T.C.
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
HAMİDİYE SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ÇOCUKLUK ÇAĞI TRAVMALARININ YETİŞKİN BEYİN EKSTRASELÜLER MATRİS YAPILANMASINA VE BİLİŞSEL ESNEKLİĞE ETKİLERİ

AİŞE RUMEYSA MAZI

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. YUNUS KARAKOÇ

BİYOFİZİK ANA BİLİM DALI
BİYOFİZİK DOKTORA PROGRAMI

DOKTORA TEZİ
AĞUSTOS/2023

İTHAF

“İhmal ve istismara maruz kalmış tüm çocuklara ve içindeki çocuğu şefkat ve sabırla iyileştirmeye gayret eden tüm cesur yetişkinlere ithaf ediyorum”

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca desteğini ve bilgi birikimini benden esirgemeyen kıymetli danışmanım Sayın Prof.Dr.Yunus KARAKOÇ'a teşekkürlerimi sunarım. Tez çalışmam için sağladığı imkân, bilgi ve katkıları için değerli hocam Sayın Prof.Dr.Mehmet YILDIRIM'a teşekkürlerimi sunarım.

Doktora tezimdeki deneysel çalışmalarda destek ve yardımlarından dolayı Dr.Vet.Hekim Cumaali DEMİRTAŞ ve Arş.Gör.Uğur AYKIN'a; Hamidiye Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Laboratuvarı'nın çalışanları Vet.Hekim Ali Fuat KAPLAN ve Sami DAĞLAR'a teşekkür ederim.

Her başım sıkıştığında ve dâhi sıkışmadığında maddi manevi yardımlarını esirgemeyen sevgili meslektaşlarım ve yol arkadaşlarım Dr. Sena Ebru ÇAĞLAR, Arş.Gör.Dr. Tuğba Muhlise OKYAY, Arş.Gör.Dr. Rukiye KARATEPE, Elifnaz İLGAR'a, tüm sorularımı sabırla cevaplayan sevgili çalışma arkadaşlarım Arş.Gör. Sibel KURAŞ. Arş.Gör. Sude TOPKARAOĞLU ve Arş.Gör.Dr. Kübra ŞEVGİN'e teşekkür ederim.

Mesafeleri aşan destekleriyle bu uzun ve zahmetli yolu tamamlamamı mümkün kılan canım arkadaşlarım Zülal, Elif, Nur Sümeyye ve Ayşegül'e; beni türlü zahmet ve fedakarlıklarla bugünlere getiren, ilim sevgisini kalbime yerleştiren canım annem, babam ve kardeşime sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamı "Doktora Tez Projeleri" kapsamında destekleyen Sağlık Bilimleri Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne (Proje No: 2021/098) ve "1002 Hızlı Destek Programı" kapsamında destekleyen Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na (Proje No: 221S321) teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

İTHAF……..……...i
TEŞEKKÜR……...……...……..v
İÇİNDEKİLER…….…….……vi
TABLOLAR LİSTESİ……...…….viii
ŞEKİLLER LİSTESİ…….……ix
RESİMLER LİSTESİ…….……x
SİMGELER VE KISALTMALAR…….……..xi
ÖZET……...……....xiii
ABSTRACT…….....…….....xv
1. GİRİŞ VE AMAÇ……...…….……1
2. GENEL BİLGİLER……..…….....3
2.1. EKSTRASELÜLER MATRİS…….……...3
2.1.1. Beyin Ekstraselüler Matrisin Moleküler Yapısı……..…....4
2.1.1.1. Perinöral kılıf……..……..……5
2.1.1.2. Perinodal ekstraselüler matris……..……..…..6
2.1.2. Beyin Ekstraselüler Matrisin Fonksiyonel Özellikleri……..…….6
2.1.2.1. Sinaptik plastisite ve ekstraselüler matris ilişkisi……8
2.1.2.2. Parvalbumin pozitif internöronlar……..…....10
2.1.2.3. ESM'nin katabolizması ve fonksiyonel özellikleri……..……..10
2.2. ÇOCUKLUK ÇAĞI TRAVMALARI……..……..…...12
2.2.1. Çocukluk Çağı Travmalarının Beyin Gelişimine Etkileri……...12
2.2.1.1. Hipotalamik-Pitüiter-Adrenal eksen……..…...14
2.2.2. Çocukluk Çağı Travmalarının Hayvan Modelleri……...…16
2.3. BİLİŞSEL ESNEKLİK……..16
3. GEREÇ VE YÖNTEM……..……..…….18
3.1. DENEY DİZAYNI VE GRUPLARIN OLUŞTURULMASI ...……...……18
3.1.1. Çocukluk Çağı Travma Modeli ……..……...…18
3.1.2. Deney Grupları ve İş Akışı ……..……..…....……19
3.2. GEREÇLER…….. ……...…….……20
3.2.1. Cihazlar ve Yazılımlar ……..…….……..…20
3.2.2. Kimyasallar ……..……..……...……..21
3.3. DAVRANIŞ DENEYLERİ……..……...……..……22

3.3.1. Yükseltilmiş Artı Labirenti……..……..…….…22
3.3.2. Açık Alan Testi……..…….……..…22
3.3.3. Aktif Sakınma Testi……..……...23
3.3.3.1. Cerrahi operasyon…....…….26
3.3.3.2. İntrakortikal hyaluronidaz enjeksiyonu……..……...27
3.4. DOKU ÖRNEKLERİNİN ALINMASI..……..…..……..27
3.5. BİYOKİMYASAL ANALİZ ……..……..27
3.6. HİSTOLOJİK ANALİZ ……..……..28
3.6.1. İmmunofloresan Boyama……..……..…….28
3.6.2. Mikroskobik Görüntüleme ve Analiz……..……29
3.7. İSTATİSTİKSEL ANALİZ……..…….29
4. BULGULAR……...……..……...30
4.1. ÇOCUKLUK ÇAĞI TRAVMA MODELİNİN DOĞRULANMASI……..….30
4.1.1. Çocukluk Çağı Travma Modelinin Davranışsal Doğrulanması…….…..30
4.1.2. Çocukluk Çağı Travma Modelinin Biyokimyasal Doğrulanması……..…….33
4.2. İNTRAKORTİKAL KANÜL YERLEŞTİRME İŞLEMİNİN DAVRANIŞA ETKİLERİ……..…….….34
4.2.1. İntrakortikal Kanülasyonun Anksiyeteye Etkilerinin Yükseltilmiş Artı Labirenti Testiyle İncelenmesi…….……..……...…34
4.2.2. İntrakortikal Kanülasyonun Anksiyeteye Etkilerinin Lokomotor Aktiviteye EtkilerininAçık Alan Testiyle İncelenmesi……..…….…36
4.3. ÇOCUKLUK ÇAĞI TRAVMASINA BAĞLI BİLİŞSEL ESNEKLİK DEĞİŞİMİ……..……..……..…….……..…37
4.4. ÇOCUKLUK ÇAĞI TRAVMASINA BAĞLI BEYİN EKSTRASELÜLER MATRİS MOLEKÜLER YAPISININ DEĞİŞİMİ…….…….....39
5. TARTIŞMA…….…….....43
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER…….....51
KAYNAKLAR…….....53
EK…….....63

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 3.1: Deney grupları 19

Tablo 3.2: Çalışmada kullanılan cihazlar ve yazılımlar 20

Tablo 3.3: Deneylerde kullanılan kimyasallar ve üretici firmaları 21

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1: Ekstraselüler matris 5

Şekil 2.2: Hipotalamik-Pitüiter-Adrenal eksen 15

Şekil 3.1: İş akış diyagramı 19

Şekil 3.2: Aktif sakınma deney protokolü 24

Şekil 3.3: Aktif sakınma yanıtları 25

Şekil 4.1: ÇÇT modelinin yükseltilmiş artı labirenti testine göre lokomotor aktiviteye ve anksiyeteye etkileri 31

Şekil 4.2: ÇÇT modelinin açık alan testine göre lokomotor aktiviteye ve anksiyeteye etkileri 32

Şekil 4.3: ÇÇT'nin serum kortikosteron konsantrasyonuna etkisi 33

Şekil 4.4: Yükseltilmiş artı labirenti testi açık kolda geçirilen sürenin (solda) ve açık kolda kat edilen mesafenin (sağda) operasyon sonrası grup içi ve gruplar arası karşılaştırılması 35

Şekil 4.5: Yükseltilmiş artı labirenti testi kapalı kolda geçirilen sürenin (solda) ve anksiyete indeksinin (sağda) operasyon sonrası grup içi ve gruplar arası karşılaştırılması 35

