelerde dişi ve erkek grupları arasında anlamlı fark oluşmadığı gözlemlendi ($p>0.05$). Dişi ve erkek kontrol grupları ($p=0.021$) ile dişi ve erkek EMA+Çinko grupları arasında 42. günde anlamlı fark bulundu ($p=0.001$). Dişi kontroller ve dişi EMA+Çinko grubu erkeklere göre orta alanda daha fazla süre geçirdiler.

Orta alanda geçirilen süreler 28 ve 42. günler arasında karşılaştırıldığı zaman dişi kontrol grupları ($p=0.002$), dişi çinko grupları ($p=0.04$) ve dişi EMA+Çinko grupları arasında ($p=0.019$) anlamlı fark bulundu. Erkek grupları arasında anlamlı fark oluşmadığı gözlemlendi ($p>0.05$).

4.1.3. Yükseltilmiş Artı Labirent Testi Sonuçları

Yükseltilmiş artı labirent 28. gün sonuçlarına göre katedilen mesafede, dişi grupları arasında anlamlı fark bulunmadı ($p>0.05$). Erkek gruplarında EMA ve çinko gruplarının kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha fazla mesafe katettiği bulundu (EMA; $p=0.023$, Çinko; $p=0.027$). Katedilen mesafe bakımından 42. günde dişi gruplarından kontrol ($p=0.014$), çinko ($p=0.028$) ve EMA+Çinko ($p=0.038$) gruplarının EMA grubuna göre anlamlı olarak daha fazla mesafe katettiği bulundu. Erkek gruplarında çinko grubunun EMA+Çinko grubuna göre anlamlı olarak daha fazla mesafe katettiği bulundu ($p=0.030$) (Şekil 10).



Şekil 10. Yükseltilmiş artı labirent testinde katedilen toplam mesafeler.

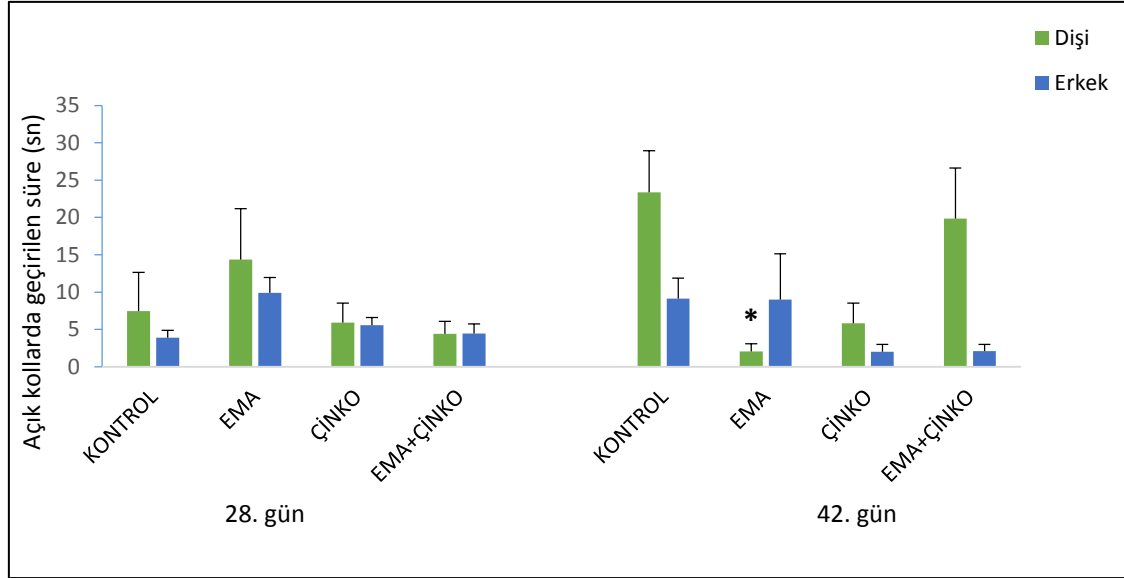
(*Dişi EMA grubuna göre anlamlı olarak farklı ($p<0.05$), #Erkek Kontrol grubuna göre anlamlı olarak farklı ($p<0.05$), &Erkek EMA+Çinko grubuna göre anlamlı olarak farklı ($p<0.05$))

Dişi ve erkek grupları karşılaştırıldığı zaman 28. gün anlamlı farklılık olmadığı gözlemlendi ($p>0.05$). Dişi ve erkek EMA+Çinko grupları arasında 42. günde anlamlı fark olduğu gözlemlendi, dişiler anlamlı olarak daha fazla mesafe katettiler ($p=0.004$).

Katedilen mesafe bakımından 28 ve 42. günler karşılaştırıldığı zaman dişi kontrol grupları arasında anlamlı fark olduğu, 42. gün dişi kontrollerin anlamlı olarak daha fazla mesafe katettiği gözlemlendi ($p=0.003$). Erkek kontrol grupları arasında da 42. günde anlamlı fark olduğu, 42. gün erkek kontroller anlamlı olarak daha fazla mesafe katettiği gözlemlendi

($p=0.002$). Erkek EMA+Çinko grubu 42. günde anlamlı olarak daha az mesafe katettiler ($p=0.027$).

Açık kollarda geçirilen süreler değerlendirildiğinde 28. gün dişi ve erkek gruplarında anlamlı farklılık oluşmadığı gözlemlendi ($p>0.05$). Dişi kontrol grubunun 42. günde EMA ($p=0.042$) ve çinko ($p=0.047$) gruplarına göre anlamlı olarak daha fazla süre geçirdiği gözlemlendi. Erkek grupları arasında anlamlı fark oluşmadığı gözlemlendi ($p>0.05$) (Şekil 11).



Şekil 11. Yükseltilmiş artı labirent testinde açık kollarda geçirilen süreler.

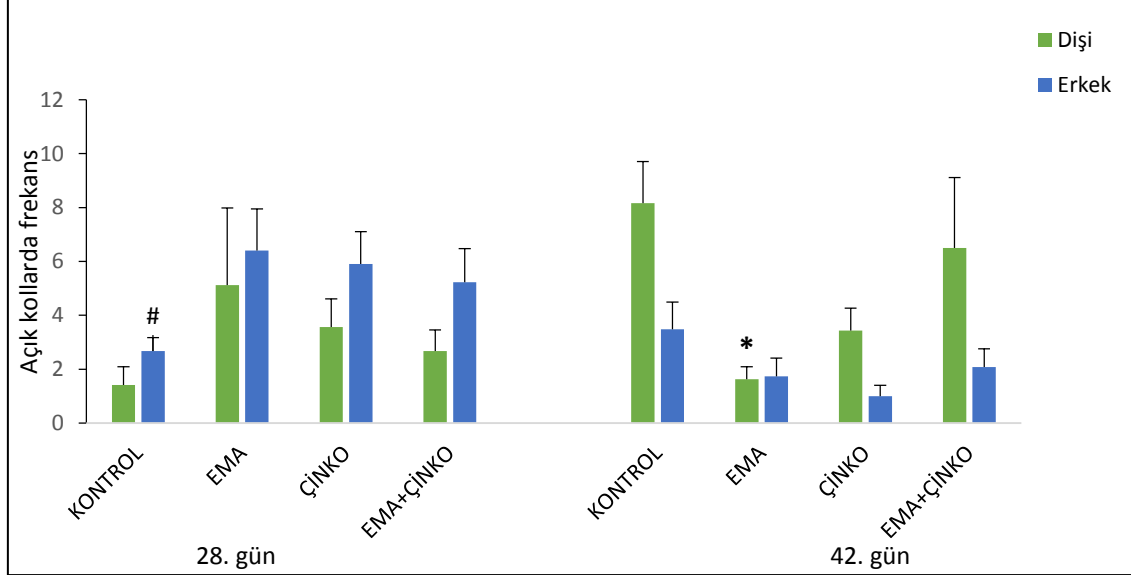
(*Dişi Kontrol grubuna göre anlamlı olarak farklı ($p<0.05$))

Dişi ve erkek grupları karşılaştırıldığı zaman 28. gün gruplar arasında anlamlı fark oluşmadığı gözlemlendi ($p>0.05$). Dişi ve erkek kontrol grupları arasında 42. günde anlamlı fark oluştuğu, dişilerin açık kollarda anlamlı olarak daha fazla süre geçirdiği gözlemlendi ($p=0.007$). EMA+Çinko grupları arasında da 42. günde anlamlı fark oluştuğu, dişilerin açık kollarda anlamlı olarak daha fazla süre geçirdiği gözlemlendi ($p=0.003$).

Açık kollarda geçirilen süreler 28. ve 42. günler arasında karşılaştırıldığında dişi kontrol grupları arasında anlamlı fark oluştuğu, 42. gün dişi kontrollerin açık kollarda anlamlı olarak daha fazla süre geçirdiği gözlemlendi ($p=0.009$). Erkek çinko grubunun 42. günde 28. güne göre açık kollarda anlamlı olarak daha az süre geçirdiği gözlemlendi ($p=0.021$).

Açık kollara giriş sayıları değerlendirildiğinde 28. gün dişi grupları arasında anlamlı fark olmadığı, erkek kontrol grubunun EMA ($p=0.023$) ve çinko ($p=0.048$) gruplarına göre giriş

sayısının daha az olduğu gözlemlendi. 42. gün erkek grupları arasında anlamlı fark olmadığı, dişi EMA grubunun kontrol ($p=0.002$) ve EMA+Çinko ($p=0.022$) gruplarına göre giriş sayısının daha az olduğu gözlemlendi (Şekil 12).



Şekil 12. Yükseltilmiş artı labirent testinde açık kollara giriş sayısı (frekans).

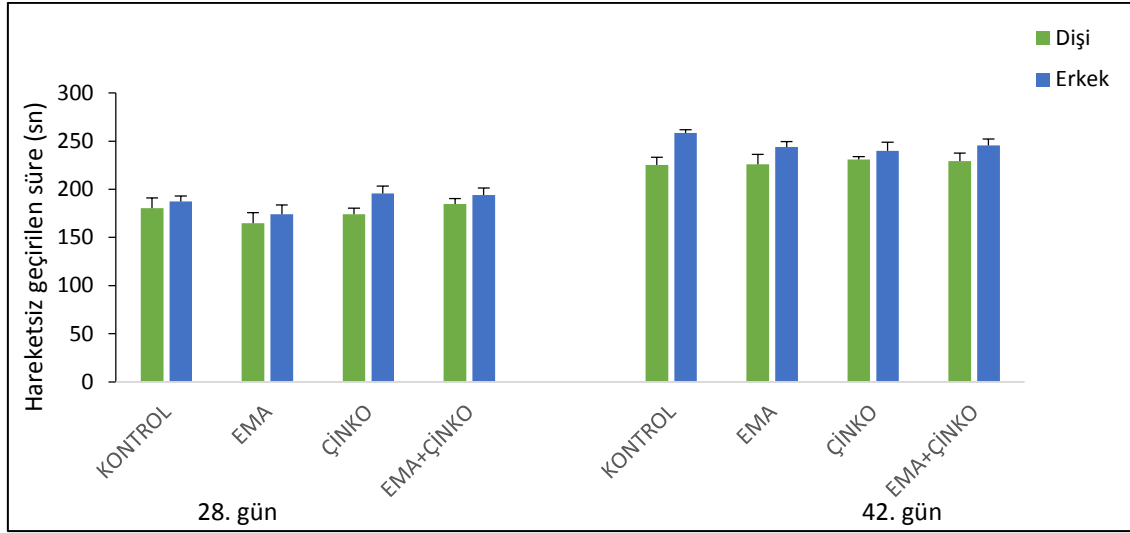
(*Dişi Kontrol grubuna göre anlamlı olarak farklı ($p<0.05$), #Erkek EMA ve Çinko grubuna göre anlamlı olarak farklı ($p<0.05$))

Dişi ve erkek grupları karşılaştırıldığı zaman 28. gün gruplar arasında anlamlı fark oluşmadığı gözlemlendi ($p>0.05$). Dişi ve erkek kontrol grupları arasında 42. günde anlamlı fark oluştuğu, dişi kontrollerin giriş sayısının anlamlı olarak daha fazla olduğu gözlemlendi ($p=0.005$). Dişi EMA+Çinko grubunun giriş sayısı 42. günde erkeklere göre anlamlı olarak daha fazla bulundu ($p=0.018$).

Açık kollara giriş sayıları 28. ve 42. günler arasında karşılaştırıldığı zaman dişi kontrol grupları arasında anlamlı fark oluştuğu, 42. gün dişi kontrollerin açık kollara giriş sayısı anlamlı olarak daha fazla bulundu ($p=0.001$). Erkek EMA ve çinko gruplarının 42. günde 28. güne göre açık kollara giriş sayısı anlamlı olarak daha az bulundu ($p=0.038$ ve $p=0.003$).

4.1.4. Zorlu Yüzme (Porsolt) Testi Sonuçları

Zorlu yüzme testi incelendiğinde 28. ve 42. günlerde gruplar arasında anlamlı fark bulunmadı ($p>0.05$) (Şekil 13).



Şekil 13. Zorlu yüzme testinde hareketsiz geçirilen zaman.

Dişi ve erkekler karşılaştırıldığı zaman; 28. gün dişi ve erkek çinko grupları arasında ($p=0.048$) anlamlı fark bulundu, erkeklerin dişilere göre daha fazla hareketsiz zaman geçirdiği görüldü. Dişi ve erkek kontrol grupları arasında ($p=0.002$) 42. günde anlamlı fark bulundu, erkeklerin dişilere göre daha fazla hareketsiz zaman geçirdiği görüldü.

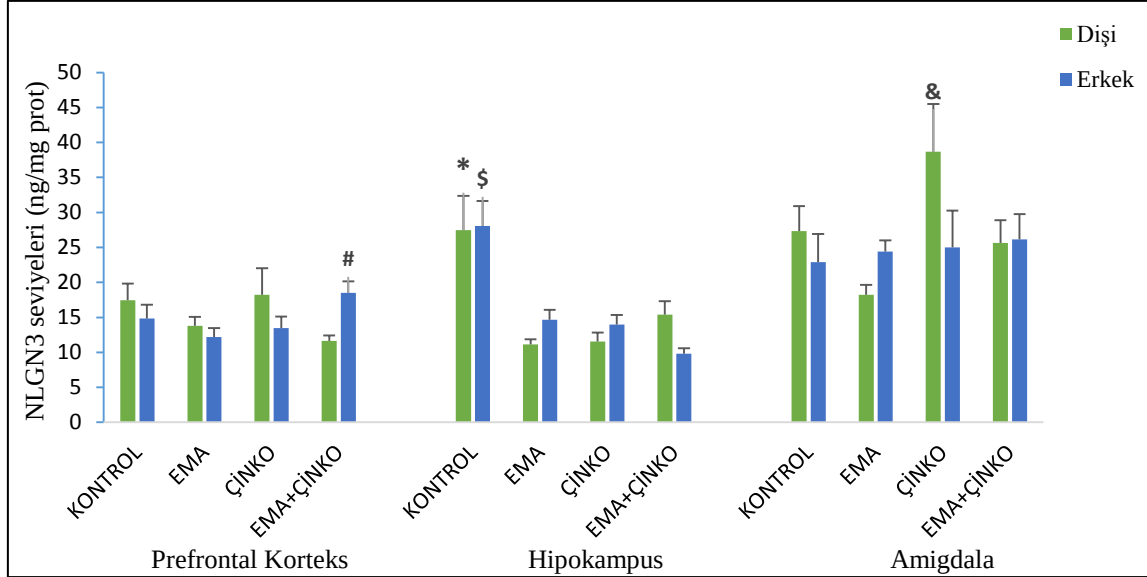
Hareketsiz geçirilen süre 28 ve 42. günlerde karşılaştırıldığı zaman dişi kontrol grupları ($p=0.001$), dişi EMA grupları ($p<0.001$), dişi çinko grupları ($p<0.001$) ve dişi EMA+Çinko grupları arasında ($p<0.001$) anlamlı fark bulundu, 42. gün dişilerin daha fazla hareketsiz zaman geçirdiği görüldü. Erkek kontrol grupları ($p<0.001$), erkek EMA grupları ($p<0.001$), erkek çinko grupları ($p=0.004$) ve erkek EMA+Çinko grupları arasında ($p<0.001$) anlamlı fark bulundu, erkeklerin de 42. gün daha fazla hareketsiz zaman geçirdiği bulundu.