Şekil 4.6: Açık alan testi merkeze giriş sayısının (solda) ve merkezde geçirilen sürenin (sağda) operasyon sonrası grup içi ve gruplar arası karşılaştırılması 36

Şekil 4.7: Açık alan testi toplam kat edilen mesafenin (solda) ve immobilite süresinin (sağda) operasyon sonrası grup içi ve gruplar arası karşılaştırılması 37

Şekil 4.8: İki fazlı aktif sakınma değeri doğru yanıt (CR+) oranı, yanlış yanıt (CR-) oranı ve ayırt etme oranı 38

Şekil 4.9: İmmunofloresan boyama sonrası fotoğraflanan ve analiz edilen bölgeler 40

Şekil 4.10: WFA (sol) ve PV (sağ) sinyal yoğunluğunun karşılaştırılması 42

RESİMLER LİSTESİ

Resim 3.1: Çocukluk çağı travması modeli düzeneği 18

Resim 3.2: Ratlara stereotaksi ile intrakortikal kanül yerleştirme işlemi 26

Resim 3.3: HYaz enziminin intrakortikal kanüllerden temporal kortekse enjeksiyonu 27

Resim 4.1: WFA ve PV floresan boyama görüntüleri 40

SİMGELER VE KISALTMALAR

ACTH	**:**	Adrinokortikotropik hormon
ADAMTS	**:**	Trombospondin motifli disintegrin ve metalloproteinaz
AP	**:**	Anterior-posterior
ASK	**:**	Anterior singulat korteks
ÇÇT	**:**	Çocukluk çağı travmaları
ChABC	**:**	Kondroitinaz ABC
CR	**:**	Şartlı yanıt
CRH	**:**	Kortikotropin salıcı hormonun
CS	**:**	Şartlı uyaran
DV	**:**	Dorsal-ventral
ESM	**:**	Ekstraselüler matris
FM	**:**	Frekans modulasyonlu
GABA	**:**	Gama amino butirik asit
GAG	**:**	Glikozaminoglikan
HA	**:**	Hyaluronan
HPA	**:**	Hipotalamo-pitüiter-adrenal
HYaz	**:**	Hyaluronidaz
KSPG	**:**	Kondroitin sülfat proteoglikan
kTSSB	**:**	Karmaşık travma sonrası stres bozukluğu
LTD	**:**	Uzun süreli depresyon
LTP	**:**	Uzun süreli potansiyasyon
ML	**:**	Medyal-lateral
MMP	**:**	Matris metalloproteinaz
MS	**:**	Maternal seperasyon
MSS	**:**	Merkezi sinir sistemi
Nİ	**:**	Neonatal izolasyon
OFK	**:**	Orbitofrontal korteks

PBS	**:**	Fosfat tamponlu salin
PFA	**:**	Paraformaldehid
PFK	**:**	Prefrontal korteks
PN	**:**	Postnatal
PNK	**:**	Perinöral kılıf
PV+	**:**	Parvalbumin pozitif
STP	**:**	Kısa-vadeli plastisite
TIMP	**:**	Metalloproteinaz doku inhibitörü
TnC	**:**	Tenaskin-C
TnR	**:**	Tenaskin-R
US	**:**	Şartsız uyaran
WFA	**:**	Wisteria floribunda aglutinin

ÇOCUKLUK ÇAĞI TRAVMALARININ YETİŞKİN BEYİN EKSTRASELÜLER MATRİS YAPILANMASINA VE BİLİŞSEL ESNEKLİĞE ETKİLERİ

ÖZET

Amaç: Bu çalışmanın amacı çocukluk çağında maruz kalınan kronik stresin yetişkin beyin ekstraselüler matris (ESM) moleküler yapılanmasına, bu bağlamda bilişsel esnekliğe etkilerini araştırmak ve ESM'nin enzimal uzaklaştırmasının davranışsal çıktılarını incelemektir.

Gereç ve Yöntem: Maternal seperasyon ve neonatal izolasyon uygulanan Sprague-Dawley erkek ratlarda çocukluk çağı travma (ÇÇT) modelinin doğruluğu yükseltilmiş artı labirenti ve açık alan testleriyle davranışsal olarak, serum kortikosteron değerlerinin ELISA ile tespit edilmesiyle biyokimyasal olarak test edildi. ÇÇT'nin sinaptik plastisiteye ve bilişsel esnekliğe etkilerini araştırmak için yüksek korteks plastisitesi ve bilişsel esneklik gerektirdiği bilinen özel bir aktif sakınma test protokolü kullanıldı. İki fazlı olarak planlanan aktif sakınma testinde her bir fazdan önce ÇÇT'li bir grubun işitme korteksine Hyaluronidaz (HYaz) enjekte edilerek ESM'nin enzimal uzaklaştırılmasının moleküler ve davranışsal etkileri de incelendi. Beyin ESM moleküler yapısının ÇÇT grubu ratlarda kontrol grubuna kıyasla değişimi immunofloresan boyamayla gösterildi.

Bulgular: Aktif sakınma testinin ilk fazında, ÇÇT ratlarda istatistiksel olarak anlamlı öğrenme gerçekleşmezken, kontrol grubunda ve HYaz enjekte edilen ÇÇT grubu ratlarda anlamlı öğrenme gerçekleştiği görüldü. İkinci fazda grupların hiç birinde fazın ilk gününe kıyasla anlamlı tersine öğrenme gözlenmedi. ESM yoğunluğu ÇÇT ratların beyninde incelenen beş bölgede de anlamlı olarak azalırken, parvalbumin miktarının kortekste artmış, hipokapüs ve retiküler nükleusta azalmış olduğu görüldü.

Sonuç: ÇÇT sonucu bilişsel esneklikte bir değişiklik olmadığı ancak öğrenmenin hasar gördüğü tespit edildi. İntrkortikal HYaz enjeksiyonunun, ÇÇT ile oluşan öğrenme kaybını telafi ettiği saptandı. ÇÇT'nin ESM miktarını azalttığı, ancak bu azalmanın tek başına sinaptik plastisiteyi arttırmadığı, HYaz enjeksiyonuyla desteklendiğinde sinaptik plastisitenin arttığı görüldü.

Anahtar Kelimeler: Bilişsel Esneklik, Çocukluk Çağı Travmaları, Ekstraselüler Matris, Öğrenme ve Bellek, Stres Yanıtı

EFFECTS OF CHILDHOOD TRAUMA ON THE DEVELOPMENT OF ADULT BRAIN EXTRACELLULAR MATRIX STRUCTURE AND COGNITIVE FLEXIBILITY

ABSTRACT

Aim: This study aimed to investigate how the chronical stress that is experienced during childhood affects the molecular structure of brain extracellular matrix (ECM), cognitive plasticity and how the enzymatic removal of the ECM affects the behavior.

Materials and Methods: Childhood trauma (CT) was modelled using a combination of maternal separation and neonatal isolation in Sprague-Dawley male rats and success of the model was tested behaviorally via elevated plus maze and open field tests, biochemically via determination of blood plasma levels of corticosterone. To assess the impact of CT on synaptic plasticity and cognitive flexibility, a cortex-dependent go/no-go task with two phases was used. Before each phase, hyaluronidase (HYase) was injected into auditory cortex to determine the effect of ECM removal on behavior. ECM molecular structures of CT and control animals were examined using immunohistochemistry.

Results: For the initial phase of the active avoidance test, CT group did not show statistically significant learning performance, while the control group and the HYase injected CT group showed significant learning performance. For the second phase, significant reversal learning compared to the first day of the second phase did not occur for any group. ECM intensity decreased significantly in the brain of CT rats for all brain regions while parvalbumin intensity increased in the cortex and decreased in hippocampus and reticular nucleus.

Conclusion: Our results suggest that CT does not affect cognitive plasticity but impaires initial learning. Intracortical injection of HYase can restore plasticity and learning in CT rats. Loss of ECM in CT rats does not increase synaptic plasticity except with the help of Hyase injection.

Key Words: Cognitive Flexibility, Childhood Traumas, Extracellular Matrix, Learning and Memory, Stress Response

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Ekstraselüler matris (ESM); organizmada hücrelerarası boşluğu dolduran, hücre canlılığını destekleyen ve hücre büyümesini yönlendiren üç boyutlu makromoleküler ağdır (1). Bu ağın moleküler içeriği ve yapılanması her organizma, organ ve doku için farklılık gösterebilir. Hatta aynı doku içinde, çevresel faktörlere bağlı olarak değişim devam etmekte ve bu dinamik yapı ile stres ve hastalık karşısında fizyolojik homeostaz korunabilmektedir (2). Merkezi sinir sisteminde (MSS) bulunan ESM de sadece bu sisteme özgü özellikler göstermekle kalmaz, gelişimin farklı dönemlerinde, ihtiyaca yönelik moleküler ve organizasyonel farklılaşmalar gösterir (3,4). Beyinde ESM'yi juvenil ve olgun ESM olarak iki formda değerlendirmek mümkündür. Juvenil ESM, geç embriyonik ve erken postnatal dönemde sentezlenen bir yapıyken; olgun ESM, perinöronal kılıf (PNK) olarak isimlendirilen ve MSS nöronlarının gövde ve proksimal nöritlerini saran özelleşmiş yapıların da eklendiği oluşumdur. Juvenil ESM; nörogenez, gliogenez, hücre göçü, aksonal uzama ve yönlenme ile sinaptogenez gibi olaylara izin verir, hatta bunları desteklerken; olgun ESM'nin bu işlevleri inhibe ettiği bilinmektedir. PNK'nin enzimal uzaklaştırmasıyla bu işlevlerin tekrar gerçekleşebildiği çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (4–6).

Olgun ESM'nin ve PNK'lerin oluşumu beyinde kritik dönemin sonlanmasıyla başlar (4,7). Kritik dönem; beyin gelişiminde sinaptik plastisite kapasitesinin oldukça yüksek olduğu hassas zaman aralığını ifade eder (8). Yetişkin beyninde PNK'nin hyaluronidaz (HYaz) ve/veya kondroitinaz ABC (ChABC) ile enzimal uzaklaştırılmasıyla yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarla, juvenil ESM benzeri sinaptik plastisitenin geri döndürülebildiği tespit edilmiştir (6,9). Bu bulgular, olgun ESM ve PNK'nin görevinin kritik dönem boyunca kurulmuş sinaptik bağlantıları korumak, sinaptik plastisiteyi sınırlandırmak ve sinaptik stabilizasyon sağlamak olduğunu düşündürmüştür.

ESM modülasyonunun yetişkin beyninde plastisiteye etkisinin boyutları ve bu etkilerin bilişsel ve davranışsal dışavurumları ise hala araştırılmaktadır. Yapılan çalışmalarda hyaluronun enzimal uzaklaştırılmasının, bilişsel esnekliği arttırdığı gösterilmiştir (10,11). Bu bulgular, sıkı bir ESM yapısının bilişsel esnekliği sınırlandırdığı yorumunu doğurmuştur.

Bilişsel esneklik, düşünceler arasında geçiş yapabilme ya da eşzamanlı olarak birden fazla kavram hakkında düşünebilme becerisi olarak tanımlanır (12). Bu yürütücü işlevin etkin olarak çalışmadığı bireylerin; katı davranışlarla aynı hataları tekrarladığı, yeni durumlara uyum sağlayamadığı ve zor durumlarla baş edemediği görülür (13). Buna ek olarak Çocukluk Çağı Travmaları(ÇÇT)'na bağlı gelişen Karmaşık Travma Sonrası Stres Bozukluğu (kTSSB) vakalarında da bilişsel esneklikte azalma olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (14–17).

Çocukluk Çağı Travmaları; 18 yaşından küçük bireylerin maruz kaldığı cinsel, duygusal ve fiziksel istismar ve ihmal ile, ebeveynden ayrı kalma, şiddete tanıklık etme, doğal afet ve kazalar olarak tanımlanabilir (18). ÇÇT gibi erken dönemlerde maruz kalınan kronik stres, beyin gelişiminde ve Hipotalamo-Pitüiter-Adrenal (HPA) eksende kalıcı değişikliklere sebebiyet vermektedir (21–23).

Özetle, literatür incelendiğinde, ÇÇT'nin ve özelleşmiş olgun ESM yapısının beyinde benzer yapısal ve işlevsel çıktılarla ilişkilendirildiği görülmektedir. Son yıllarda yapılan hayvan çalışmaları, erken dönem kronik stresin genç yetişkinlikte, hipokampüs ve amigdalada PNK yapılarının yoğunluğunu değiştirdiğini göstermiştir (21–23). Mevcut çalışmalar, ESM'nin özelleşmiş PNK yapılarını bölgesel olarak incelemiş olup; ÇÇT'nin beyin genelinde, tüm PNK dışındaki ESM yapılanmasına etkilerine dair detaylı bilgi sunmamaktadır. Bu çalışmada mevcut bilgilerden yola çıkarak, çocukluk çağında maruz kalınan kronik stresin olgun ESM yapılanmasına ve bu bağlamda bilişsel esnekliğe etkileri detaylı olarak araştırılmıştır. Bu amaç doğrultusunda ÇÇT modeli oluşturulan yetişkin ratlarda olgun ESM yapısındaki değişiklikler beyin kesitlerinde immunohistokimyasal yöntemlerle incelenmiştir. Korteks plastisitesi ve bilişsel esneklik gerektirdiği bilinen aktif sakınma deneyi ile, ÇÇT geçmişi olan yetişkin ratların kontrol grubu ratlara kıyasla öğrenme ve tersine öğrenme becerilerinde herhangi bir değişiklik olup olmadığı araştırılmıştır. Buna ek olarak ESM'nin hyaluronidaz enzimiyle uzaklaştırılması sonucu, tersine öğrenme becerisinin geri döndürülebilirliği test edilmiştir. Çalışma sayesinde literatürde ÇÇT'nin olgun ESM yapılanmasına etki edip etmediğine dair boşluğu doldurmak; erken dönem kronik stresin beyin gelişimine etkileri ve uzun vadede yol açtığı patolojileri daha kapsamlı şekilde anlamak adına literatüre katkı sağlamak amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. EKSTRASELÜLER MATRİS

Beyinde, nöral hücreler arası boşluk ekstraselüler matris (ESM) olarak isimlendirilen, nöronlar ve glialar tarafından sentezlenen yapıyla kaplıdır. ESM, Beyin toplam hacminin %10-20'si kadarını oluşturur ve hücreler arasında yapısal ve fonksiyonel etkileşimi sağlar (24,25).

ESM, merkezi sinir sistemi (MSS) gelişimi sırasında dikkat çekici bir yapısal farklılaşma gösterir. Memeli beyninde ilk olarak geç embriyonik ve erken postnatal dönemde juvenil ESM olarak isimlendirilen yapı oluşur (4). Juvenil ESM ağırlıklı olarak lektikan ailesinden nörokan ve versikanın V0 ve V1 izoformları ile tenaskin-C içeren bir yapıdır ve nörogenez, gliogenez, hücre migrasyonu, aksonal uzama ve sinaptogenez gibi embriyonik ve erken postnatal dönem için oldukça kritik fonksiyonları destekler (24,26). Bu kritik dönemin sonlanmasıyla ESM yapısı değişir ve olgun ESM olarak isimlendirilebilecek, juvenil ESM moleküllerinin azalıp yerini brevikan, versikan V2, agrekan, fosfokan ve tenaskin-R gibi moleküllere bıraktığı yapı oluşur (27,28). Örneğin nörokanlar yetişkin MSS'de fizyolojik şartlarda çok az miktarda görülür (29). Daha çok embriyonik dönemde görülür ve postnatal birinci ayda ekspresyonu ciddi oranda azalır (30). Olgun ESM, aksonal uzamaya izin vermez ve rejenerasyonu inhibe eder (31,32).

Juvenil ESM'nin olgun ESM'ye dönüşmesi, nöral ağların deneyime bağlı olarak şekillendiği kritik dönemin sonlanmasıyla aynı zamanda gerçekleşir (32,33). Yapısal ve fonksiyonel sinaptik plastisitenin oldukça yüksek olduğu bu kritik dönem, insanlar da dahil primatlarda aylar hatta yıllarca sürebilmektedir (34). Bu dönemin sonlanması, farklı beyin bölgelerinde farklı zamanlara denk gelmekte ve olgun ESM'nin oluşumu da bu bölgesel ve zamansal farklılığı takip etmektedir (8,35). Olgun ESM yapıları aynı zamanda olgun nöral ağların temel göstergelerindendir ve gelişimin dördüncü haftasından itibaren ağırlıkla GABAerjik parvalbumin pozitif internöronların etrafında olmak üzere *in vivo* ve *in vitro* olarak görüntülenebilir (36–38). PV+ GABAerjik internöronların olgunlaşması ve transmitter üretmeye başlaması kritik dönemin başlamasını ve bitmesini düzenleyen

süreçlerdir (34). Bunun yanında kritik dönemde duyusal uyaran ya da nöral aktivite azlığı ESM oluşumunu azaltır ve kritik dönemin daha geç sonlanmasına yol açar (39).