4.2. Biyokimyasal Değerlendirme Sonuçları

4.2.1. Doku NLGN3 Seviyeleri

Doku NLGN3 seviyeleri karşılaştırıldığı zaman; dişilerde prefrontal korteks NLGN3 seviyelerinde anlamlı fark bulunmadı ($p>0.05$). Hipokampusta kontrol grubunun NLGN3 seviyeleri EMA ($p<0.001$), çinko ($p<0.001$) ve EMA+Çinko ($p=0.005$) gruplarına göre anlamlı olarak daha yüksek bulundu. Amigdalada çinko grubunun NLGN3 seviyeleri EMA ($p=0.003$) ve EMA+Çinko ($p=0.042$) gruplarına göre anlamlı olarak daha yüksek bulundu. Erkeklerde prefrontal korteks NLGN3 seviyeleri EMA+Çinko grubunda EMA grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek bulundu ($p=0.013$). Hipokampusta kontrol grubunun NLGN3 seviyeleri EMA

($p<0.001$), çinko ($p<0.001$) ve EMA+Çinko ($p<0.001$) gruplarına göre anlamlı olarak daha yüksek bulundu. Erkeklerde amigdala NLGN3 seviyelerinde anlamlı fark bulunmadı ($p>0.05$) (Şekil 14).



Şekil 14. Doku NLGN3 seviyeleri (ng/mg protein).

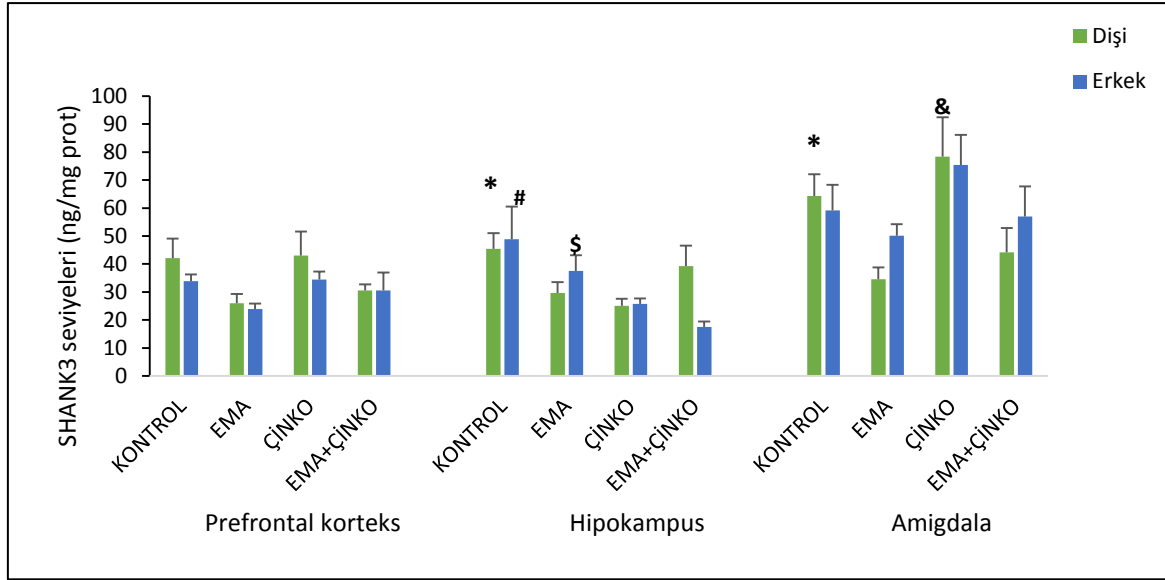
(*Dişi EMA, Çinko ve EMA+Çinko gruplarına göre anlamlı olarak farklı ($p<0.05$), &Dişi EMA ve EMA+Çinko gruplarına göre anlamlı olarak farklı ($p<0.05$), #Erkek EMA grubuna göre anlamlı olarak farklı ($p<0.05$), \$ Erkek EMA, Çinko ve EMA+Çinko gruplarına göre anlamlı olarak farklı ($p<0.05$))

Dişi ve erkekler karşılaştırıldığı zaman prefrontal kortekste erkek EMA+Çinko grubunda NLGN3 seviyeleri dişilere göre anlamlı olarak daha yüksek bulundu ($p=0.023$). Amigdalada dişi çinko grubunda NLGN3 seviyeleri erkeklere göre anlamlı olarak daha yüksek bulundu ($p=0.025$).

4.2.2. Doku SHANK3 Seviyeleri

Doku SHANK3 seviyeleri karşılaştırıldığı zaman dişilerde prefrontal korteks SHANK3 seviyelerinde anlamlı fark bulunmadı ($p>0.05$). Hipokampusta kontrol grubunun SHANK3 seviyeleri EMA ($p=0.043$) ve çinko ($p=0.011$) gruplarına göre anlamlı olarak daha yüksek bulundu. Amigdalada kontrol grubunun SHANK3 seviyeleri EMA grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek bulundu ($p=0.036$). Çinko grubunun SHANK3 seviyeleri EMA ($p=0.003$) ve EMA+Çinko ($p=0.017$) gruplarına göre anlamlı olarak daha yüksek bulundu. Erkeklerde de

prefrontal korteks SHANK3 seviyelerinde anlamlı fark bulunmadı ($p>0.05$). Hipokampusta kontrol grubunun SHANK3 seviyeleri çinko ($p=0.022$) ve EMA+Çinko ($p=0.003$) gruplarına göre anlamlı olarak daha yüksek bulundu. EMA grubunun SHANK3 seviyeleri EMA+Çinko grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek bulundu ($p=0.044$) (Şekil 15).



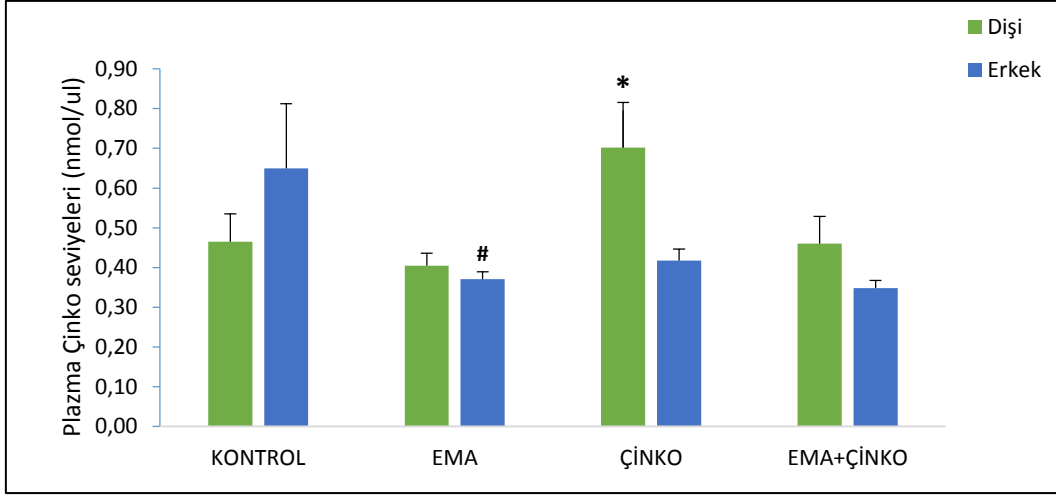
Şekil 15. Doku SHANK3 seviyeleri (ng/mg protein).

(*Dişi EMA grubuna göre anlamlı olarak farklı ($p<0.05$), &Dişi EMA ve EMA+Çinko gruplarına göre anlamlı olarak farklı ($p<0.05$), #Erkek Çinko ve EMA+Çinko gruplarına göre anlamlı olarak farklı ($p<0.05$), \$ Erkek EMA+Çinko grubuna göre anlamlı olarak farklı ($p<0.05$))

Dişi ve erkekler karşılaştırıldığı zaman hipokampusta dişi EMA+Çinko grubunda SHANK3 seviyeleri erkeklere göre anlamlı olarak daha yüksek bulundu ($p=0.013$)

4.2.2. Plazma Çinko Seviyeleri

Çinko seviyeleri karşılaştırıldığı zaman gruplar arasında anlamlı fark olduğu gözlemlendi. Dişilerde çinko grubunda çinko seviyelerinin kontrol ($p=0.044$), EMA ($p=0.015$) ve EMA+Çinko ($p=0.041$) gruplarına göre anlamlı olarak daha yüksek olduğu bulundu. Erkeklerde EMA grubunda çinko seviyeleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu ($p=0.032$) (Şekil 16).



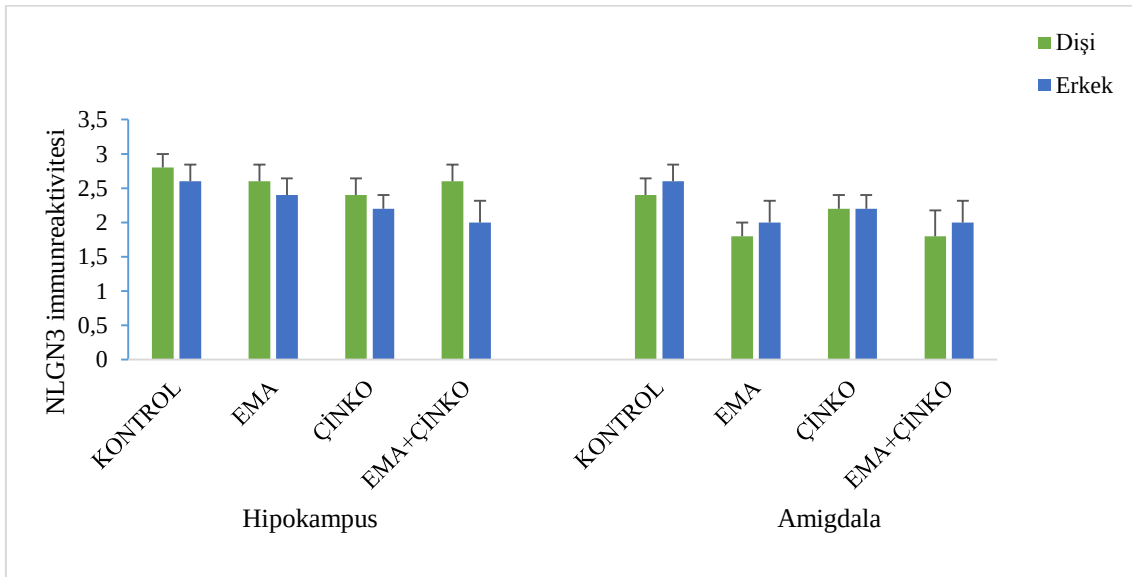
Şekil 16. Plazma çinko seviyeleri (nmol/µl).

(*Dişi Kontrol grubuna göre anlamlı olarak farklı ($p<0.05$), #Erkek Kontrol grubuna göre anlamlı olarak farklı ($p<0.05$))

Dişi ve erkekler karşılaştırıldığı zaman dişi çinko grubunda çinko seviyelerinin erkek çinko grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek olduğu bulundu ($p=0.018$).

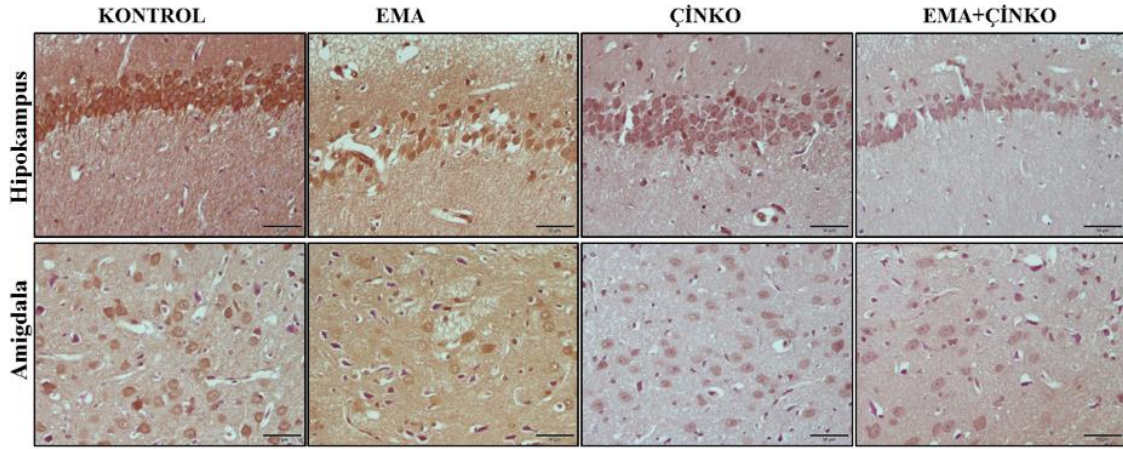
4.3. Histolojik İnceleme Sonuçları

Hipokampus ve amigdala bölgelerinde uygulanan NLGN3 immunhistokimyasal boyama sonuçları karşılaştırıldığı zaman gruplar arasında anlamlı fark bulunmadı ($p>0.05$) (Şekil 17).

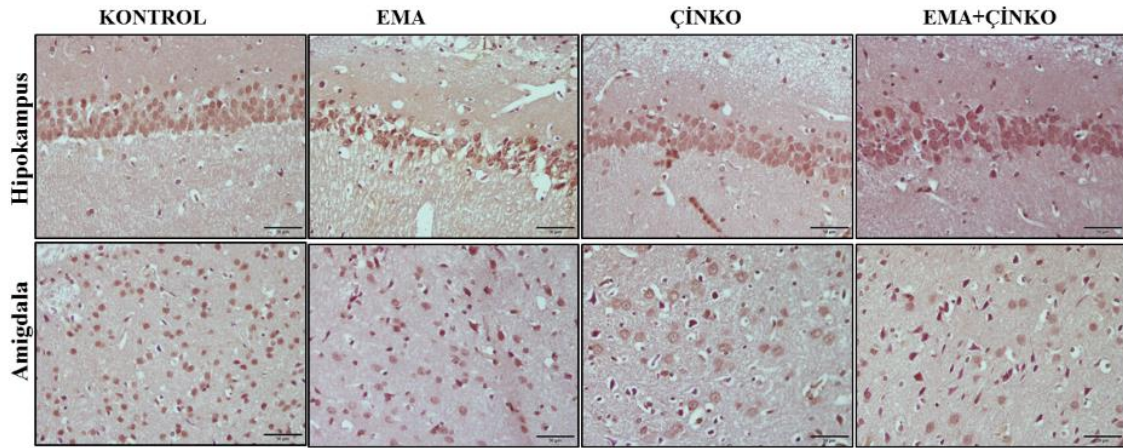


Şekil 17. NLGN3 immunreaktivitesi.

Dişi ve erkekler karşılaştırıldığı zaman hipokampus ve amigdala bölgelerinde NLGN3 immunreaktivitesinde gruplar arasında anlamlı fark bulunmadı ($p>0.05$) (Şekil 18 ve Şekil 19).

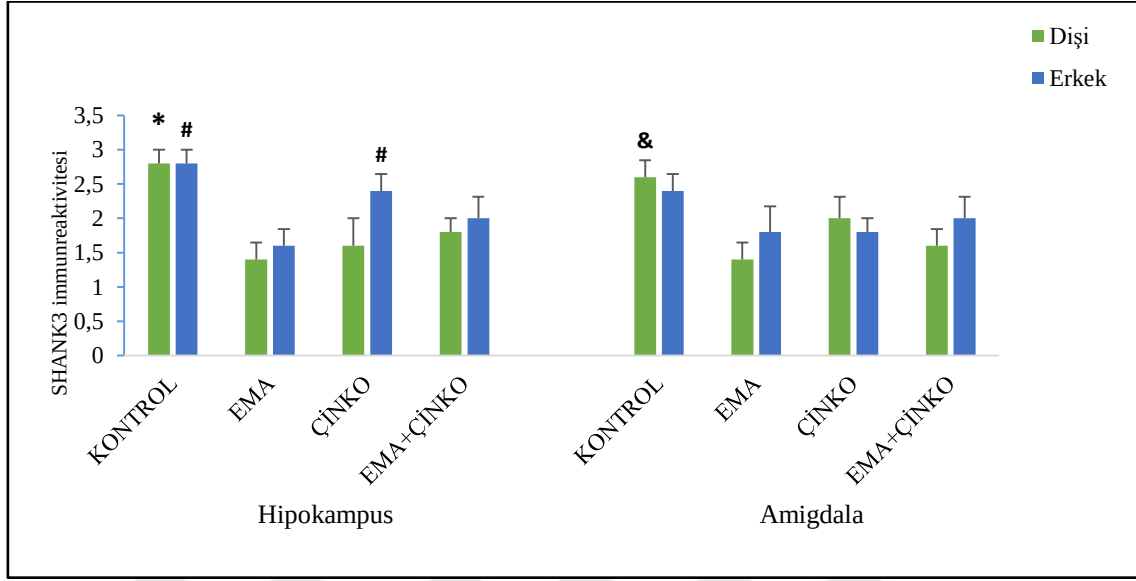


Şekil 18. Dişilerde NLGN3 immunreaktivitesi.



Şekil 19. Erkeklerde NLGN3 immunreaktivitesi.

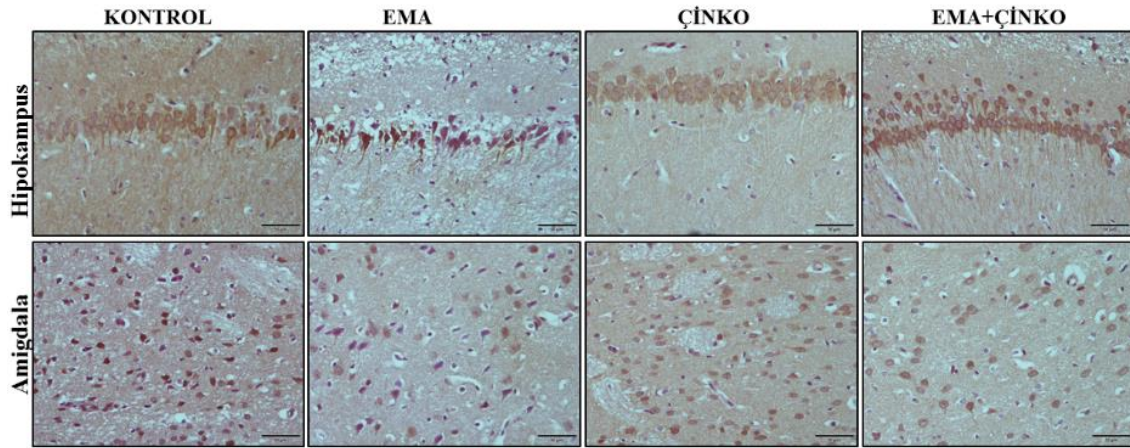
Hipokampus ve amigdala bölgelerinde uygulanan SHANK3 immunhistokimyasal boyama sonuçları karşılaştırıldığı zaman dişilerde hipokampusta kontrol grubunun immunreaktivitesi EMA ($p=0.002$), çinko ($p=0.007$) ve EMA+Çinko ($p=0.020$) gruplarına göre anlamlı olarak daha yüksek bulundu. Amigdalada kontrol grubunun immunreaktivitesi EMA ($p=0.005$) ve EMA+Çinko ($p=0.017$) gruplarına göre anlamlı olarak daha yüksek bulundu. Erkeklerde hipokampusta kontrol grubunun immunreaktivitesi EMA ($p=0.004$) ve EMA+Çinko ($p=0.041$) gruplarına göre anlamlı olarak daha yüksek bulundu. Amigdalada gruplar arasında anlamlı fark bulunmadı ($p>0.05$) (Şekil 20).



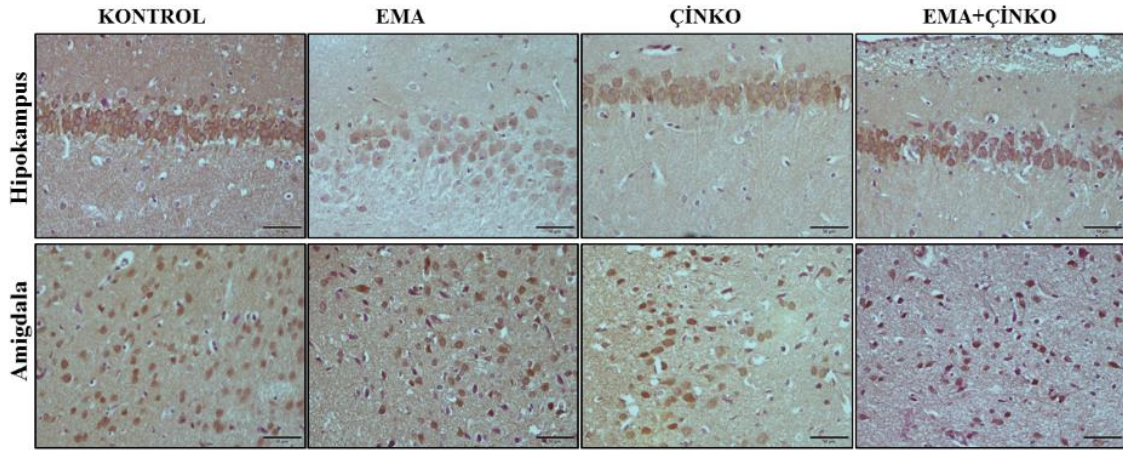
Şekil 20. SHANK3 immunreaktivitesi.

(*Dişi EMA, Çinko ve EMA+Çinko gruplarına göre anlamlı olarak farklı ($p<0.05$), &Dişi EMA ve EMA+Çinko gruplarına göre anlamlı olarak farklı ($p<0.05$), #Erkek EMA ve EMA+Çinko gruplarına göre anlamlı olarak farklı ($p<0.05$))

Dişi ve erkekler karşılaştırıldığı zaman; hipokampusta erkeklerde çinko grubunun immunreaktivitesi dişilere göre anlamlı olarak daha yüksek bulundu ($p=0.040$) (Şekil 21 ve 22).



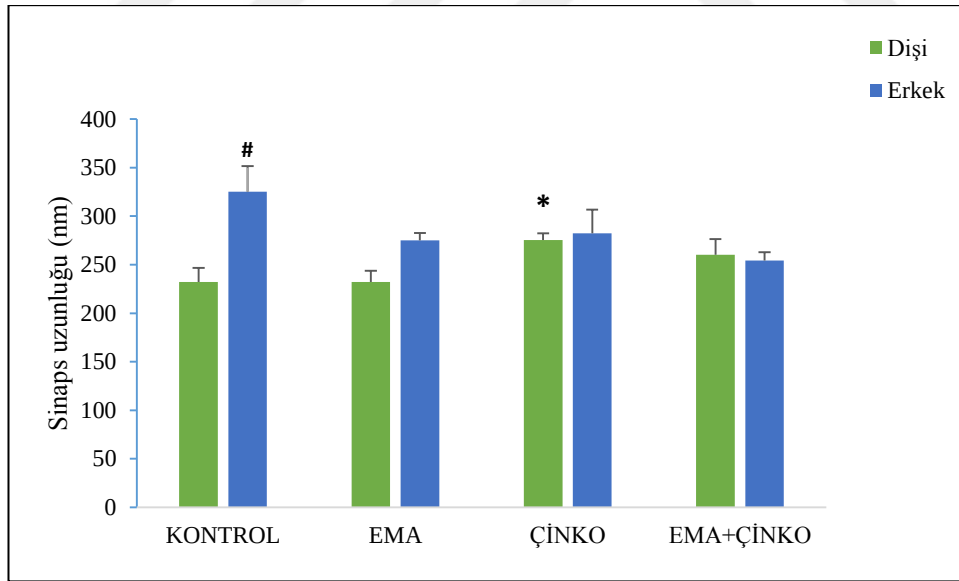
Şekil 21. Dişilerde SHANK3 immunreaktivitesi.



Şekil 22. Erkeklerde SHANK3 immunreaktivitesi.

4.4. Elektron Mikroskopik İnceleme Sonuçları

Sinaptik uzunluklar karşılaştırıldığında zaman dışılerde çinko grubunun aktif zon uzunluğu kontrol ($p=0.045$) ve EMA ($p=0.046$) gruplarına göre anlamlı olarak daha yüksek bulundu. Erkeklerde kontrol grubunun aktif zon uzunluğu EMA ($p=0.044$) ve EMA+Çinko gruplarına göre anlamlı olarak daha yüksek bulundu (Şekil 23).

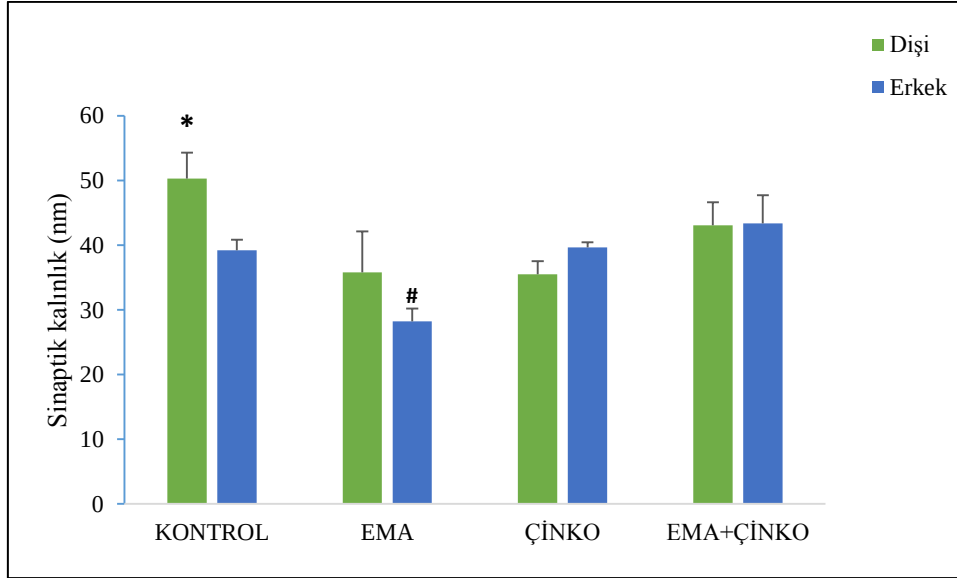


Şekil 23. Sinaps (aktif zon) uzunluğu (nm).

(*Dişi Kontrol ve EMA gruplarına göre anlamlı olarak farklı ($p<0.05$), #Erkek EMA ve EMA+Çinko gruplarına göre anlamlı olarak farklı ($p<0.05$))

Dişi ve erkekler karşılaştırıldığı zaman; erkek kontrol grubunda aktif zon uzunluğu dişilere göre anlamlı olarak daha yüksek bulundu ($p=0.025$).

Postsinaptik kalınlıklar karşılaştırıldığı zaman; dişilerde kontrol grubunda sinaptik kalınlık EMA ($p=0.044$) ve çinko ($p=0.041$) gruplarına göre anlamlı olarak daha yüksek bulundu. Erkeklerde EMA grubunda sinaptik kalınlık kontrol ($p=0.016$), çinko ($p=0.013$) ve EMA+Çinko ($p=0.003$) gruplarına göre anlamlı olarak daha düşük bulundu (Şekil 24).

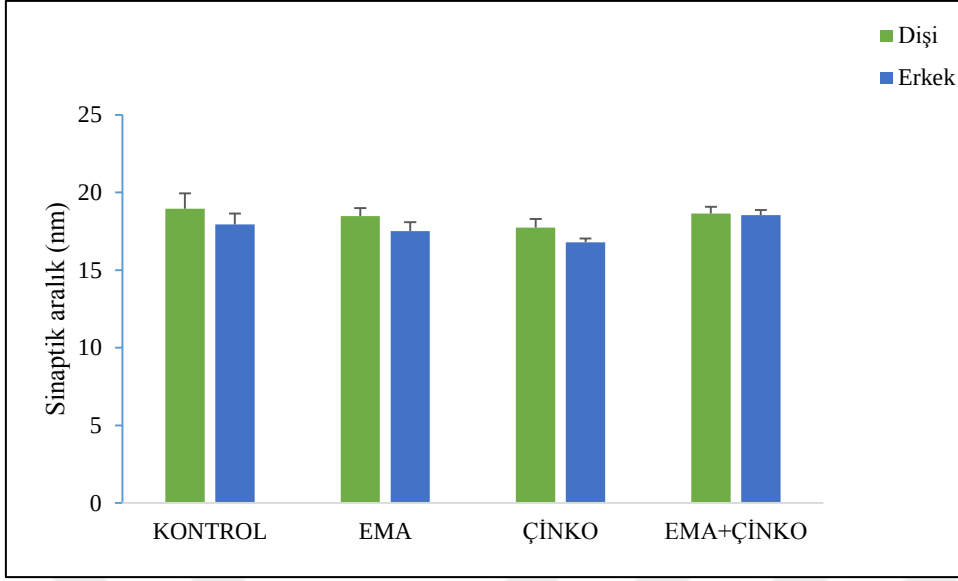


Şekil 24. Postsinaptik kalınlık (nm).

(*Dişi EMA ve Çinko gruplarına göre anlamlı olarak farklı ($p<0.05$), #Erkek Kontrol, Çinko ve EMA+Çinko gruplarına göre anlamlı olarak farklı ($p<0.05$))

Dişi ve erkekler karşılaştırıldığı zaman dişi kontrol grubunda sinaptik kalınlık erkeklere göre anlamlı olarak daha yüksek bulundu ($p=0.042$).

Sinaptik aralığın genişlikleri karşılaştırıldığı zaman gruplar arasında anlamlı fark oluşmadığı gözlemlendi ($p>0.05$) (Şekil 25).



Şekil 25. Sinaptik aralık (genişlik, nm).

Dişi ve erkekler karşılaştırıldığı zaman gruplar arasında anlamlı fark oluşmadığı gözlemlendi ($p>0.05$).

5. TARTIŞMA

5.1. EMA Maruziyeti ve Davranışa Etkisi

Günümüze kadar yapılan çalışmalarda EMA etkileri deney hayvanları kullanılarak çeşitli davranış deneyleri ile incelenmiş ve tartışmalı sonuçlar elde edilmiştir.