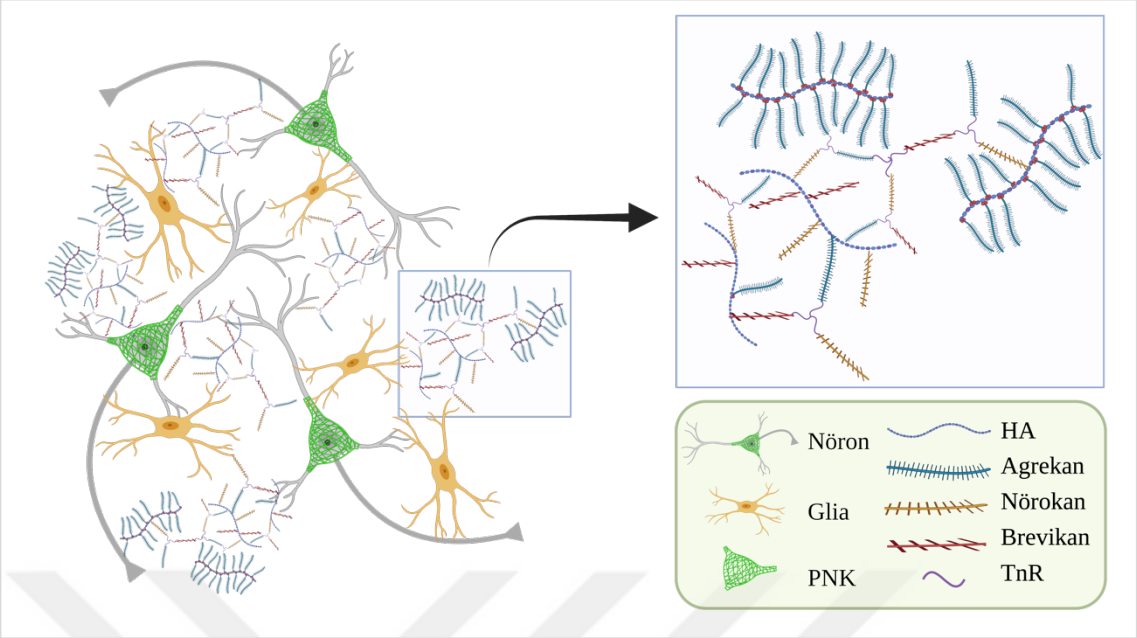
MSS'de erken dönem sonrası rejenerasyon ve sinaptik plastisitenin kısıtlanması sadece yüksek omurgalılarda görülmektedir. Bu kısıtlama her ne kadar dezavantaj gibi görünse de aslında popülasyonun sağ kalımı için ciddi zaman ve enerji tasarrufu sağlar. Aynı zamanda kritik dönemde kurulan ve ilerleyen dönemde deneyime dayalı hızlı veri işlemeyi sağlayacak olan önemli nöral ağların uzun süreli korunmasını da mümkün kılar. Bunun yanında, yetişkin MSS sinaptik plastisite becerisini tamamen kaybetmemiştir. Hatta bazı durumlarda lokal olarak juvenil ortam tekrar oluşturularak sinaptik plastisite kapasitesi arttırılabilir.

2.1.1. Beyin Ekstraselüler Matrisin Moleküler Yapısı

Memeli MSS'de ESM, hyaluronan (HA) iskeleti üzerine çeşitli proteoglikan ve glikoproteinlerin nonkolavent bağlanmasıyla oluşur (26). HA, omurgalılarda bulunan en büyük polisakkarittir ve yüksek hidrojen bağı kapasitesiyle bilinir. Birden fazla HA zinciri bir araya gelerek ağsı yapılar oluşturabilir (40) ya da iki HA molekülü aynı su molekülüyle hidrojen bağı kurarak ortak bir yapı oluşturabilir (41). ESM'de HA iskelete versikan, brevikan, nörokan, agrekan, fosfakan gibi kondroitin sülfat proteoglikanlar (KSPGler), ve tenaskin-C (TnC) ve tenaskin-R (TnR) gibi glikoproteinler eşlik eder (36,42–44). ESMde ayrıca bu moleküllerin HA ile bağlantısını sağlayan link proteinleri bulunur (Şekil 2.1).

Hyaluronan sentezlendiği gibi ekstraselüler boşluğa salınır. Serbest halde bulunabildiği gibi, HA sentaz aracılığıyla veya hücre yüzeyindeki, CD44 gibi, HA reseptörlerine tutunarak hücreye bağlı kalabilir. ESM'nin diğer önemli yapıtaşlarından KPSG'lerin bir ucunda HA'ya bağlanan N-terminal G1 bölgesi, diğer ucunda TnR'lere bağlanabilen C-terminal G3 bölgesi ve orta bölgelerinde glikozaminoglikan (GAG) zincirlerini taşıyan gövdeleri bulunur. GAG'ler, büyüme faktörlerine ve büyüme faktör reseptörlerine bağlanma kapasiteleriyle önemli bir fizyolojik görev üstlenirler.

Olgun ESM, yetişkin beyinde üç formda görülür; tüm beyne dağılmış halde bulunan yaygın perisinaptik ESM, ranvier nodları saran perinodal ESM ve perinöronal kılıf (PNK) olarak isimlendirilen ve MSS nöronlarının gövde ve proksimal nöritlerini saran yoğun özelleşmiş yapılar (42).



Şekil 2.1: Ekstraselüler matris

2.1.1.1. Perinöral kılıf: ESM yapısı içerisinde PNK'ler hem yapısal hem fonksiyonel olarak farklılaşmış yapılardır. Nöronal hücre gövdesini saran ve dendritlerine doğru uzanan; temelde HA sentaz, link proteinler ve KSPG (çoğunlukla agrekan) moleküllerinden oluşan yapılardır (45). MSS'nin neredeyse tamamında PNK kaplı hücreler bulunur. PNK bileşenlerinin üretimi erken postnatal dönemde deneyimlenen duyusal uyaranlarla tetiklenir (46).

PNK'ler sinaptik bağlantıların gelişimini ve stabilizasyonu için stratejik bir konuma sahiptirler. Nöron çevresinde yerleşimi, kurulmuş nöral ağların stabilize edilmesi ve yeni deneyimlerle gerçekleşebilecek plastisitenin sınırlandırılmasını sağlar. PNK yapılarının bozulması ise MSS'de plastisiteyi tekrar aktive eder ve nöral ağları yeniden yapılandıracak aktiviteye bağlı değişimlere izin verir (4).

Beyinde PNK kaplı hücreler çoğunlukla inhibitör internöronlardır. Kortekste PNK'ler parvalbumin ekspres eden hızlı ateşlenen GABAerjik nöronlarda ve daha derin kortikal katmanlardaki pramidal nöronların çevresinde görülür (47). Amigdala ve hipokampüs gibi başka beyin bölgelerinde ise PNK'ler hem eksitatör hem inhibitör nöronları çevrelerken görülebilir (48).

Vicilia villosa ve Wisteria floribunda, KSPG'lerin N-asetilgalaktozamin rezidülerine ve glikoproteinlerine bağlandıklarından PNK belirteçleri olarak değerlendirilirler (7). Ancak WFA-negatif PNK'ler de mevcuttur; özellikle kortikal çıktı nöronları WFA ile görüntülenemez ancak agrekan antikorlarıyla görüntülenebilirler (49). Beyinde ESM proteinlerinin bölgesel dağılımı kütle spektrometresiyle analiz edildiğinde agrekanın özellikle izokorteksteki PNK'lerde yaygın bulunduğu saptanmıştır (47). Brevikan ise yoğunukla hipokampüste PNK ve akson başlangıç segmentinde görülür (50).

2.1.1.2. Perinodal ekstraselüler matris: Perinodal ESM ise molekük içeriği ve yoğunluk olarak PNK'lere benzeyen ancak ranvier nodlarının etrafını saran yapılardır. Bu yapının aksiyon potansiyeli üretilen bir bölgede konumlanması, sinir iletiminde iyonik olayların düzenlenmesinde görevli olabileceklerini düşündürmektedir (43,44).

2.1.2. Beyin Ekstraselüler Matrisin Fonksiyonel Özellikleri

ESM, beyinde gelişimin regülasyonu, doku homeostazının sağlanması, hücre göçü, proliferasyon ve başkılaşım gibi işlevsel roller üstlenir (53). Bunun yanında remiyelinasyon, kök hücre depolanması, reaktif oksijen türlerine karşı koruma sağlamak da temel görevleri arasındadır (54–56). Yetişkin nöral ağlarda ESM bütünlüğü, eksitasyon-inhibisyon dengesinin ve daha önce kurulmuş nöral ağların korunmasına katkı sağlar (57). Presinaptik ESM sinaptik reseptörlerin yapı ve hareketliliğini, nörotransmitterlerin difüzyonunu kontrol eder. Olgun ESM'nin yetişkin beyninde ihtiyaca ve aktiviteye bağlı olarak var olan ağların adaptasyonunu ve yeni ağların kurulmasını düzenleyen bir şalter olabileceği düşünülmektedir (3,10).