Erişkin deney hayvanlarında yapılan davranış deneylerinde ELF EMA'nın anksiyete üzerine etkisi incelenmiş ve maruziyete bağlı olarak anksiyetenin arttığı pek çok çalışmada gösterilmiştir. ELF EMA maruziyetinin 25 gün, günde 1 ve 4 saat olmak üzere uygulandığı grupların anksiyete düzeyi açık alan ve yükseltilmiş artı labirent testleri ile incelenmiş ve 4 saatlik maruziyet grubunda artmış anksiyete düzeyi saptanmıştır (77). Kronik (günde 8 saat, 25 gün) ELF EMA (60 Hz, 3 mT) maruziyetinin farelere etkisinin incelendiği çalışmada açık alan ve yükseltilmiş artı labirent testlerinde bir fark bulunmamıştır. Aynı çalışmada zorlu yüzme testinde maruziyet grubunda katedilen mesafede azalma ve immobilitede artışa ek olarak kortikosteron salgısında artış bulgularından yola çıkılarak ELF EMA maruziyetinin farelerde depresyon ve anksiyete benzeri davranışa neden olduğu belirtilmiştir (39). ELF EMA maruziyetinin sıçan davranışına etkisinin değerlendirildiği çalışmada 20 dk 50 Hz EMA maruziyeti ardından sıçanların yükseltilmiş artı labirent testinde daha immobil, yeni obje tanıma testinde ise daha pasif oldukları görülmüştür. Çalışmadan kısa süreli ELF EMA maruziyetinin anksiyete ve pasiflik gibi bazı davranışları etkilerken sosyal ve teritoryal davranış (sosyal etkileşim testi ve bölgesellik testi) üzerine bir etkisi olmadığı sonuçları elde edilmiştir (78).

ELF EMA (50 Hz) maruziyetinin farelere etkisinin incelendiği çalışmada yükseltilmiş artı labirent testinde açık kollarda geçirilen sürenin azaldığı, açık alan testinde dış alanda geçirilen sürenin arttığı ve sosyal etkileşim deneyinde reaksiyon zamanının azaldığı bulguları elde edilmiştir. EMA maruziyeti kaynaklı bu anksiyojenik etkinin glutamat ve NMDA reseptörlerinin aktivasyonundaki artış ile ilişkili olabileceği belirtilmiştir (27). Yedi gün sürekli ELF EMA (50 Hz) maruziyetinin davranışa etkisinin değerlendirildiği çalışmada sıçanlarda anksiyete benzeri davranış görüldüğü ve bu davranışın hiptalamusta süper oksit anyon radikali ve nitrik oksit artışına bağlı olabileceği belirtilmiştir (79). ELF EMA (50 Hz, 1-2000 μ T) maruziyetinin 60 gün (günde 2 saat) sürdürüldüğü çalışmada maruziyetin belleğe (Morris su

tankı testi ve pasif kaçınma testi) olumlu etkisinin olduğu ancak anksiyete benzeri davranışa (yükseltilmiş artı labirent testi) ve oksidatif strese neden olduğu gösterilmiştir (80).

Benzer sonuçlara ELF dışında daha yüksek frekansın kullanıldığı çalışmalarda da rastlanmaktadır. RF EMA (2,45 GHz; günde 60 dk; 7, 30, 60, 90, 120 gün) maruziyetinin anksiyete benzeri davranışa (yükseltilmiş artı labirent testi, açık alan testi ve sosyal etkileşim testi), obsesif kompulsif davranışa (bilye gömme testi) ve depresyon benzeri davranışa (zorlu yüzme testi ve kuyruk süspansiyon testi) etkisi incelendiği çalışmada uzun süreli maruziyetin davranışsal olarak etkisinin olmadığı belirtilmiştir (81). Tek doz RF EMA (900 MHz, 1,5-6 W/kg 15 dk, 6W/kg 45 dk) maruziyetinin etkilerinin sıçanlarda lokomasyon (açık alan testi) ve anksiyete benzeri davranışa (yükseltilmiş artı labirent testi) etkisinin olmadığı görülmüştür (82). Cep telefonu kaynaklı EMA maruziyetinin üç gün uygulandığı bir çalışmada açık alan deneyinden elde edilen veriler sıçanların immobilité süresi ve şahlanma (rearing) frekansının artması nedeniyle maruziyetin stresli davranış paternine neden olduğu ancak anksiyeteye neden olmadığı belirtilmiştir (83). WiFi kaynaklı RF EMA maruziyetinin (2.45 GHz) etkilerinin incelendiği bir başka çalışmada sıçanlarda öğrenme-bellek kabiliyetinde değişiklik görülmezken (Morris su labirenti testi) maruziyete bağlı olarak anksiyete benzeri davranışın (yükseltilmiş artı labirent testi) tetiklendiği belirtilmiştir (84).

Bazı çalışmalarda ELF EMA maruziyetinin anksiyete üzerine etkisi olmadığı bulunmuştur. Bir diğer çalışmada 24 hafta boyunca günde 20 saat uygulanan ELF EMA (50 Hz/100 μ T) maruziyetinin erkek sıçanlarda anksiyete benzeri davranış (açık alan testi ve yükseltilmiş artı labirent testi), depresyon benzeri davranış (kuyruk süspansiyon testi ve zorlu yüzme testi) ya da öğrenme ve bellekte (Morris su labirenti testi) bozulmaya neden olmadığı belirtilmiştir (85). Hayvan barındırma sisteminin bir parçası olarak ELF EMA (5-100 Hz) maruziyetinin 6 haftalık süreçte farelere etkisinin değerlendirildiği çalışmada maruziyetin anksiyete benzeri davranışa (açık alan testi) ve kognitif performansta bozulmaya (yeni obje tanıma testi) neden olmadığı belirtilmiştir (86).

ELF EMA maruziyetinde lokomotor aktivitenin değerlendirildiği çalışmalardan bir kısmı olumsuz etkisinin olduğunu söylerken bir kısmı etkisinin olmadığını belirtmektedir. ELF EMA maruziyetinin kısa süreli hafızaya etkisinin sosyal tanıma testi ile değerlendirildiği bir çalışmada ELF EMA'nın sıçanların kısa süreli hafızasını geliştirirken açık alan testi ile değerlendirilen lokomotor aktiviteye bir etkisi olmadığı belirtilmiştir (87). Östrojenin ELF

EMA maruziyetine etkisinin incelendiği bir çalışmada sosyal tanıma testi sonuçlarından 30 günlük maruziyet sonrası sosyal tanıma bozulma ve östrojenin düzeltici etkisi gözlenirken lokomotor aktivitenin etkilenmediği (açık alan testi) belirtilmiştir (88). Bunlardan farklı olarak başka çalışmada sıçanlara 2 gün arayla günde 2 saat 3 Hz ve 6 Hz EMA uygulanmış ve yükseltilmiş artı labirent testi sonuçları anksiyete benzeri davranış gelişmeksizin iki maruziyet grubunda da lokomotor aktivitede azalma olduğunu göstermiştir (89).

Frekansı yüksek EMA kaynaklarının kullanıldığı çalışmalarda maruziyetin lokomotor aktiviteye etkisinin olmadığı belirtilmiştir. Tek doz akut mikrodalga maruziyeti uygulanan çalışmada sıçanlarda lokomotor aktivitede bir değişiklik saptanmamıştır (25). Uzun süreli RF EMA (835 MHz) maruziyetinin etkilerinin değerlendirildiği çalışmada açık alan testinde katedilen mesafenin kontrole göre anlamlı olarak yüksek olduğu, basit motor kabiliyetin (rotarod testi) etkilenmediği bulunmuştur. Farelerde görülen bu hiperaktivite benzeri davranışın, serebral kortekste miyelin kılıf hasarına bağlı olarak gelişmiş olabileceği belirtilmiştir (31). Farelere tek doz 30 dk 1.8 GHz'lik EMA uygulaması sonrasında lokomotor aktivitede değişiklik yokken tanıma hafızasının güçlendiği bulunmuş ve bu etkinin tedavide kullanılabileceği öne sürülmüştür (90).

Literatürde ELF EMA maruziyetinin depresyon benzeri davranışlara neden olduğu bulunmuştur (39). Kısa (günde 8 saat, 5 gün) ve uzun (sürekli, 4-6 hafta) süreli ELF EMA maruziyetinin etkilerinin incelendiği çalışmada yükseltilmiş artı labirent testi ile incelendiğinde anksiyete davranışı görülmezken, zorlu yüzme testinden elde edilen sonuçlar uzun ve sürekli maruziyetin depresyona neden olduğunu göstermektedir. Hormonal stres belirteçleri ve davranış sonuçları birlikte değerlendirildiğinde uzun süreli ve sürekli ELF EMA maruziyetinin ılımlı stres ve depresyona neden olabileceği belirtilmiştir (38).

Prenatal ve postnatal dönemlerde yavrular dışarıdan gelen etkilere göre daha hassastır. Bu dönemde EMA maruziyetinin yavruların davranışlarına etkilerinin araştırıldığı çalışmalarda çoğunlukla yüksek frekanslı EMA kaynakları kullanılmış ve farklı sonuçlar sunulmuştur.

Gebelikten başlayarak postnatal 28. güne kadar sürdürülen IF EMA (7,5 kHz) maruziyetinin erkek farelerin sinir sistemi gelişimine etkisinin incelendiği çalışmada, kontrol ve maruziyet grubu arasında motor aktivite (rotarod testi), anksiyete (bilye gömme testi), spasyal öğrenme ve bellek (Morris su labirenti testi) açısından fark bulunmamıştır (91). EMA

maruziyetinin üç kuşak boyunca 2.14 GHz dalga boyunda uygulandığı çalışmada, açık alan ve Morris su labirenti testlerinde dişi ve erkekler kıyaslandığında da maruziyete bağlı olarak davranışsal bir farklılık bulunmamıştır (92). Prenatal dönem boyunca günde altı saat cep telefonu kaynaklı RF EMA maruziyetini yavrularda Purkinje hücrelerinin uyarılabilirliğinin azaldığı ancak bu durumun yavru sıçanların lokomotor aktivitesini etkilemediği belirtilmiştir (35). RF EMA maruziyetinin gebeliğe ve yavruların gelişimine etkilerinin incelendiği çalışmada 800 MHz – 5.2 GHz arası sekiz farklı frekans kullanılmış ve maruziyetin yan etkilerinin olmadığı, fiziksel ve fonksiyonel gelişim ile hafıza fonksiyonlarına olumsuz etkisinin bulunmadığı belirtilmiştir (açık alan testi ve Morris su labirenti testi) (93).

Jüvenil sıçanlara 8 hafta, haftada 5 gün, günde 2 saat RF EMA uygulaması sonrasında lokomotor aktivite ve anksiyetenin açık alan ve yükseltilmiş artı labirent testleriyle değerlendirildiği çalışmada bu iki parametrede bir değişiklik görülmezken Morris su labirenti testi ile maruziyet grubunda öğrenme ve bellekte gelişme görülmüştür (94). Erken ve orta adölesan dönemde günde bir saatlik toplamda 25 gün 900 MHz EMA'ya maruz bırakılan sıçanların geç adölesan dönemde değerlendirdikleri öğrenme, bellek (pasif kaçınma testi, 8 kollu radyal labirent testi ve Y labirent testi) ve lokomotor davranışlarının (açık alan testi ve rotarod testi) etkilenmediği belirtilmiştir (95).

Gebelik süresince uygulanan RF EMA (2.45 GHz, günde 2 saat) maruziyetinin yavru sıçanlarda yükseltilmiş artı labirent testinde bir fark yaratmadığı, açık alan testinde merkezde geçirilen sürede azalma, immobilitede artış ve keşif davranışında bozulmaya neden olduğu belirtilmiştir. Gelişen anksiyete ve motor bozukluğun dişi ve erkekler arasında farklılık göstermesinin yanı sıra beyindeki oksidatif strese bağlı olabileceği düşünülmektedir (37). Gebelik süresince RF EMA (9.417 GHz) maruziyetinin yavru farelere etkisinin değerlendirildiği çalışmada açık alan testinde merkezde geçirilen sürenin, yükseltilmiş artı labirent testinde açık kolda geçirilen sürenin, kuyruk süspansiyon testi ve zorlu yüzme testinde immobilitenin maruziyet grubunda azaldığı gözlenmiştir. Morris su labirenti testinde ise sadece erkek farelerde öğrenme ve bellekte bozulma olduğu belirtilmiştir. Bu sonuçlardan yola çıkılarak *in utero* RF EMA maruziyetinin yavrularda anksiyete benzeri davranışa, depresyon benzeri davranışta azalmaya ve cinsiyete bağlı olarak öğrenme ve bellekte bozulmaya neden olduğu öne sürülmektedir (96).

Gebelik süresince kompleks manyetik alana (<5 nT, 10-50 nT, 50-500 nT, 500-1000 nT) maruz bırakılan sıçanların yavruları 90 günlük iken davranış deneyleri uygulandığında açık alan testinde anlamlı sonuç bulunmazken, zorlu yüzme testinde manyetik alan yoğunluğuna bağlı olarak yüzme süresinde azalma ve şartlı korku edinmede inhibisyon saptanmıştır. Histoloji sonuçları ile birlikte değerlendirildiğinde prenatal maruziyetin hipokampusta nöronal yoğunluğun niceliksel değişikliğine neden olabileceği ve bu yapıya özgü yetişkin davranışlarını etkileyebileceği düşünülmektedir (97). Prenatal dönemde kompleks manyetik alana (düşük 30-50 nT; orta 90-580 nT; yüksek 590-1200 nT) maruz kalan yavrularda açık alan testinde anlamlı bir fark bulunmazken öğrenmede bozulma (bağlamsal korku öğrenme), hipokampusta küçülme, CA1 ve CA3 bölgelerinde sitolojik ve morfolojik bozulmalar saptanmıştır (32).

Prenatal süreçte uygulanan WiFi kaynaklı RF EMA maruziyetinin yavruların gelişimine etkilerinin incelendiği çalışmada ilk 17 gün yavruların nörogelişimsel olarak bozukluk gösterdiği ancak bu etkilerin 28 ve 42. günlerde gözlenmediği belirtilmiştir (28. gün – yükseltilmiş artı labirent testi; 42. gün – rotarod testi). Bu durum, EMA maruziyeti ile gelişen nörogelişimsel bozulmanın erişkin dönemde kaybolduğunu ya da kullanılan testlerin olası etkiyi yansıtmamış olabileceğini düşündürmektedir (98).

Çalışmamızda iki ayrı günde davranış deneyleri uygulanmış olup, hayvanların genel olarak 42. günde 28. güne göre daha çok anksiyete benzeri davranış sergilediği görüldü. Erkeklerin dişilere göre daha yüksek oranda anksiyete benzeri davranış sergilediği görülürken, EMA ve EMA+Çinko gruplarındaki erkeklerde görülen anksiyete benzeri davranış 28. günde daha yüksek, 42. günde daha düşük bulundu. Depresyon düzeyleri incelendiğinde ise tüm grupların 42. günde 28. güne göre daha depresif oldukları görüldü. Ancak bu durumun gelişimin farklı aşamalarında olmalarından kaynaklanıp kaynaklanmadığının araştırılmasında fayda vardır.

EMA maruziyeti ve OSB ilişkisinin incelendiği tek çalışma bulunmaktadır. Çalışmada gestasyonun son haftası ve postnatal ilk hafta sürekli ELF EMA (50 Hz, 1 nT) maruziyetinin erkek farelerin gelişimine etkisini incelemek için çeşitli davranış deneyleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen bulgular lokomasyonun (açık alan testi), anksiyete benzeri davranışın (yükseltilmiş artı labirent testi), olfaktör yeteneğin (olfaktör habitüasyon/dishabitüasyon testi) ve motor koordinasyonun (rotarod testi) etkilenmediği ancak sosyalleşme davranışının bozulduğu

(Crawley'nin sosyallik testi ve sosyal yenilik tercihi testi) ve keşif davranışının azaldığı (hole-board testi) belirtilmiştir. Perinatal dönemin beyin büyümesi ve gelişimi için önemli olduğuna ve bu dönemde EMA maruziyeti etkisinin gelişimin ilk üç yılında ortaya çıkan OSB gibi kalıcı ve şiddetli bir etkiye neden olabileceğine dikkat çekilmektedir (9). Çalışmamızda EMA+Çinko erkek grubu dışında hiçbir grupta sosyal davranışta bozulmaya rastlanmadı. EMA+Çinko grubundaki sosyal davranış eksikliği eldeki veriler ile yorumlanamamaktadır. Mevcut çalışmada deney hayvanı olarak fare kullanılmış olup davranış deneyleri postnatal 8-11. haftalar arasında gerçekleştirilmiştir. Çalışmamızda ise postnatal 28. ve 42. günlerde sıçanlara davranış deneyleri uygulandı. Çalışmalar arası farkın bu etmenlere bağlı olup olmadığının daha fazla çalışma ile araştırılmasında fayda vardır.

Literatürde EMA maruziyetinin sosyal davranışa etkisinin cinsiyete bağlı olarak değerlendirildiği bir veri bulunmadığından çalışmamız bu alanda bir ilktir. Dişi ve erkeklerin sosyal alana giriş sayıları karşılaştırıldığında 28. günde kontrol grubunda dişilerin, EMA+Çinko grubunda erkeklerin sosyal alana daha çok girdiğini gördük. EMA+Çinko grubu 42. gün incelendiğinde ise dişilerin erkeklere göre sosyal alana daha çok girdiği görüldü. Bu durum çinkonun gelişim sürecinde dişi ve erkeklerde etkilerini farklı şekilde gösterebileceğini düşündürmektedir.

Alanlara giriş sayıları ile keşif hareketinin izlenebileceği, bu verilerin gruplar arası karşılaştırılması yapılarak aktivite durumunun tanımlanabileceği literatürde önerilmektedir (99). Bu bilgidan yola çıkarak sosyal ve boş alanlara giriş sayısını 28. ve 42. günler arasında kıyaslandığımızda kontrol, çinko ve EMA+Çinko gruplarında hem dişi hem erkeklerde alanlara giriş sayısının 42. günde daha fazla olduğunu gördük. Bu üç grup için 42. günde keşif davranışı ve aktivitenin arttığı söylenebilirken, EMA grubunda bir fark bulunmaması gelişimsel süreçte keşif davranışı ve aktivitede değişme olmadığını göstermektedir. Literatürde EMA maruziyetinin gelişimin farklı dönemlerinde sosyal davranışa etkisinin incelendiği başka çalışma olmadığından bu konunun daha detaylı incelenmesinde yarar vardır.

5.2. OSB, Çinko, Sinaptik Proteinler ve Davranış

Literatürde OSB modeli olarak SHANK3 geninin mutasyona uğratıldığı ya da silindiği deney hayvanları sıklıkla kullanılmaktadır. SHANK3B geni silinmiş farelerde tekrarlı grooming davranışı, sosyal davranış ve vokalizasyonda eksiklik, anksiyete benzeri davranış,

duyusal tepki ve öğrenme ve bellekte bozulmanın yanı sıra elektrofizyoloji sonuçları ile de desteklenmiş olan bu model, OSB fare modeli olarak özellikle tedavi araştırmalarında kullanılması için önerilmiştir (100). SHANK3 mutasyona uğratılmış farelerde hipokampusta uzun süreli potansiyasyon ve glutamaterjik transmisyonda azalma ile yeni nesne tanıma testinde, öğrenmede ve rotarod performansında bozulma, ultrasonik vokalizasyonda azalma, tekrarlı grooming davranışı görüldüğü bulunmuştur. Jüvenil dönemde karşılıklı etkileşimde bozulma görülürken erişkin dönemde yapılan sosyal davranış testinden normal sonuçlar elde edilmiştir (101).

SHANK3 izoformlarının mutasyona uğratıldığı farelerin kullanıldığı çalışmada SHANK3B mutant farelerde sosyal davranış bozukluğu, anksiyete benzeri davranış ve aşırı grooming görülürken açık alan testinde kontrol ile benzer sonuçlar elde edilmiş, SHANK3A mutant farelerde ise davranış bozukluğuna rastlanmamıştır. Elektrofizyolojik incelemelerden sinaptik fonksiyonda bozulma ve fonksiyonel sinaps sayısında azalma olduğu, elektron mikroskopik incelemelerden postsinaptik yoğunluk ve uzunlukta azalma olduğunu göstermektedir (55). SHANK3 izoformlarının mutasyona uğratıldığı bir başka çalışmada farelerde tekrarlı davranışlar, sosyal davranışta, iletişimde, öğrenme ve bellekte bozulma olduğu, motor koordinasyondaki bozulmanın erkeklerde dişilere göre daha fazla olduğu belirtilmiştir. Hipokampal CA1 sinaptik plastisitesinde ve uzun süreli potansiyasyonda bozulma bulunurken CA1 bölgesi elektron mikroskopi ile incelendiğinde postsinaptik yoğunluk kalınlık ve uzunluk bakımından normal bulunmuştur (102). Çalışmamızda amigdaladaki sinapslar elektron mikroskopik olarak incelenmiş olup erkek EMA grubunda sinaptik uzunluğun kontrole kıyasla kısaldığı, postsinaptik yoğunluğun diğer gruplara göre azaldığı görüldü. Literatürde EMA maruziyetinin sinapsların ultrastrüktürel yapısına etkisinin incelendiği başka çalışma bulunmamaktadır. Bu anlamda başka beyin bölgeleri de incelenerek, EMA maruziyeti ile OSB arasındaki bu tip benzerlikler ayrıntılı olarak değerlendirilebilir.

İnsan SHANK3 duplikasyonunun modellendiği SHANK3 transgenik farelerde eksitator/inhibitör sinaps dengesinin bozulduğu ve manik benzeri davranışların olduğu bulunmuştur. Çalışmada ayrıca duplikasyona sahip insanlara benzer şekilde farelerin sosyal davranış testinde azalmış sosyal etkileşim sergiledikleri belirtilmiştir (103). SHANK3 geni silinmiş ve SHANK3 ekspresyonu yeniden sağlanmış farelerin kullanıldığı çalışmada SHANK3 yeniden ekspresyonunun striatumda sinaptik protein kompozisyonunda, dendritik

diken yoğunluğunda ve nöral fonksiyonda düzelme sağladığı gösterilmiştir. Davranış sonuçları SHANK3 yeniden ekspresyonu sağlanmasının farelerde sosyal davranış bozukluklarının ve tekrarlı grooming davranışının düzelttiğini ancak anksiyete ve motor koordinasyon bozukluğuna olumlu etkisinin olmadığını göstermektedir (56).

Şizofreni ve OSB ile ilişkilendirilen iki farklı alanda SHANK3 mutasyonu geliştirilen farelerde sosyal davranışta bozulma ve anksiyete dışında OSB ilişkili mutantlarda juvenil dönemde sosyal etkileşim ve striatal sinaptik transmisyonunda bozulma, şizofreni ilişkili erişkin mutantlarda prefrontal kortekste sinaptik hasar ile sosyal dominant davranış görülmüştür. OSB ilişkili mutantlarda kortekste SHANK1 ve SHANK2'nin upregülasyonu görülmüştür. Bu durum OSB ilişkili mutantlarda SHANK3 eksikliği ve sinaptik hasarın kortekste eksprese edilen diğer SHANK proteinlerinin upregülasyonu ile dengelenebileceği şeklinde yorumlanmış, upregülasyon ve kompensasyonun mutasyona ve hücre tipi ile beyin bölgesine özgü olabileceği belirtilmiştir (104). Juvenil SHANK3 geni silinmiş erkek farelerin sosyal etkileşimde bozukluk ve tekrarlı grooming davranışı gibi OSB benzeri davranışlar sergiledikleri gösterilmiş, bunun patofizyolojik temeli olarak prefrontal kortekste piramidal nöronlarında aktin disregülasyonu ve NMDA reseptörü hipofonksiyonu öne sürülmüştür. Diğer çalışmalarla kıyaslandığında davranış bozukluklarının kimisinde görülmemesi ya da ılımlı olmasının SHANK3 mutasyonun farklı lokasyonda uygulanması ya da davranış testlerinin uygulama farklılıklarından kaynaklanabileceği belirtilmiştir (105).

Karşıt görüş olarak aynı modelin uygulandığı çalışmaların bir kısmında sosyal davranış açısından fark bulunmamıştır. SHANK3 geninin farelerin ön beyin, striatum ve striatal D1 ve D2 hücrelerinden silindiği çalışmada, striatal inhibitör nöronlarda silindiğinde tekrarlı keşif davranışına, ön beyin eksitator nöronlardan silindiğinde aşırı grooming kaynaklı yaraların oluşumuna neden olurken tüm gruplarda genel olarak sosyal, iletişim ve öğrenme davranışlarında bozulma olmadığı belirtilmiştir. Bu çalışma, OSB ile ilgili davranışlarda kortikal ve striatal nöronlarda SHANK3 fonksiyonlarının farklı olduğunu göstermekte ve bu davranışların altında yatan nöral düzenlenmenin karmaşıklığını yansıtmaktadır (106). SHANK3 mutant farelerin kullanıldığı çalışmada anormal işitsel işleme ile öğrenme ve bellekte bozulma görülmüş, bu bulgunun SHANK3 mutasyonu olan kişilerdeki dil bozukluğu ile ilişkili olabileceği önerilmiştir. Ayrıca farelerin sosyal davranışsal özellikleri de incelenmiş, mutant farelerde sosyal dominantlık ve grooming davranışında artış görülürken sosyal davranış ve

sosyal tanıma testinde kontrole benzer sonuçlar elde edilmiştir. Diğer çalışmalarda görülen sosyal davranışta bozulmanın görülmemesinin uygulanan protokoller arası farklılıklardan olabileceği belirtilmiştir (107).

SHANK3 geni silinen farelerin incelendiği çalışmada hipokampusta sinaptik fonksiyon ve plastisitede bozulma ile birlikte dişi-erkek sosyal etkileşiminde erkeklerin daha az koklama ve ultrasonik vokalizasyon sergilediği ancak sosyal davranışta bir bozulma olmadığı belirtilmiştir. Elde edilen sonuçlar, SHANK3'ün sinaptik fonksiyondaki önemini ve nörogelişimsel bozukluklardaki rolünü gösterir niteliktedir (108). Başka bir çalışmada SHANK3 mutasyona uğratılmış farelerde hipokampus CA1 bölgesinde NMDA/AMPA eksitator postsinaptik akım oranında ve uzun süreli potansiyasyonda azalma ile hipokampusa bağlı spasyal öğrenme ve bellekte bozulma olduğu bulunmuştur. Fareler ayrıca motor koordinasyon bozukluğu, ısıya aşırı duyarlılık, yenilikten kaçınma, yeniliğe lokomotif tepki gösterirken sosyal davranış testinden elde edilen normal bulgulara karşı sosyal yenilik testinde tercihin olmaması nedeniyle minimal sosyal anormallikler sergilemektedir (109). SHANK3 mutasyonunun etkilerinin incelendiği çalışmada farelerde kortikal tabakalar, striatum, hipokampus ve talamusta SHANK3 protein varyantlarının arttığı; SHANK3 proteininin hipokampusta 2-4. kortikal tabakalarda 5 ve 6'ya göre, CA1 ve dentat girusta CA3 bölgesine göre daha fazla olduğu; hipokampus CA1 bölgesinde eksitator transmisyon azalırken piramidal nöronlarda inhibitör sinapsların arttığı bulunmuştur. Mutant farelerin OSB benzeri davranış sergileyip sergilemediğine bakıldığında sosyal davranış, sosyal yenilik tercihi ve sosyal iletişim testlerinin normal olduğu görülmüş, OSB benzeri davranışa rastlanmadığı ancak spasyal öğrenmedeki bozukluğun eksitator/inhibitör sinaps dengesizliğinden dolayı olabileceği belirtilmiştir (110). SHANK3 geni silinmiş sıçanların kullanıldığı çalışmada hipokampusta sinaptik fonksiyon ve plastisitede bozulmaya ek olarak sosyal hafıza ile öğrenme ve bellekte bozulma, anksiyete benzeri davranış ve mekanik ağrı eşiğinde artış, termal histe azalma görülmüştür. Çalışmada SHANK3 geni silinmiş sıçanlarda farelerde görülen sosyal davranışta bozulmanın olmadığı, bunun nedeninin türe özgü farklardan, farklı genetik altyapıdan, kullanılan hayvanların farklı yaşta olmalarından kaynaklanabileceği belirtilmiştir (111).

OSB hayvan modellerinde dişi ve erkekler arasında farkın gösterildiği çalışmalar literatürde yer almaktadır. SHANK3B geni silinmiş juvenil farelerin kullanıldığı çalışmada sosyal davranış testinde erkekler alan seçimi yapmazken dişilerde bu bozukluk görülmemiştir.

Dişilerin sosyal davranış testinde mikro davranışları incelendiğinde şahlanma, temas ve koklamada azalma, grooming süresinde artış bulunmuştur. Davranış testlerinde dişi ve erkekler arasında insanlardaki gibi farklar olabileceği için OSB benzeri davranışlar mikro davranışların da incelenmesi gerektiğine dikkat çekilmiştir (112). SHANK3 geni silinmiş sıçanların incelendiği çalışmada sosyal davranış ve motor aktivitenin etkilenmediği, erkeklerde juvenil sosyal oyun etkileşimi ve vokalizasyonda bozulma olduğu bildirilmiştir. Literatürde fare modellerinde görülen sosyal davranış bozukluğunun görülmemesi nedeninin sıçanların belirli gelişimsel dönemlerde daha fazla davranış sergilemesi ya da sıçanların çok daha karmaşık davranışsal özelliklere sahip olması nedeniyle olabileceği düşünülmektedir (113). Çalışmamızda diğer çalışmalara benzer olarak dişi ve erkekler ayrı ayrı incelendi. SHANK3'ün hipokampustaki düzeyleri incelendiğinde dişilerde ve erkeklerde EMA ve EMA+Çinko grubunda kontrol grubuna göre düşük düzeyler görülürken, erkeklerde beklenmedik şekilde EMA grubunda EMA+Çinko grubuna göre yüksek olduğu görüldü. Ayrıca hipokampusta EMA+Çinko gruplarında dişilerin erkeklere göre daha yüksek SHANK3 ekspresyonuna sahip olduğu görüldü.

Otizm ile birlikte görülen, SHANK3'ün bir kopyası bulunmayan ya da mutasyonlu olan nadir genetik hastalıklardan Phelan-McDermid sendromu için geliştirilen genetiği değiştirilmiş fare modelleri kullanılan çalışmada çeşitli davranış testleri uygulanmıştır. Farelerin koklama ve ultrasonik vokalizasyonları incelendiğinde sonuçlar ılımlı bozukluk olarak değerlendirilirken sosyal davranışta bozulma olmadığı belirtilmiştir. Hipreaktivite, anksiyete, tekrarlı davranışlar ve artmış donma davranışının amigdala ile ilişkili bir bozulmadan kaynaklanmış olabileceği ve bunun araştırılması gerektiğine dikkat çekilmiştir. Çalışmada ayrıca zihinsel engeli ve OSB olan kişilerde görülen bozukluklara benzer olarak farelerde hipokampus ilişkili öğrenme ve bellek ile bilişsel bozuklukların görüldüğü, bu fare modellerinin OSB nörobiyolojik temelini araştırılmasında kullanılabileceği belirtilmiştir (114). Çalışmamız SHANK3 amigdala düzeylerinin dişi EMA grubunda kontrol grubuna göre düşük olduğunu göstermektedir. Literatürde amigdala ile ilgili bu alanda çalışma sayısı kısıtlı olduğu için daha ayrıntılı araştırılması, dişi ve erkeklerdeki farkların incelenmesi faydalı olacaktır.