ESM moleküllerinin işlevleri, çeşitli antikorlar, rekombine protein uygulaması, enzimatik sindirim ve genetik manipulasyonla ESM moleküllerinin ekspresyonunun engellenmesi gibi çeşitli yöntemlerle detaylı olarak çalışılmıştır.

ESM ekspresyonu genetik mutasyonla azaltılmış farelerde hayat boyu juvenil plastisite korunur (43). ESM, MMS'de akson rejenerasyonunu sınırlandırır; fiziksel travma sonrası ESM moleküllerinin azalmasına paralel olarak aksonal rejenerasyon da artar (58). KSPG'ler ve tenaskin gibi bazı diğer ESM proteinleri nörit uzamasını *in vivo* ve *in vitro* inhibe etmektedir (59). Ancak güncel çalışmalar, KSPG'lerin büyümeyi destekleyen etkilerinin de olabileceği ve bu etkilerin nöron tipine ve

proteinin sülfatlanma biçimine göre değiştiğini öne sürülmüştür (60,61). Brevikan; TnR, nörofaskin ve Bral2 bileşenleriyle etkileşerek ESM organizasyonuna da destek verir ve brevikan kaybını sinaps kaybı takip eder (62). Listelenen moleküllerin tamamı serebellum, izokorteks ve beyin sapı gibi beynin daha dış bölgesinde bulunan dolayısıyla hasara daha açık ve yapısal desteğin en önemli olduğu bölgelerde yoğunluktadırlar. TnC'nin ekspres edilmemesi yahut HA'nın degredasyonuyla bilişsel esneklik artmaktadır (10,11).

Erken postnatal dönemde bilateral intrahipokampal HYaz enjeksiyonunu takiben epileptik nöbetler görülmektedir (63). Takip eden çalışmalarda HYaz ile ESM degredasyonunda ortaya çıkan çok sayıda düşük molekül ağırlıklı fragmanların inflamatuar yanıtı tetiklediği ve bu sebeple aktive olan kemokinlerin epileptik sürece yol açabileceği değerlendirmesi yapılmıştır (64). Ayrıca HA ekspres etmeyen farelerde epileptik fenotip görülmektedir (65). HA hidrasyon kapasitesi çok yüksek bir molekül olduğundan, eksikliğinde ekstraselüler boşluğun küçüldüğü ve artan potasyum yoğunluğu sebebiyle epileptik aktivitenin arttığı yorumu yapılmıştır.

İnsan çalışmalarında ESM'nin Alzheimer ve şizofreni hastalarında değiştiği ve patolojinin bir parçası olabileceği ortaya koyulmuştur (66,67). Şizofrenide ESM değişimi özellikle amigdala, entorinal korteks ve çeşitli kortikal katmanlarda görülürken, Alzheimer's hastalarında ESM değişiminin plak oluşumuyla ilişkisi olduğu düşünülmektedir. İzokortekste agrekan temelli ESM yapıları, özellikle tau patolojisini takip eder bir dağılım gösterir (68). Agrekan içeren PNK'lerle kaplı bazı internöronlar ve primidal hücreler nörofibrilar yumaklardan korunmaktadır. Bu da özelleşmiş PNK yapılarının degredasyona karşı seçici direnç geliştirmede etkili olabileceğini göstermektedir.

2.1.2.1. Sinaptik plastisite ve ekstraselüler matris ilişkisi: Sinaptik plastisite; sinapsların aktiviteye bağlı olarak zamanla güçlenmesi veya zayıflaması durumudur (69). Bir diğer değişle nöronların bağlantı kuvvetini değiştirme becerileridir ve öğrenme, bellek, hasar sonrası nöral ağların onarımı süreçleri için olmazsa olmazdır (70). Sinaptik plastisite bir nöronun kendi aktivitesine bağlı olabilir (homosinaptik) ya da başka bir ağın bu nöron üzerindeki etkisiyle oluşabilir (heterosinaptik) (71).

Homosinaptik plastisite iki gruba ayrılır; sinaptik depresyon ve sinaptik fasilitasyon. Bu plastisite türleri arda rda gelen iletilerin frekansına bağlı olarak oluşur.

Örneğin; iki aksiyon potansiyeli 200msn arayla sinapsa ulaştığında, postsinaptik nöronla oluşan ikinci potansiyel ilkinden çok daha küçük olur ki bu sinaptik depresyondur. Bunun en büyük sebebi ilk uyaranla birlikte presinaptik bölgede hazır bulunan nörotransmitterlerin salınmış olması ve ikinci uyaran öncesinde yeterli miktarda nörotransmitter dolu vesikül hazırlanamamış olmasıdır. Öte yandan iki potansiyel arası süre 20msn gibi kısa bir süre ise; postsinaptik nöronda ilkinde çok daha büyük bir potansiyel oluşacaktır ki bu sinaptik fasilitasyondur. Burada da temel sebep ilk uyaranla presinaptik bölgeye giren Ca^{2+}'un henüz hücre dışına atılmadan yeni uyaranla daha çok Ca^{2+} girişi olması ve çok daha fazla vezikülün salınımının gerçekleşmesidir (72). Homosinaptik plastisite türleri aynı zamanda kısa-vadeli plastisite (STP) olarak da bilinir.

Heterosinaptik plastisite türleri ise presinaptik inhibisyon ve presinaptik fasilitasyondur (73). Burada da postsinaptik potansiyelin güçlenmesi veya zayıflaması başka bir nörondan gelen uyaranın, presinaptik nöron üzerindeki etkisi sayesinde oluşur.

Bir sinapsta bu olaylardan birkaçı aynı anda gerçekleşebilir ve bunların uzun vadede tekrar etmesi uzun-vadeli plastisiteyi oluşturur (74). Genel olarak sinaptik iletinin güçlenmesi şeklinde gerçekleşen plastisite uzun vadeli potansiyasyon (LTP) olarak isimlendirilir. Bunun tam tersi olarak iletinin zayıflaması ise uzun vadeli depresyon (LTD) olarak adlandırılır.

Sinapsların mimarisi hem hücre-hücre hem hücre-ESM etkileşimleri tarafından şekillendirilir. ESM sadece sinapsları saran fiziksel bir yapı olarak değildir, membran proteinlerinin mobilitesi ESM molekülleri tarafından kontrol edilir ve ESM-reseptör ilişkileri sinaptik plastisitenin regülasyonunda önem taşır. ESM moleküllerinin sindirimi membran proteinlere, kanallara ve reseptörlere mobilite kazandırarak STP'yi etkiler.

Beyinde endojen proteazlar aracılığıyla ESM yapısının modüle edildiği ve bu yolla öğrenme ve hafıza oluşumu için sinaptik plastisitenin arttığı aralıkların oluştuğu saptanmıştır (4,75). Ayrıca ESM'nin postsinaptik glutamat reseptörleri ve voltaj kapılı Ca^{2+} kanallarını etkileyerek STP'yi düzenlediği görülmüştür (76–78). TnR, voltaj kapılı Na^{+} kanallarıyla etkileşerek Na^{+} akımını yükseltir ve aksiyon potansiyel hızını değiştirir (79,80). TnR aynı zamanda presinaptik GABA salınımını da kontrol eder ve yokluğunda hipokampüste LTP eşiğinde yükselme görülür (81). Öte yandan brevikan sindirimi AMPA reseptörlerinin ve K^{+} kanallarının hareketini düzenler (82).

ESM ve MSS arasındaki etki çift yönlüdür. Bir yandan nöral aktivite PNK'leri regüle ederken, PNK de nöral aktiviteyi düzenler. Örneğin tamamen karanlıkta yetiştirilen kedilerde ve kemirgenlerde primal görme korteksi nöronlarında PNK yapılarının oluşmadığı gösterilmiştir (83,84). Benzer şekilde, aksonları kesilen ya da NMDA reseptörü bloklanarak aferent girdisi kesilen motor nöronlarda, strabismus ve işitme kaybında ilgili kortikal alanlarda PNK oluşumunda azalma görülür (6,85,86).

Korku şartlanma paradigmasında, yani amigdala aktivitesine bağlı bir korku öğrenme deneyinde, PNK zengin bir bölge olan amigdalaya ChABC enjekte edilmesi sonrasında öğrenilmiş korkunun söndürülmesini sağladığı görülmüştür ki bu sadece juvenil farelerde mümkün olduğu bilinen bir durumdur (87). Diğer bir değişle, PNK'ler edinilen öğrenme ve belleğin korunmasını sağlar (88). PNK'lerin bu işlevi bağımlılık çalışmalarında da test edilmiştir. Kokain ve eroin bağımlılığı çalışmalarında, yoksunluk dönemi sonrası maddeyle tekrar karşılaşmak nüksetmeye sebep olurken, amigdalanın ChABC ile enjekte edilmesi ile bu nüksetmenin önlenebildiği görülmüştür (89).

PNK'nin enzimal uzaklaştırılması görme korteksi, amigdala ve omurilikte sinaptik plastisiteyi değiştirmiştir (87,90,91). Değişimin yönü ise değerlendirilen bölgeye ve hayvanların yaşına bağlı olarak farklılık göstermiştir. Kemirgenlerde normal davranışsal olaylar karşında da PNK'lerde değişiklik olabileceği saptanmıştır. Yetişkin farelerde zenginleştirilmiş çevresel uyaran karşısında görme sistemi ve serebellumda PNK kaplı nöronların sayısında azalma görülürken, işitsel korku belleği ediniminde kortekste PNK miktarı artar, öğrenmeyle hipokampal PV+ hücrelerde brevikan miktarı azalır (88,92–94).

2.1.2.2. Parvalbumin pozitif internöronlar: PNK yapılarının en yaygın görüldüğü nöron tipi PV+ internöronlardır. Bu nöronlara ismini veren parvalbumin bir kalsiyum bağlayıcı proteindir. Parvalbumin presinaptik bölgede Ca^{2+} geri salınımını yavaşlatır ve nörotransmitter salınımını geciktirir (95,96). Bu işlevi sayesinde sinaptik fasilitasyonu ve tekrarlı GABA salınımını sınırlandırır (97,98). Aynı zamanda nöronları patofizyolojik olabilecek seviyelerde yüksek Ca^{2+}'dan korur (99). PV+ nöronlar dendritler arası gap junctionlar sayesinde sinsityum oluştururlar ki bu da gama osilasyonlarını oluşturur (100,101). Gama osilasyonları bilinen en yüksel frekanslı dalgalardır ve bilişsel işlevler, öğrenme, bellek, bilgi işleme gibi fonksiyonlardan sorumlu

olarak bilinir. Bu osilasyon anksiyete, uyarılma ve stres durumlarında yaygın görülürken; dikkat eksikliği ve hiperaktivite bozukluğu, depresyon ve öğrenme bozukluklarında baskılanmış haldedir. Optimal koşullarda gama osilasyonları yüksek dikkat, duyuların ilişkilendirilmesi, bilinçli kararlar ve derin kavrama süreçlerinde aktiftir (102).

PV+ internöronlar inhibitör etkileriyle birçok beyin bölgesinde bulunmaları sayesinde sinaptik plastisiteyi düzenleyen önemli mekanizmalardandır. Nöral aktivitelerinin çevrelerinde bulunan PNK'ler tarafında kontrolü, ESM'nin plastisiteyi ve öğrenmeyi düzenleyici rolünü anlamak için önemlidir.

2.1.2.3. Ekstraselüler matris elemanlarının katabolizması ve fonksiyonel özellikleri: ESM ve PNK'lerin degredasyonu sadece dışarıdan uygulamalarla gerçekleşmez, fizyolojik koşullarda da beyinde ESM moleküllerini parçalayan endojen proteazlar mevcuttur. ESM'nin katabolizması beyinde hemostazın sağlanması için oldukça önemlidir ve bu işlem ADAMTS (trombospondin motifli disintegrin ve metaloproteinaz) ve MMP (matris metalloproteinaz) grubu enzimlerle sağlanır (26). Hem ADAMTS, hem MMP proteazları ESM'deki proteoglikanları parçalarlar. Aralarındaki fark ise aynı molekülleri farklı noktalarından parçalamalarıdır ki bu kataliz ürünlerini dolayısıyla fonksiyonlarını çeşitlendirir (103,104). Bu proteazlar, tıpkı ESM molekülleri gibi nöron ve glialar tarafından sentezlenir ancak normal şartlarda aktiviteleri oldukça düşüktür. MMP'lerin aktiviteleri sadece, sinaptik plastisitenin başlatılması ya da iyileşme gibi belirli pencerelerde artar. Bu enzimlerin aktivitesi hem patolojik hem fizyolojik şartlarda sinaptik plastisite, öğrenme ve bellek için önem arz eder (105,106).

MMP3 ve MMP9, sinaptik plastisitedeki rolleri sebebiyle, üzerinde en çok çalışma yapılmış enzimlerdenlerdir (105,107,108). Örneğin, Morris su labirenti gibi hipokampüs-bağımlı öğrenme süreçlerinde, deneyin ilk günlerinde MMP3 ve MMP9 proteazlarının ekspresyonunun ve mRNA miktarlarının arttığı tespit edilmiştir (109). Bu proteazların ve ADAMTS4'ün MMS'de hasar sonrası da arttığı, bu artışa bağlı olarak azalan KSPG aktivitesi sayesinde rejenerasyonunu mümkün olduğu tespit edilmiştir (110).

Karanlıkta yetiştirmeye bağlı PNK azalmasında MMP9 proteazındaki artışın etkili olduğu bilinmektedir (111). MMP9 aynı zamanda, kemirgenlerde epileptik nöbetlerin ardından ve korku şartlanma sırasında salgılanmaktadır (112). Nöbetler sonrası PNK bölgelerinde parçalanmış agrekanlara rastlanmaktadır ki bu da lokal

sindirimin göstergesi olarak değerlendirirlir. Benzer şekilde eksitotoksisite sonrası brevikan molekülünün ADAMTS1 ve ADAMTS4 ile degrede edildiği tespit edilmiştir (113). Brevikan, ADAMTS4 ile bölünmesini takiben agrekanda da parçalanmaya yol açarak sinapslardaki kuvvetli ESM yapısını çözer ve sinaptik plastisiteyi arttırır (114). MMP9 aktivasyonu aynı zamanda pasif sakınma, korku şartlanması ve korku belleğin pekiştirilmesi için gereklidir (115–117).

İnsan çalışmalarında, stresli uyaranların ardından ve majör depresyon hastalarının serumlarında MMP9 başta olmak üzere çeşitli MMP'lerin miktarının arttığı görülmüştür (118–120). Üstelik bu artış depresyonun şiddetiyle orantılı değişmektedir (121). Elektrokonvulsif terapi sonrasındaysa MMP9 miktarının azaldığı görülmüştür (122). Hayvan modellerinde depresyonla sonuçlanabilen tekrarlı stres modelinde, MMP9 aktivitesinin CA1 de arttığı görülmüştür (123). Bunun yanında tek uygulamalı stres maruzşyetinde de hipokampüste MMP9 aktivitesi artmaktadır (124). Dikkat çekici bir şekilde, MMP9 aktivitesinde benzer değişiklikler otizm spektrum bozukluğunda da kortekste yoğunlaşmış şekilde görülür (125,126).

Literatür göstermektedir ki, PNK'lerin modülasyonu; MMP aktivitesi, PNK moleküllerinin hücre içine alınması ya da hücre tarafından sentez miktarlarının değişmesi üzerinden sağlanır. MMP aktivitesi daha hızlı ve bölgesel modülasyon sağlayabilmesi açısından plastisite ve bellek ilişkili eventlerden sorumludur. Zira hücresel sentez ve içeri alınma işlemleri sonucu ESM yapım-yıkım döngüsü, saatler hatta günler sürebilen yavaş bir düzenleme sistemidir (127).

2.2. ÇOCUKLUK ÇAĞI TRAVMALARI

Çocukluk döneminde deneyimlenen duygusal ve fiziksel şiddet, ebeveyn kaybı, savaş, göç, doğal afetler, şiddete tanıklık etme gibi fiziksel, duygusal, cinsel istismar ve ihmal sonucu gelişen, fiziksel ve ruhsal sağlığa zarar veren travmalar çocukluk çağı travmaları (ÇÇT) olarak tanımlanır (18). ÇÇT geçmişi olan yetişkinlerde çeşitli fizyolojik ve psikolojik patolojilerin görülme riskinin arttığı da çok sayıda çalışmada gösterilmiştir (15,19,128–130). Bu patolojiler arasında; obsesif kompulsif bozukluk, major depresyon, antisosyal kişilik bozukluğu, sınır kişilik bozukluğu, somatizasyon bozukluğu, dikkat eksikliği ve hiperaktivite bozukluğu, travma sonrası stres bozukluğu, şizofreni, otoimmun hastalıklar, madde kullanım bozukluğu, iskemik kalp ve karaciğer hastalıkları bulunmaktadır. ÇÇT'nin yetişkinliğe yansımalarının niteliği; maruz kalınan stresin

süresi, şiddeti ve erken çocukluk ya da ergenlik döneminde maruz kalınmış olması gibi etkenlere göre farklılık göstermektedir (128). ÇÇT'nin, beyin gelişiminin hızla sürdüğü ve yoğun sinaptik plastisitenin görüldüğü erken çocukluk dönemde gerçekleşmesi, ömür boyu kalıcı sonuçlara sebebiyet vermektedir.