Genetik olarak indüklenmiş OSB modeli çalışmalarının bir kısmı NLGN3 ile gerçekleştirilmiştir. NLGN3 geni silinmiş erkek sıçanların kullanıldığı çalışmada juvenil oynama davranışında bozulma, tekrarlı davranışlar ve sensorimotor bozulma olduğu

belirtilmiştir. Çalışmada beklenin aksine sosyal davranışta bulunmamasının, sıçanlar ile fareler arasında yaşa bağlı juvenil dönemdeki oynama davranışı farkları nedeniyle olabileceği düşünülmektedir (115). NLGN3 mutasyonunun somatosensör korteks ve hipokampustaki sinaptik transmisyonu etkilediği bilinmektedir. Sendromik olmayan otizm modeli olarak NLGN3 mutant farelerin kullanıldığı çalışmada farelerde hetero-sinaptik rekabet ve metabotropik glutamat reseptörüne bağlı sinaptik plastisitede bozulma görülmüştür. Çalışmada aynı zamanda metabotropik glutamat reseptörü antagonisti tedavi amaçlı kullanılmış ve sadece işlevsel değişiklikler değil, aynı zamanda ektopik sinaps oluşumunun da tersine çevrilebileceği, yapısal nörogelişimsel fenotiplerin gelişim tamamlandıktan sonra da müdahale ile kurtarılabileceği belirtilmiştir (116).

NLGN3 mutant farelerin kullanıldığı çalışmada farelerde sosyal davranışta bozulmaya ek olarak spasyal öğrenme kabiliyetinde artış ile eksitator sinapslar etkilenmezken inhibitör sinaptik transmisyonda artış görülmüş ve bu durumun davranışa yansıdığı düşünülmüştür. Elektron mikroskopik değerlendirmede ise somatosensoriyal kortekste sinaps sayısı, simetrik/asimetrik sinaps sayısı, postsinaptik yoğunluk ve sinaptik vezikül yoğunluğu açısından kontrolle mutant fareler arasında anlamlı fark bulunmamıştır. Bu durum, mutasyonun sinaps sayısını etkilemediği, sinaptik güçte bozulmaya neden olduğu şeklinde yorumlanmıştır (117).

Çalışmamızda hipokampus NLGN3 düzeyleri incelendi. Dişi ve erkeklerde tüm maruziyet gruplarında NLGN3 düzeyleri kontrole göre anlamlı olarak düşük bulundu.

OSB hayvan modeli için çok kullanılan bir diğer yöntem de prenatal dönemde gebe sıçana valproik asit uygulanmasıdır. Prenatal valproik asit uygulanan gebe sıçanların yavrularında sosyal davranışta ve hipokampusta sosyal davranışla ilişkili gen ekspresyonunda bozulma olduğu belirtilmiştir. Çalışmada sosyalleşme ve sosyal yenilik seçimi testlerinde dişi ve erkeklerin tercih yapmamaları, sosyalleşmenin azaldığını ve sosyal yenilik seçimi davranışının bozulduğunu göstermektedir. Dişi ve erkeklerde hipokampusta NLGN3 mRNA ekspresyon seviyelerinin kontrollere göre düşük bulunması nedeniyle hipokampusun valproik asit ile indüklenmiş otizm modelinde sosyal davranış açısından önemli bir merkez olduğu belirtilmiştir (118). Prenatal valproik asit uygulanan juvenil erkek sıçanların anksiyete, tekrarlı davranışlar ve sosyal davranışta bozulma sergilediği, görülen OSB benzeri davranışların hipokampustaki glutamat reseptörlerinin aşırı fonksiyonundan dolayı olabileceği belirtilmiştir (119). Postnatal 2-4. günler arasında valproik asit uygulamasının yavrularda hiperaktivite (açık

alan testi), anksiyete (yükseltilmiş artı labirent testi) ve sosyal davranış ile sosyal yenilik tercihi testlerinde bozulma görüldüğü için otizm benzeri davranışlara neden olduğu bulunmuştur (120). Prenatal valproik asit uygulanan farelerde NLGN1-3 ve NRXN1-3 ekspresyonları incelenmiş ve sadece NLGN3 mRNA ekspresyonu hipokampusta CA1 ve dentat girus ile somatosensoriyal kortekste anlamlı olarak düşük bulunmuş, bu durumun OSB benzeri davranış fenotipi ile ilişkili olabileceği belirtilmiştir (121).

Prenatal valproik asit uygulamasının yavru sıçanların gelişimine etkisinin incelendiği çalışmada erkeklerde sosyal davranışta bozulma, dişilerde anksiyetede artış olduğu ve bu nedenle davranışa etkisinin cinsiyete bağlı olduğu belirtilmiştir. Amigdala, gelişimin ilk iki haftasında önemli fonksiyonel, morfolojik ve fizyolojik olgunlaşma geçirdiğinden ve sosyoduygusal davranışı önemli ölçüde değiştirebildiğinden erkeklerin amigdala örneklerindeki genetik düzenlenmeler incelenmiştir. Postnatal 10. günde gen ekspresyon düzeyleri incelenmiş ve sinir sistemine ve hücrel gelişime katılan gen yollarının aktivasyonunun normal olduğu, ancak juvenil dönemde transkriptomik ve proteomik yollar incelendiğinde hücrel büyüme ve nöral gelişimde azalma görülmüştür (122). Prenatal valproik asit uygulamasının etkilerinin incelendiği çalışmada erkek yavrularda sosyal davranışta bozulma, serebral korteks ve hipokampusta postsinaptik protein ekspresyonunda artış ve elektron mikroskopik incelemede dört haftalık erkek yavrularda prefrontal kortekste sinaps sayısında artış görülmüştür. Sonuçlardan yola çıkılarak valproik asit ile indüklenmiş OSB modelinin insanlardaki cinsiyete bağlı görülme sıklığını yansıttığı ve bunun erkeklerdeki glutamaterjik sinaps sayısının artışına bağlı olabileceği belirtilmiştir (123).

Son zamanlarda OSB ve çinko ilişkisi tartışılmakta olup bu alanda yapılan çalışmalar prenatal çinko eksikliği ile indüklenmiş OSB modelinin kullanılmasını sağlamıştır. OSB davranış modeli sergileyen prenatal çinko eksikliği uygulanan hayvanların kullanıldığı çalışmada literatürle uyumlu olarak fare beyinde çinkonun eşit dağılım göstermediği sonucu elde edilmiştir. Bu durumun sadece lateralizasyon sonucu olmadığı, aynı zamanda çinkonun bölgeye özgü sinaps oluşumunun teşviki ile lateralizasyonda düzenleyici etkisinin olabileceği düşünülmüştür. Ayrıca gelişimin ileri aşamalarında sinaptik veziküller çinko ile dolu olduğundan, postsinaptik bileşen olarak çinkonun lateralizasyonda rolü olabileceği öne sürülmüştür. Çalışma ile gelişim sırasında beyin lateralizasyonunun oluşmasında çinkonun yeni bir rolü ileri sürülmektedir. Prenatal çinko eksikliği olan hayvanlarda görülen beyin

fonksiyonları ve lateralizasyondaki bozulmanın OSB benzeri davranışlar ile ilişkili olabileceği belirtilmiştir (124). Prenatal çinko eksikliği uygulanan farelere erişkin olduklarında davranış testleri yapılmış ve sosyal davranışta bozulma, anksiyetede artış ve kognitif olarak bozulma olduğu bulunmuştur. Çalışma OSB'ye özgü genetik duyarlılığı olmadan, prenatal çinko eksikliği ile OSB benzeri davranışların görülebileceğini gösterirken çinkonun düşük biyoyararlanımının insanlarda otizm oluşumu ile ilişkisi, pre- ve perinatal çinko durumunun bozukluğun gelişim üzerinde önemli bir etkisi olduğuna dikkat çekmektedir (17). Prenatal çinko eksikliği uygulanan sıçanlarda serum çinko seviyelerinde düşüş, hipokampal nöronlarda morfolojik bozulma ile öğrenme ve bellekte bozulma saptanmıştır. Çinkonun oksidatif stres hasarını sınırladığı böylece apoptoz ile sonuçlanan sinyal yollarını bastırdığı, çinko takviyesinin hipokampal disfonksiyonunu tersine çevirdiği ve bu beyin bölgesinin fizyolojik nörotransmisyonunu şekillendirmede sinaptik çinkonun önemi vurgulanmıştır (125).

Çalışmamızda plazma çinko düzeylerini incelediğimizde çinko düzeyini dişilerde tüm maruziyet gruplarında kontrole göre düşük, erkeklerde ise sadece EMA grubunda kontrole göre düşük bulduk. Dişi ve erkekler arası karşılaştırma yapıldığında çinko gruplarında dişilerde erkeklere göre daha yüksek plazma çinko düzeyi saptandı. Cinsiyete bağlı bu farklılıkların altında yatan nedenlerin daha ayrıntılı olarak incelenmesi gerekmektedir.

Çinko takviyesinin OSB için koruyucu özellikleri olduğundan tedavi olarak önerildiği çalışmalar bulunmaktadır. OSB modeli olarak SHANK2'den yoksun farelerin kullanıldığı çalışmada çinko şelatörü ve iyonofor özellikteki clioquinol ile transsinaptik çinko mobilizasyonu indüklenmiş, farelerde görülen sosyal davranış ve sosyal yenilik tercihi bozukluklarında düzelme olduğu belirtilmiştir (126). OSB modeli olarak kullanılan SHANK3 geni silinmiş farelere 6 hafta boyunca çinko takviyesi verilmiş ve OSB benzeri tekrarlı davranışlar ve anksiyete davranışları ile sosyal davranıştaki bozulmalar önlenmiştir. Çinko takviyesinin, sinaptik çinko sinyal sisteminin işlevselliğini değiştirerek SHANK3 fonksiyonunun azaldığı sinapslarda sinaptik fonksiyonları etkilediği düşünülmektedir. Çinko takviyesi, sinaptik fonksiyon ve davranışı etkilediği için OSB için potansiyel tedavi aracı olabileceğine dikkat çekilmektedir (127).

Çalışmamızda prefrontal korteks NLGN3 düzeyleri incelendiğinde erkek EMA grubu, erkek EMA+Çinko grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu. Bu bulgu EMA maruziyetiyle bozulan NLGN3 düzeyinin çinko ile düzeltilebileceğini düşündürmektedir. Dişilerde ise çinko

grubunda amigdaladaki NLGN3'ün EMA ve EMA+çinko grubuna göre fazla olduğu görüldü. Dişi ve erkekler arasındaki farklar incelendiğinde prefrontal kortekste NLGN3 düzeyleri EMA+çinko gruplarında erkeklerde, çinko gruplarında ise dişilerde yüksek bulundu. Bu bulgular dişi ve erkeklerde çinko etkisinin farklı bölgelerde farklı düzeylerde olabileceğini göstermektedir. Bu durumun cinsiyete bağlı olarak çinko biyoyararlanımında farklılıklar gösterip göstermediğinin araştırılması faydalı olacaktır.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Günümüzde elektrikli cihazların kullanımının artması sonucunda EMA'ya maruz kalım da artmaktadır. EMA'a maruz kalma ve birçok hastalığın gelişim riski arasında ilişki bulunması konuyu toplumsal sorun haline getirmektedir. Bazı epidemiyolojik çalışmalar EMA'ya maruz kalma ile çeşitli kanser türleri arasında korelasyon bulunduğunu göstermektedir. Son yıllarda artan otizm benzeri davranış bozuklukları ile bebeklik döneminden itibaren maruz kalınan elektrikli-elektronik cihazlar arasında ilişki olduğu ileri sürülmekte ve deneysel çalışmalar ile bağlantıları ortaya konmaya çalışılmaktadır. EMA maruziyetinden kaçınmak mümkün olmadığı için yol açtığı yapısal ve davranışsal zararların azaltılması veya önlenmesi gerekmektedir.

Bu çalışmada, intrauterin ve postnatal laktasyon süresince maruz kalınan EMA'nın adölesan dönemde yavru sıçanlar üzerindeki davranışsal etkileri sosyal davranış deneyi, açık alan, yükseltilmiş artı labirent ve zorlu yüzme testi kullanılarak değerlendirildi. Ayrıca prenatal dönemde kullanılan çinko desteğinin etkileri ve SHANK3 ve NLGN3 sinaptik proteinlerinin aracı rolleri araştırıldı. Sosyal davranış testi, EMA maruziyetinin genel olarak sosyal davranış üzerine etkisi olmadığını, dişi yavrularda aktivite ve keşif davranışını olumsuz yönde etkilediğini göstermektedir. Açık alan ve yükseltilmiş artı labirent testi sonuçları prenatal ve postnatal EMA maruziyetinin anksiyete oluşumunu artırabileceğini, bununla birlikte çinko desteğinin dişi yavrularda kısmi olarak olumlu etki sağlarken, erkek yavrularda olumlu etki sağlamadığını göstermektedir. Zorlu yüzme testi sonuçları EMA'nın adölesan dönemde depresif davranışa yol açmadığını göstermektedir. Çalışmanın bulguları erkek yavruların dişi yavrulara göre daha fazla etkilenebildiğini göstermektedir. Mekanizma ile ilişkili olarak değerlendirilen SHANK3 ve NLGN3 proteinleri EMA gruplarında anlamlı olarak düşük bulunurken, yine çinko desteğinin olumlu etki oluşturmadığı görülmüştür. Çalışmamız EMA maruziyetinin sosyal davranışa ve moleküler düzeyde sinaptik düzenlenmedeki cinsiyete bağlı etkilerinin incelendiği ilk çalışmadır.

Sonuç olarak EMA maruziyeti gelişen beyinde sinaptik proteinlerin seviyelerini değiştirerek cinsiyet farkıyla birlikte davranışsal değişikliklere yol açabilir. Farklı dozlarda kullanılabilecek çinko desteği, EMA'ya bağlı davranışsal ve yapısal etkilerin değerlendirilmesi açısından daha yararlı olacaktır. İleri çalışmalar gebelik döneminde kullanılan doğal destek

ürünler ile EMA maruziyetinin yol açacağı zararlı sonuçların engellenmesi veya azaltılması açısından yol gösterici olacaktır.