2.2.1. Çocukluk Çağı Travmalarının Beyin Gelişimine Etkileri

Memelilerde -özellikle insanlarda- doğum sırasında beyin gelişimi tamamlanmamıştır ve gelişimin önemli bir kısmı postnatal olarak devam eder. Postnatal beyin gelişimini temelde dört adım olarak değerlendirebiliriz; nöral dallanma, sinaptogenez, sinaptik budama ve miyelinizasyon (131). Kritik dönem olarak da adlandırılan bu gelişim sürecinin gerçekleşme hızı ve süresi beynin farklı bölgeleri için değişiklik göstermekle birlikte, yaklaşık olarak aynı sırayı gözetmektedir (132).

Doğumu takip eden iki yıl içerisinde akson ve dendrit uçlarında dallanma ve yeni sinaptik bağlantıların kurulması çok yüksek bir hız ve yoğunlukta gerçekleşir (133). Öyle ki; doğum sırasında yetişkin beynin %36'sı boyutunda olan beyin, ilk yılın sonunda yetişkin beynin %70'i büyüklüğe ulaşmış olur (134). Bu hızlı gelişimi takiben beyinde kurulan sinapsların yarısına yakınının yıkıldığı sinaptik budama dönemi başlar (135). Bu dönemin en önemli prensibi "kullan ya da kaybet" olarak bilinir çünkü sözkonusu budama özünde kullanılan sinaptik bağlantıların kuvvetlendiği ve kullanılmayanların yokedildiği bir dönemdir. Bu süreç yetişkinliğe kadar devam etmekle birlikte en çarpıcı etkisini doğumu takiben 5-6 yaşlarına kadar tamamlar. Postnatal beyin gelişiminin en çarpıcı özelliği çevresel faktörlere ve sosyal etkileşimlere bağlı olarak gerçekleşmesidir. Bu sebeple insan beyni sosyal bir organ olarak değerlendirilir.

Postnatal gelişimin ağırlıklı olarak gerçekleştiği beyin bölgelerinin başında amigdala, prefrontal korteks (PFK), orbitofrontal korteks (OFK), anterior singulat korteks (ASK), hipokampüs gibi duygusal regülasyon, korku, öğrenme ve bellek ile ilişkisi bilinen bölgeler gelir. Bu bölgeler temelde koordinasyon halinde çalışırlar ve sağlıklı korku yanıtı, stress regülasyonu ve karar alma gibi işlevlerden sorumludurlar.

Prefrontal korteksin ve -alt bölgesi olan- orbitofrontal korteksin gelişimi sosyal etkileşimin en önemli olduğu bölgelerdir. OFK'de yüz tanımada özelleşmiş nöronlar vardır ve bu nöronlar ve temporal korteksle iletişimleri sayesinde yüz ifadeleri ve taşıdığı duygusal anlamlar tespit edilir ve kaydedilir (136,137). İzole edilmiş veya insanlarla

iletişimi kısıtlanmış bir çocuğun orbitofrontal korteksinin gelişmesi neredeyse imkansız görülmektedir. Ebeveynlerle olumlu etkileşim -ki ebeveynin gülümsemesi dahi bunun bir parçasıdır- beta endorfin ve dopamin gibi nöral gelişime etkisi olduğu bilinen moleküllerin dolaşıma ve/veya nöronlar arası boşluğa salınmasını sağlar. PFK ve OFK'ye ulaşan moleküller, bu bölgelerin gelişimini ve diğer bölgelerle sağlıklı bağlantılar kurmalarını sağlar. Özellikle PFK ile amigdala arası bağlantılar sayesinde korku ve kaygı kontrol becerisi gelişir.

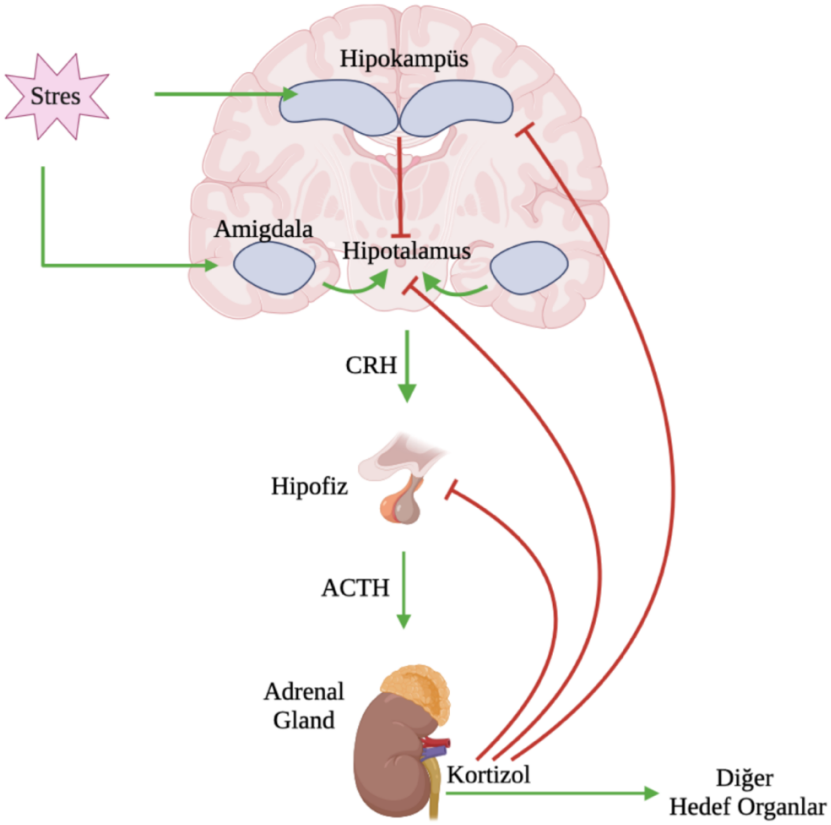
Yapılan çalışmalar, ihmal ve istismara maruz kalmış çocuklarda OFK boyutunun daha küçük olduğunu göstermiştir (138,139). Çocukluk dönemindeki olumsuz deneyimler -ki kızgın bir yüz ifadesi veya tepkisiz ve ilgisiz bir yüz ifadesi de buna dahildir- kortizol gibi stres hormonlarının salınmasına sebep olur. Kortizol, beta endorfin ve dopamin gibi hormonların etkisini durdurur. Ayrıca stres ve korku anında uyarılan amigdala uzun süre strese maruz kaldığında bölgede kan akışının artmasıyla anormal derecede büyür. Yapılan çalışmalar ÇÇT deneyimleyen yetişkinlerin daha büyük ve aktif bir amigdalaya sahip olduğunu göstermektedir. Olumsuz deneyimler ve artan stres aynı zamanda amigdala ve PFK arası nöral ağların kurulmasını zorlaştırmaktadır. Bu nöral ağın zayıflığı, OFK'nın amigdala üzerindeki inhibitör etkisini azaltarak, amigdalanın yüksek korku yanıtı oluşturmasına sebep olur. Bu durum yetişkinlikte bireyin daha kaygılı olmasına yol açmakla birlikte, yapılan çalışmalarda OFK-amigdala bağının zayıflığıyla depresyon arasında anlamlı korelasyonu görülmektedir (140,141).

Stres yanıtı ve kortizol beyin gelişimi için tamamen zararlı ve durdurucu değildir. Aksine gelişimin sağlıklı gerçekleşmesi için kortizole de ihtiyaç vardır ancak bu ihtiyaç daha çok 1 yaşını doldurmuş çocuklar içindir (142). Kortizol seviyesindeki artış medulladan PFK'ye norepinefrin akışını sağlar, böylece OFK'nin hipotalamus aracılığıyla parasempatik sisteme bağlantısı oluşturularak gelişimin devamı sağlanır. Bu bağlantı oldukça önemlidir çünkü inhibitör etkisi sayesinde ayaklanan çocuğun hem sosyal sınırları öğrenmesi hem tehlikeli eylemlerden uzak durması için gereklidir. Önemli olan stres durumunun ve kortizol miktarının uzun süreler yüksek kalmamasıdır. Stres durumundan çıkamayan çocuk için kortizol gelştirici değil tam aksine gelişmeyi etkileyici hal alır.