7. KAYNAKLAR

1. Divan HA, Kheifets L, Obel C, Olsen J. Prenatal and Postnatal Exposure to Cell Phone Use and Behavioral Problems in Children. *Epidemiology*. 2008;19(4):523-529.
2. Divan HA, Kheifets L, Obel C, Olsen J. Cell phone use and behavioural problems in young children. *J Epidemiol Community Health*. 2012;66(6):524-529.
3. Vrijheid M, Martinez D, Forns J, et al. Prenatal Exposure to Cell Phone Use and Neurodevelopment at 14 Months. *Epidemiology*. 2010;21(2):259-262.
4. Byun Y-H, Ha M, Kwon H-J, et al. Mobile Phone Use, Blood Lead Levels, and Attention Deficit Hyperactivity Symptoms in Children: A Longitudinal Study. *PLoS One*. 2013;8(3):e59742.
5. Calvente. I, Pérez-Lobato RL, Núñez MI, et al. Does exposure to environmental radiofrequency electromagnetic fields cause cognitive and behavioral effects in 10-year-old boys? *Bioelectromagnetics*. 2016;37(1):25-36.
6. Kane RC. A possible association between fetal/neonatal exposure to radiofrequency electromagnetic radiation and the increased incidence of Autism Spectrum Disorders (ASD). *Med Hypotheses*. 2004;62(2):195-197.
7. Herbert MR, Sage C. Autism and EMF? Plausibility of a pathophysiological link - Part II. *Pathophysiology*. 2013;20(3):211-234.
8. Herbert MR, Sage C. Autism and EMF? Plausibility of a pathophysiological link - Part I. *Pathophysiology*. 2013;20(3):191-209.
9. Alsaeed I, Al-somali F, Sakhnini L, et al. Autism-relevant social abnormalities in mice exposed perinatally to extremely low frequency electromagnetic fields. *Int J Dev Neurosci*. 2014;37:58-64.
10. Bourgeron T. A synaptic trek to autism. *Curr Opin Neurobiol*. 2009;19(2):231-234.
11. Monteiro P, Feng G. SHANK proteins: roles at the synapse and in autism spectrum disorder. *Nat Rev Neurosci*. 2017;18(3):147-157.
12. Baig DN, Yanagawa T, Tabuchi K. Distortion of the normal function of synaptic cell

- adhesion molecules by genetic variants as a risk for autism spectrum disorders. *Brain Res Bull.* 2017;129:82-90.
13. Yasuda H, Tsutsui T. Assessment of infantile mineral imbalances in autism spectrum disorders (ASDs). *Int J Environ Res Public Health.* 2013;10(11):6027-6043.
 14. Grabrucker AM. Environmental factors in autism. *Front Psychiatry.* 2013;3(JAN):1-13.
 15. Arora M, Reichenberg A, Willfors C, et al. Fetal and postnatal metal dysregulation in autism. *Nat Commun.* 2017;8:15493.
 16. Grabrucker S, Jannetti L, Eckert M, et al. Zinc deficiency dysregulates the synaptic ProSAP/Shank scaffold and might contribute to autism spectrum disorders. *Brain.* 2014;137(1):137-152.
 17. Grabrucker S, Boeckers TM, Grabrucker AM. Gender Dependent Evaluation of Autism like Behavior in Mice Exposed to Prenatal Zinc Deficiency. *Front Behav Neurosci.* 2016;10(37):1-15.
 18. www.who.int/peh-emf/about/WhatisEMF/en/ Erişim tarihi 12.02.2018.
 19. World Health Organisation, *Extremely Low Magnetic Fields.* 2007.
 20. <https://www.niehs.nih.gov/health/topics/agents/emf/> Erişim tarihi 12.02.2018.
 21. Halliday D, Resnick R, Walker J. Principles of Physics, 9th Edition, John Wiley & Sons, 2010, 764-778.
 22. SCENIHR. *Potential Health Effects of Exposure to Electromagnetic Fields (EMF).*; 2015.
 23. Singh S, Kapoor N. Health Implications of Electromagnetic Fields, Mechanisms of Action, and Research Needs. *Adv. Biol.* 2014;2014:1–24.
 24. Belyaev I, Dean A, Eger H, Hubmann G, Jandrisovits R, Kern M, Kundi M, Moshhammer H, Lercher P, Müller K, Oberfeld G, Ohnsorge P, Pelzmann P, Scheingraber C, Thill R. EUROPAEM EMF Guideline 2016 for the prevention, diagnosis and treatment of EMF-related health problems and illnesses. *Rev. Environ. Health.* 2016;31(3):363–397.
 25. Mausset-Bonnefont AL, Hirbec H, Bonnefont X, Privat A, Vignon J, De Sèze R. Acute

- exposure to GSM 900-MHz electromagnetic fields induces glial reactivity and biochemical modifications in the rat brain. *Neurobiol Dis.* 2004;17(3):445-454.
26. Sieroń A, Labus Ł, Nowak P, et al. Alternating extremely low frequency magnetic field increases turnover of dopamine and serotonin in rat frontal cortex. *Bioelectromagnetics.* 2004;25(6):426-430.
 27. Salunke BP, Umathe SN, Chavan JG. Involvement of NMDA receptor in low-frequency magnetic field-induced anxiety in mice. *Electromagn Biol Med.* 2014;33(4):312-326.
 28. Ezz HSA, Khadrawy YA, Ahmed NA, Radwan NM, Bakry MME. The effect of pulsed electromagnetic radiation from mobile phone on the levels of monoamine neurotransmitters in four different areas of rat brain. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2013;17(13):1782-1788.
 29. Wang H, Peng R, Zhou H, et al. Impairment of long-term potentiation induction is essential for the disruption of spatial memory after microwave exposure. *Int J Radiat Biol.* 2013;89(12):1100-1107.
 30. Li HJ, Peng RY, Wang CZ, et al. Alterations of cognitive function and 5-HT system in rats after long term microwave exposure. *Physiol Behav.* 2015;140:236-246.
 31. Kim JH, Yu D-H, Huh YH, Lee EH, Kim H-G, Kim HR. Long-term exposure to 835 MHz RF-EMF induces hyperactivity, autophagy and demyelination in the cortical neurons of mice. *Sci Rep.* 2017;7(January):41129.
 32. Fournier NM, Mach QH, Whissell PD, Persinger MA. Neurodevelopmental anomalies of the hippocampus in rats exposed to weak intensity complex magnetic fields throughout gestation. *Int J Dev Neurosci.* 2012;30(6):427-433.
 33. Aldad TS, Gan G, Gao X-B, Taylor HS. Fetal Radiofrequency Radiation Exposure From 800-1900 Mhz-Rated Cellular Telephones Affects Neurodevelopment and Behavior in Mice. *Sci Rep.* 2012;2(December 2008).
 34. Balassa T, Varró P, Elek S, et al. Changes in synaptic efficacy in rat brain slices following extremely low-frequency magnetic field exposure at embryonic and early postnatal age. *Int J Dev Neurosci.* 2013;31(8):724-730.

35. Haghani M, Shabani M, Moazzami K. Maternal mobile phone exposure adversely affects the electrophysiological properties of Purkinje neurons in rat offspring. *Neuroscience*. 2013;250:588-598.
36. Razavinasab M, Moazzami K, Shabani M. Maternal mobile phone exposure alters intrinsic electrophysiological properties of CA1 pyramidal neurons in rat offspring. *Toxicol Ind Health*. 2014;32(6):968-979.
37. Othman H, Ammari M, Sakly M, Abdelmelek H. Effects of prenatal exposure to WIFI signal (2.45 GHz) on postnatal development and behavior in rat: Influence of maternal restraint. *Behav Brain Res*. 2017;326:291-302.
38. Szemerszky R, Zelena D, Barna I, Bárdos G. Stress-related endocrinological and psychopathological effects of short- and long-term 50 Hz electromagnetic field exposure in rats. *Brain Res Bull*. 2010;81(1):92-99.
39. Kitaoka K, Kitamura M, Aoi S, Shimizu N, Yoshizaki K. Chronic exposure to an extremely low-frequency magnetic field induces depression-like behavior and corticosterone secretion without enhancement of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in mice. *Bioelectromagnetics*. 2013;34(1):43-51.
40. Ballios BG, Baumann MD, Cooke MJ, Shoichet MS, *Central Nervous System*, Second Edi. Elsevier Inc., 2011.
41. Ovalle W, Nahirney P. Netter Temel Histoloji, Güneş Tıp Kitabevleri, 2009, 105.
42. Gartner LP, Hiatt, JL. Renkli Histoloji Atlası, Dördüncü Baskı, Güneş Tıp Kitabevleri, 2009, 129.
43. Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, Siegelbaum SA, Hudspeth AJ. Principles of Neural Science, Fifth Edition, McGraw-Hill, 2013, 342-350.
44. Barha CK, Nagamatsu LS, Liu-Ambrose T. *Basics of Neuroanatomy and Neurophysiology*. Vol 138. 1st ed. Elsevier B.V.; 2016. doi:10.1016/B978-0-12-802973-2.00004-5
45. Krebs C, Weinberg J, Akesson E. Lippinkott's Illustrated Review of Neuroscience, Lippincott Williams & Wilkins, 2012, 253, 377-381.

46. Bear MF, Connors BW, Paradiso MA. Neuroscience Exploring the Brain, Third Edition, Lippincott Williams & Wilkins, 2007, 40, 109, 777.
47. Harris KM, Weinberg RJ. Ultrastructure of synapses in the mammalian brain. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012;4(5):7.
48. Eapen V, Nicholls L, Spagnol V, Mathew NE. Current status of biological treatment options in Autism Spectrum Disorder. *Asian J Psychiatr.* 2017;30(June 2017):1-10.
49. Silverman JL, Yang M, Lord C, Crawley JN. Behavioural phenotyping assays for mouse models of autism. *Nat. Rev. Neurosci.* 2010;11(7):490–502.
50. Crawley JN. Translational animal models of autism and neurodevelopmental disorders. *Dialogues Clin Neurosci.* 2012;14(3):293-305.
51. Kas MJ, Glennon JC, Buitelaar J, et al. Assessing behavioural and cognitive domains of autism spectrum disorders in rodents : current status and future perspectives. 2014:1125-1146.
52. Fernández M, Mollinedo-Gajate I, Peñagarikano O. Neural Circuits for Social Cognition: Implications for Autism. *Neuroscience.* 2018;370:148–162.
53. Crawley JN. Designing mouse behavioral tasks relevant to autistic-like behaviors. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev.* 2004;10(4):248-258.
54. Cao X, Tabuchi K. Functions of synapse adhesion molecules neurexin/neurexins and neurodevelopmental disorders. *Neurosci Res.* 2016;116:3-9.
55. Peça J, Feliciano C, Ting JT, et al. Shank3 mutant mice display autistic-like behaviours and striatal dysfunction. *Nature.* 2011;472(7344):437-442.
56. Mei Y, Monteiro P, Zhou Y, et al. Adult restoration of Shank3 expression rescues selective autistic-like phenotypes. *Nature.* 2016;530(7591):481-484.
57. Cochoy DM, Kolevzon A, Kajiwarra Y, et al. Phenotypic and functional analysis of SHANK3 stop mutations identified in individuals with ASD and/or ID. *Mol Autism.* 2015;6:23.
58. Keller R, Basta R, Salerno L, Elia M. Autism, epilepsy, and synaptopathies: a not rare

- association. *Neurol Sci.* 2017;38(8):1353-1361.
59. Saghazadeh A, Ahangari N, Hendi K, Saleh F, Rezaei N. Status of essential elements in autism spectrum disorder: systematic review and meta-analysis. *Rev. Neurosci.* 2017;0(0):274–278.
 60. Arons MH, Lee K, Thynne CJ, et al. Shank3 Is Part of a Zinc-Sensitive Signaling System That Regulates Excitatory Synaptic Strength. *J Neurosci.* 2016;36(35):9124-9134.
 61. Tao-Cheng JH, Toy D, Winters CA, Reese TS, Dosemeci A. Zinc Stabilizes Shank3 at the Postsynaptic Density of Hippocampal Synapses. *PLoS One.* 2016;11(5):e0153979.
 62. Ha HTT, Leal-Ortiz S, Lalwani K, Kiyonaka S, Hamachi I, Mysore SP, Montgomery JM, Garner CC, Huguenard JR and Kim SA. Shank and Zinc Mediate an AMPA Receptor Subunit Switch in Developing Neurons. *Front. Mol. Neurosci.* 2018;11(November):1–30.
 63. Pfaender S, Sauer AK, Hagmeyer S, et al. Zinc deficiency and low enterocyte zinc transporter expression in human patients with autism related mutations in SHANK3. *Sci Rep.* 2017;7(March):45190.
 64. Kirsten TB, Chaves-Kirsten GP, Bernardes S, et al. Lipopolysaccharide exposure induces maternal hypozincemia, and prenatal zinc treatment prevents autistic-like behaviors and disturbances in the striatal dopaminergic and mtor systems of offspring. *PLoS One.* 2015;10(7):1-18.
 65. Kirsten TB, Queiroz-Hazarbassanov N, Bernardi MM, Felicio LF. Prenatal zinc prevents communication impairments and BDNF disturbance in a rat model of autism induced by prenatal lipopolysaccharide exposure. *Life Sci.* 2015;130:12-17.
 66. Cezar LC, Kirsten TB, da Fonseca CCN, de Lima APN, Bernardi MM, Felicio LF. Zinc as a therapy in a rat model of autism prenatally induced by valproic acid. *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry.* 2018;84(February):173–180.
 67. Yasuda H, Yoshida K, Yasuda Y, Tsutsui T. Infantile zinc deficiency: Association with autism spectrum disorders. *Sci Rep.* 2011;1(1):129.
 68. Faber S, Zinn GM, Kern JC, Skip Kingston HM. The plasma zinc/serum copper ratio as

- a biomarker in children with autism spectrum disorders. *Biomarkers*. 2009;14(3):171–180.
69. Li K, Li L, Cui B, Gai Z, Li Q, Wang S, Yan J, Lin B, Tian L, Liu H, Liu X, Xi Z. Early Postnatal Exposure to Airborne Fine Particulate Matter Induces Autism-like Phenotypes in Male Rats. *Toxicol. Sci*. 2018;162(1):189–199.
 70. Weng Z, Liu Z, Zhang S, Tao H, Ji X. Zinc protection in fetal rats for maternal mercury exposure-induced growth retardation is probably associated with S100B expression. *J Obstet Gynaecol Res*. 2017;43(1):73-77.
 71. Fathi E, Farahzadi R. Zinc Sulphate Mediates the Stimulation of Cell Proliferation of Rat Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells Under High Intensity of EMF Exposure. *Biol. Trace Elem. Res*. 2018;184(2):529–535.
 72. Li K, Ma S, Ren D, Li Y, Ding G, Liu J, Guo Y, Guo G. Effects of electromagnetic pulse on serum element levels in rat *Biol. Trace Elem. Res*. 2014;158(1):81–86.
 73. Tayefi H, Kiray A, Kiray M, et al. The effects of prenatal and neonatal exposure to electromagnetic fields on infant rat myocardium. *Arch Med Sci*. 2010;6(6):837-842.
 74. Kiray A, Tayefi H, Kiray M, et al. The effects of exposure to electromagnetic field on rat myocardium. *Toxicol Ind Health*. 2013;29(5):418-425.
 75. Fiorillo F. Magnetic field sources. *Green Energy Technol*. 2015;179:39-95.
 76. Moy SS, Nadler JJ, Perez A, et al. Sociability and preference for social novelty in five inbred strains: an approach to assess autistic-like behavior in mice. *Genes, Brain Behav*. 2004;3:287-302.
 77. Liu T, Wang S, He L, Ye K. Anxiogenic effect of chronic exposure to extremely low frequency magnetic field in adult rats. *Neurosci Lett*. 2008;434(1):12-17.
 78. Balassa T, Szemerszky R, Bardos G. Effect of short-term 50 Hz electromagnetic field exposure on the behavior of rats. *Acta Physiol Hung*. 2009;96(4):437-448.
 79. Djordjevic NZ, Paunović MG, Peulić AS. Anxiety-like behavioural effects of extremely low-frequency electromagnetic field in rats. *Environ Sci Pollut Res*. 2017;24(27):21693-

21699.

80. Asaad KS, Salehi I, Shykhi T, Zare S, Komaki A. Effects of exposure to extremely low-frequency electromagnetic fields on spatial and passive avoidance learning and memory, anxiety-like behavior and oxidative stress in male rats. *Behav Brain Res*. 2018;(July):1-9.
81. Salunke BP, Umathe SN, Chavan JG. Behavioral in-effectiveness of high frequency electromagnetic field in mice. *Physiol Behav*. 2015;140:32-37.
82. Barthelemy A, Mouchard A, Bouji M, Blazy K, Puigsegur R, Villegier AS. Glial markers and emotional memory in rats following acute cerebral radiofrequency exposures. *Environ Sci Pollut Res*. 2016;23(24):25343-25355.
83. Júnior LC de C, Guimarães E da SG, Musso CM, et al. Behavior and memory evaluation of Wistar rats exposed to 1.8 GHz radiofrequency electromagnetic radiation. *Neurol Res*. 2014;36(9):800-803.
84. Othman H, Ammari M, Sakly M, Abdelmelek H. Effects of repeated restraint stress and WiFi signal exposure on behavior and oxidative stress in rats. *Metab Brain Dis*. 2017.
85. Lai J, Zhang Y, Liu X, et al. Effects of extremely low frequency electromagnetic fields (100µT) on behaviors in rats. *Neurotoxicology*. 2016;52:104-113.
86. Burman O, Marsella G, Clemente A Di, Cervo L. The effect of exposure to low frequency electromagnetic fields (EMF) as an integral part of the housing system on anxiety-related behaviour, cognition and welfare in two strains of laboratory mouse. *PLoS One*. 2018;13(5):1-14.
87. Vázquez-García M, Elías-Viñas D, Reyes-Guerrero G, Domínguez-González A, Verdugo-Díaz L, Guevara-Guzmán R. Exposure to extremely low-frequency electromagnetic fields improves social recognition in male rats. *Physiol Behav*. 2004;82(4):685-690.
88. Bernal-Mondragón C, Arriaga-Avila V, Martínez-Abundis E, Barrera-Mera B, Mercado-Gómez O, Guevara-Guzmán R. Effects of repeated 9 and 30-day exposure to extremely low-frequency electromagnetic fields on social recognition behavior and estrogen

- receptors expression in olfactory bulb of Wistar female rats. *Neurol Res.* 2017;39(2):165-175.
89. Rostami A, Shahani M, Zarrindast MR, et al. Effects of 3 Hz and 60 Hz extremely low frequency electromagnetic fields on anxiety-like behaviors, memory retention of passive avoidance and electrophysiological properties of male rats. *J Lasers Med Sci.* 2016;7(2):120-125.
 90. Wang K, Lu JM, Xing ZH, et al. Effect of 1.8 GHz radiofrequency electromagnetic radiation on novel object associative recognition memory in mice. *Sci Rep.* 2017;7(February):1-12.
 91. Kumari K, Koivisto H, Myles C, et al. Behavioural phenotypes in mice after prenatal and early postnatal exposure to intermediate frequency magnetic fields. *Environ Res.* 2018;162(August 2017):27-34.
 92. Shirai T, Imai N, Wang J, et al. Multigenerational effects of whole body exposure to 2.14 GHz W-CDMA cellular phone signals on brain function in rats. *Bioelectromagnetics.* 2014;35(7):497-511.
 93. Shirai T, Wang J, Kawabe M, et al. No adverse effects detected for simultaneous whole-body exposure to multiple-frequency radiofrequency electromagnetic fields for rats in the intrauterine and pre- and post-weaning periods. *J Radiat Res.* 2016;58(1):48-58.
 94. Kumlin T, Iivonen H, Miettinen P, et al. Mobile phone radiation and the developing brain: behavioral and morphological effects in juvenile rats. *Radiat Res.* 2007;168(4):471-479.
 95. Keleş Aİ, Yıldırım M, Gedikli Ö, et al. The effects of a continuous 1-h a day 900-MHz electromagnetic field applied throughout early and mid-adolescence on hippocampus morphology and learning behavior in late adolescent male rats. *J Chem Neuroanat.* 2018;94(September):46-53.
 96. Zhang Y, Li Z, Gao Y, Zhang C. Effects of fetal microwave radiation exposure on offspring behavior in mice. *J Radiat Res.* 2015;56(2):261-268.
 97. Whissell PD, Tsang EW, Mulligan BP, Persinger M a. Prenatal exposures to LTP-

- patterned magnetic fields: quantitative effects on specific limbic structures and acquisition of contextually conditioned fear. *Int J Neurosci*. 2009;119(1):1-14.
98. Othman H, Ammari M, Rtibi K, Bensaid N, Sakly M, Abdelmelek H. Postnatal development and behavior effects of in-utero exposure of rats to radiofrequency waves emitted from conventional WiFi devices. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2017;52:239-247.
 99. Yang M, Silverman JL, Crawley JN. Automated three-chambered social approach task for mice. *Curr. Protoc. Neurosci*. 2011;SUPPL. 56:1–16.
 100. Dhamne SC, Silverman JL, Super CE, et al. Replicable in vivo physiological and behavioral phenotypes of the Shank3B null mutant mouse model of autism. *Mol Autism*. 2017;8(1):1-19.
 101. Yang M, Bozdagi O, Scattoni ML, et al. Reduced Excitatory Neurotransmission and Mild Autism-Relevant Phenotypes in Adolescent Shank3 Null Mutant Mice. *J Neurosci*. 2012;32(19):6525-6541.
 102. Wang X, McCoy PA, Rodriguiz RM, et al. Synaptic dysfunction and abnormal behaviors in mice lacking major isoforms of Shank3. *Hum Mol Genet*. 2011;20(15):3093-3108.
 103. Han K, Holder JL, Schaaf CP, et al. SHANK3 overexpression causes manic-like behaviour with unique pharmacogenetic properties. *Nature*. 2013;503(7474):72-77.
 104. Zhou Y, Kaiser T, Monteiro P, Zhang X, Van der Goes MS, Wang D, Barak B, Zeng M, Li C, Lu S, Wells M, Amaya A, Nguyen S, Lewis M, Sanjana N, Zhou Y, Zhang M, Zhang F, Fu Z, Feng G. Mice with Shank3 Mutations Associated with ASD and Schizophrenia Display Both Shared and Distinct Defects. *Neuron*. 2016;89(1):147–162.
 105. Duffney LJ, Zhong P, Wei J, et al. Autism-like Deficits in Shank3-Deficient Mice Are Rescued by Targeting Actin Regulators. *Cell Rep*. 2015;11(9):1400-1413.
 106. Bey AL, Wang X, Yan H, et al. Brain region-specific disruption of Shank3 in mice reveals a dissociation for cortical and striatal circuits in autism-related behaviors. *Transl Psychiatry*. 2018;8(94):1-17.
 107. Rendall AR, Perrino PA, Buscarello AN, Fitch AH. Shank3B mutant mice display pitch discrimination enhancements and learning deficits. *Int. J. Dev. Neurosci*.

2019;72(August 2018):13–21.

108. Bozdagi O, Sakurai T, Papapetrou D, et al. Haploinsufficiency of the autism-associated Shank3 gene leads to deficits in synaptic function, social interaction, and social communication. *Mol Autism*. 2010;1(1):15.
109. Kouser M, Speed HE, Dewey CM, et al. Loss of Predominant Shank3 Isoforms Results in Hippocampus-Dependent Impairments in Behavior and Synaptic Transmission. *J Neurosci*. 2013;33(47):18448-18468.
110. Lee J, Chung C, Ha S, et al. Shank3-mutant mice lacking exon 9 show altered excitation/inhibition balance, enhanced rearing, and spatial memory deficit. *Front Cell Neurosci*. 2015;9(March):1-14.
111. Song T-J, Lan X-Y, Wei M-P, et al. Altered Behaviors and Impaired Synaptic Function in a Novel Rat Model With a Complete Shank3 Deletion. *Front Cell Neurosci*. 2019;13(March):1-17.
112. Balaan C, Corley MJ, Eulalio T, et al. Juvenile Shank3b deficient mice present with behavioral phenotype relevant to autism spectrum disorder. *Behav Brain Res*. 2019;356(August 2018):137-147.
113. Berg EL, Copping NA, Rivera JK, et al. Developmental social communication deficits in the Shank3 rat model of phelan-mcdermid syndrome and autism spectrum disorder. *Autism Res*. 2018;0:1-15.
114. Drapeau E, Riad M, Kajiwarra Y, Buxbaum JD. Behavioral Phenotyping of an Improved Mouse Model of Phelan–McDermid Syndrome with a Complete Deletion of the Shank3 Gene. *eneuro*. 2018;5,(3):ENEURO.0046-18.2018.
115. Hamilton SM, Green JR, Veeraragavan S, et al. Fmr1 and Nlgn3 knockout rats: Novel tools for investigating autism spectrum disorders. *Behav Neurosci*. 2014;128(2):103-109.
116. Baudouin SJ, Gaudias J, Gerharz S, Hatstatt L, Zhou K, Punnakal P, Tanaka KF, Spooren W, Hen R, De Zeeuw CI, Vogt K, Scheiffele P. Shared Synaptic Pathophysiology in Syndromic and Nonsyndromic Rodent Models of Autism *Science*

2012;80:128–132.

117. Tabuchi K, Blundell J, Etherton MR, Hammer RE, Liu X, Powell CM, Südhof TC. A Neuroligin-3 Mutation Implicated in Autism Increases Inhibitory Synaptic Transmission in Mice. *Science*. 2007;318(5847):71–76.
118. Win-Shwe T-T, Nway NC, Imai M, Lwin T-T, Mar O, Watanabe H. Social behavior, neuroimmune markers and glutamic acid decarboxylase levels in a rat model of valproic acid-induced autism. *J Toxicol Sci*. 2018;43(11):631-643.
119. Peralta F, Fuentealba C, Fiedler J, Aliaga E. Prenatal valproate treatment produces autistic-like behavior and increases metabotropic glutamate receptor 1A-immunoreactivity in the hippocampus of juvenile rats. *Mol. Med. Rep*. 2016;14,(3):2807–2814.
120. Mony TJ, Lee JW, Dreyfus C, DiCicco-Bloom E, Lee HJ. Valproic acid exposure during early postnatal gliogenesis leads to autistic-like behaviors in rats. *Clin Psychopharmacol Neurosci*. 2016;14(4):338-344.
121. Kolozsi E, Mackenzie RN, Rouillet FI, Decatanzaro D, Foster JA. Prenatal exposure to valproic acid leads to reduced expression of synaptic adhesion molecule neuroligin 3 in mice. *Neuroscience*. 2009;163(4):1201–1210.
122. Barrett CE, Hennessey TM, Gordon KM, Ryan SJ, McNair ML, Ressler KJ, Rainnie DG. Developmental disruption of amygdala transcriptome and socioemotional behavior in rats exposed to valproic acid prenatally. *Mol. Autism*. 2017;8(1):1–17.
123. Kim KC, Kim P, Go HS, Choi CS, Park JH, Kim HJ, Jeon SJ, Dela Pena IC, Han SH, Cheong JH, Ryu JH, Shin CY. Male-specific alteration in excitatory post-synaptic development and social interaction in pre-natal valproic acid exposure model of autism spectrum disorder. *J. Neurochem*. 2013;124(6):832–843.
124. Grabrucker S, Haderspeck JC, Sauer AK, et al. Brain Lateralization in Mice Is Associated with Zinc Signaling and Altered in Prenatal Zinc Deficient Mice That Display Features of Autism Spectrum Disorder. *Front MolNeurosci*. 2017;10(450):1-13.
125. Yu XD, Jin LM, Zhang XH, Yu XG. Effects of maternal mild zinc deficiency and zinc

- supplementation in offspring on spatial memory and hippocampal neuronal ultrastructural changes. *Nutrition*. 2013;29(2):457–461.
126. Lee EJ, Lee H, Huang TN, Chung C, Shin W, Kim K, Koh JY, Hsueh YP, Kim E. Trans-synaptic zinc mobilization improves social interaction in two mouse models of autism through NMDAR activation. *Nat. Commun*. 2015;6(May):1–13.
127. Fourie C, Vyas Y, Lee K, Jung Y, Garner CC, Montgomery JM. Dietary Zinc Supplementation Prevents Autism Related Behaviors and Striatal Synaptic Dysfunction in Shank3 Exon 13–16 Mutant Mice. *Front Cell Neurosci*. 2018;12(October):1-14.



8. EKLER

EK-1. Etik Kurul Onayı

T.C.

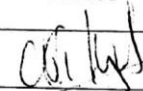
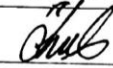
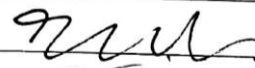
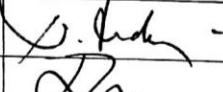
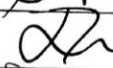
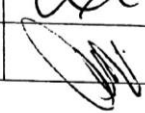
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU (TF-HADYEK)

ETİK KURUL KARARI

Toplantı Tarihi	Karar No	Proje Yürütücüsü
14.12.2017	26/2017	Prof. Dr. Müge KIRAY

Karar: “Prenatal Dönemde Maruz Kalınan Elektromanyetik Alanın Otizm Benzeri Davranışlar ve Sinaptik Proteinler Üzerine Etkisi ve Çinko Desteğinin Rolü” isimli proje, “Prenatal Dönemde Maruz Kalınan Elektromanyetik Alanın Davranış ve Sinaptik Proteinler Üzerine Etkisi ve Çinko Desteğinin Rolü” ismi ile etik olarak uygun bulunmuştur.

Etik Onay Geçerlilik Süresi: 5 yıl

GÖREVİ	ADI SOYADI	İMZA
Başkan	Prof. Dr. Nazan Uysal HARZADIN	
Başkan Yardımcısı	Vet. Hek. Sevim KANDİŞ	
Üye	Prof. Dr. Lutfiye KANIT	
Üye	Prof. Dr. Ersin KOYLU	
Üye	Prof. Dr. Sevil Gönenç ARDA	
Üye	Prof. Dr. Mehmet Nuri ARDA	
Üye	Prof. Dr. Durgül YILMAZ	
Üye	Ayşe DAYI	

EK-2. Özgeçmiş



BURCU AÇIKGÖZ

Kişisel Bilgiler

İletişim Bilgileri

Kimlik Numarası	38671647620
Doğum Tarihi	04/11/1991
İletişim Adresi	
Telefon	(537) 871 95 91
E-posta	burackgoz@gmail.com
Web Adresi	

Eğitim Bilgileri

01 Eylül 2015 - Şu Anda (3 yıl 10 ay)
Yüksek Lisans, Tezli Program, DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ, FİZYOLOJİ (YL) (TEZLİ)

01 Eylül 2014 - 01 Mart 2018 (3 yıl 7 ay)
Yüksek Lisans, Tezli Program, DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ, MOLEKÜLER TIP (YL) (TEZLİ)
Tez Başlığı: Psoriasisliilerde Kanda FOXP3 Geninde TSDR Metilasyonu ve Sitokin Düzeylerinin Belirlenmesi
Tez Konusu: Çalışmada psoriasisliilerde periferik kanda FOXP3 TSDR metilasyon düzeylerinin, FOXP3 mRNA ekspresyon düzeyi ve seçilmiş sitokinlerin düzeylerinin belirlenmesi ve bulguların hastalık şiddeti ve tedavi durumuyla ilişkisinin araştırılması amaçlanmıştır.
Tarih: 2018
Tez Danışmanı: HARUN MUAYAD SAİD

01 Eylül 2010 - 01 Haziran 2016 (5 yıl 10 ay)
Lisans, Anadal/Normal Öğretim, ANADOLU ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
AÇIKÖĞRETİM FAKÜLTESİ, FELSEFE BÖLÜMÜ

01 Eylül 2009 - 01 Haziran 2014 (4 yıl 10 ay)
Lisans, Anadal/Normal Öğretim, EGE ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
FEN FAKÜLTESİ, BİYOLOJİ BÖLÜMÜ

Yabancı Dil Bilgileri

İNGİLİZCE (Okuma: İyi, Yazma: Orta, Konuşma: Orta)

ALMANCA (Okuma: Başlangıç, Yazma: Başlangıç, Konuşma: Başlangıç)

TÜBİTAK Burs ve Destekleri

Proje Bilgileri

1165159, Psoriasisliilerde Kanda FOXP3 Geninde TSDR Metilasyonu Ve Sitokin Düzeylerinin Belirlenmesi, 3001 - Başlangıç AR-GE, Burslu, Sonuç raporu kabul, ARDEB, SBAG - Sağlık Bilimleri Araştırma Destek Grubu, Projeye Katılma/Ayrılma Tarihleri: 01.06.2016 - 01.12.2017, Proje Başlangıç/Bitiş Tarihleri: 01.06.2016 - 01.12.2017.

Panelistlik/İzleyicilik/Raportörlük Sayısı

Panelistlik/Dış Danışmanlık Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0
İzleyicilik/Danışmanlık Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0
Raportörlük Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0