2.2.1.1. Hipotalamik-Pitüiter-Adrenal eksen: Canlı, tehdit içeren bir durumla karşılaştığında kendini korumasına olanak sağlayacak psikolojik ve davranışsal

tepkiler mümkün kılan bir stres yanıt sistemi devreye girer. Korku ve stress yanıtının merkezi olan amigdala hipotalamusu uyarır ve hipotalamus 2 fazlı kimyasal stress yanıtını başlatır (143). İlk ve hızlı devreye giren faz "kaç ya da savaş" olarak bilinen mekanizmadır. Bu mekanizma sempatik sinir sisteminin aktive olması ve epinefrin salgısıyla devreye girer. Kalp atışı hızlanır, kaslara ulaşan kan miktarı artar ve vücut tehlikeye karşı kaçma yahut savaşma tepkisi için hazır hale gelir.

Tehlikeye yanıt olarak daha geç devreye giren ve HPA eksen, hipotalamustan kortikotropin salıcı hormonun (CRH) salgılanmasıyla başlar (144). CRH anterior pitüiterdeki ilgili reseptörlere bağlanarak adrinokortikotropik hormon (ACTH) salınımını başlatır. ACTH adrenal kortekse ulaşarak G-protein coupled reseptörlere bağlanır ve kortizol salınımını başlatır. Kortizol MSS'nin geneline yayılmış halde bulunan glukokortikoid reseptörlerine bağlanarak beyinde birçok kritik işlem gerçekleştirir. Glukokortikoid reseptörleri transkripsiyon faktörü olarak çalışır ve gen ekspresyonunu düzenleyerek immün yanıt, metabolizma ve beyin gelişimi de dahil olmak üzere pek çok işlevi kontrol eder (145). Kortizolün buradaki amacı vücudun içinde bulunduğu tehlikeyle başedecek enerjiyi üretmesini ve gereksiz enerji tüketen sistemleri durdurmasını sağlamaktır. Bu sebeple immün sistem, öğrenme ve yeni sinaptik bağların kurulumu baskılanır, enerji üretimi artar (146). Ardından hipokampüs aracılığıyla hipotalamus ve pitüiter bezden sırasıyla CRH ve ACTH salınımını inhibe ederek kendi salınımını durduran negatif geribildirim mekanizmasını çalıştır (Şekil 2.2) (147).



Şekil 2.2: Hipotalamik-Pitüiter-Adrenal eksen

Uzun süreler ÇÇT deneyimi yaşamış bireylerde, vücudun biyolojik stress yanıtı olan Hipotalamus-Hipofiz-Adrenal aksta kalıcı değişiklikler görülür (148). HPA eksenin temel elemanlarından olan kortizol, kritik dönemde, bazı beyin bölgelerinin ve nöral ağların gelişiminde önemli bir role sahiptir. Ancak erken gelişim döneminde maruz kalınan kronik stres ile kortizol düzeyinin uzun süreler yüksek seviyelerde kalması, beyin genelinde glokokortikoid reseptörlerinin hassasiyetini kaybetmesine yol açar. Bu hassasiyet kaybı kortizolün HPA eksen üzerindeki negatif geri bildirim rolünü gerçekleştirmesini engeller ve homeostaz bozulur. Bunun sonucunda hipokampüs, orbitofrontal korteks ve prefrontal kortekste hücre ölümleri başlar (138,139,149,150). Bu bölgelerde hücre ölümlerine bağlı aktivite azalmasıyla normal şartlarda görülmesini beklediğimiz amigdala üzerindeki inhibisyon sağlanamadığı için amigdala aşırı reaktif hale gelir (140,151). Tüm bunlar beyinde seratonin, norepinefrin ve kortizol için yeni normal değerler tanımlayarak, uzun vadede strese karşı hassasiyeti arttır, hafızayı ve bilişsel esnekliği olumsuz yönde etkiler.

2.2.2. Çocukluk Çağı Travmaları Hayvan Modelleri

Çocukluk çağı travması oluşturmak için kullanılan en yaygın modeller; maternal seperasyon, neonatal izolasyon, azaltılmış maternal ilgi veya bunların kombinasyonlarıdır.

Kemirgenlerde erken dönemde kronik stres maruziyeti, yetişkinliğe kadar uzanan ve insanlarda anksiyete yanıtına benzer davranış değişimlerine sebep olur. Bu davranışların başında donma, artmış korku yanıtı, gastrointestinal motilite artışı, besin alımında azalma, defekasyonda artış, uyku bozuklukları, bellek ve dikkat eksikliği gelir (152). Yine insanlarda olduğu gibi stres yanıt sisteminin parçası olan hormon ve nörotransmitterlerin salınımında da değişimler görülür.

Literatürde dikkat çeken bir diğer nokta ise, kemirgenlerde yavruların strese karşı HPA eksen yanıtı göstermemesidir. Buna rağmen bu dönemde deneyimlenen stres sonucu ilerleyen yaşlarda HPA eksende farklılıklar görülür. Öncelikle hipokampüs, hipotalamus ve FK'de glukokortikoid reseptörlerinin miktarı azalır (153–156).

Tüm bunların yanında, ÇÇT hayvan modellerinin yetersiz kalabileceği noktalar olduğunu da göz önünde bulundurmak gerekir. Bu modeller stres ve travma ile ilgili tek boyutlu bir yaklaşımda bulunabilmektedir. Halbuki insanlarda ihmal ve istismar kompleks ve birçok faktörü içinde barındıran bir yapıya sahiptir. Aile yapısı, psikolojik savunma mekanizmaları, strese verilen kişisel yanıtlar hayvan modellerine yansıtması mümkün olmayan faktörlerdir.

2.3. BİLİŞSEL ESNEKLİK

Yürütücü işlevlerden biridir ve planlama, dikkati sürdürme ve işler bellek gibi diğer yürütücü işlevlerle doğrudan ilişkili olarak çalışır (157). Bilişsel esneklik; bir konuya farklı açılardan bakabilmeyi, değişen şartlara ve kurallara adaptasyonu, alternatiflerin farkında olabilmeyi, dolayısıyla hem sosyal hem bilişsel anlamda problem çözebilmeyi sağlar. Anoreksiya nevroza, obsesif-kompulsif bozukluk, şizofreni, otizm ve hatta madde bağımlılığı gibi patolojilerde bilişsel esnekliğin azalmış olduğu bilinmektedir (158–160).

Bilişsel esneklik; mevcut biliş, davranış ve duyguyu baskılayarak, dikkatimizi değişen şartlar sonucu doğru tercihe seçici ve aktif bir çabayla yöneltmeyi gerektirir

(161). Bu yüzden bilişsel esneklik, inhibitör nöral yolakların ve osilasyonların stratejik öneme sahip olduğu bir beceridir.

Bilişsel esneklik insanlarda ve hayvanlarda çeşitli görevlerle test edilebilir. Örneğin "dikkat seti değişen görev" testlerinden olan Wisconsin kart eşleme testiyle kartlarda bulunan görseller üzerinden bir kural belirlenir ve katılımcının seçimlerine göre pozitif-negatif geribildirim yapılır. Testin bir noktasında kurallar değiştirilir ve katılımcının yeni kuralı fark ederek buna uyum sağlaması beklenir (162). "Görev değiştirme" olarak bilinen diğer test türünde ise katılımcıya eş zamanlı gerçekleşecek iki ayrı görev verilir. Uyaranın türüne göre bu görevlerden birini gerçekleştirmesi istenir. Yeterli tekrardan sonra uyaran türü değiştirilerek iki görevden diğerini uygulaması beklenir (163). "Tersine öğrenme" testinde ise birine pozitif birine negatif geribildirim verilen iki uyaran sunulur. Katılımcı doğru uyaranı pozitif geribildirimle ilişkilendirmeyi başardıktan sonra uyaranların yanıtları ters çevrilir ve katılımcının bunu fark edip yeni kuralı tespit etmesi beklenir (164–166). Görüldüğü gibi bilişsel esnekliği ölçmek için kullanılan testler bir noktada kuralların, şartların değiştirilmesine bağlıdır. Bu testler gerekli uyarlamalarla, geribildirimlerin ödül yahut ceza olarak uygulanmasıyla hayvanlar için de uygulanmaktadır (13).

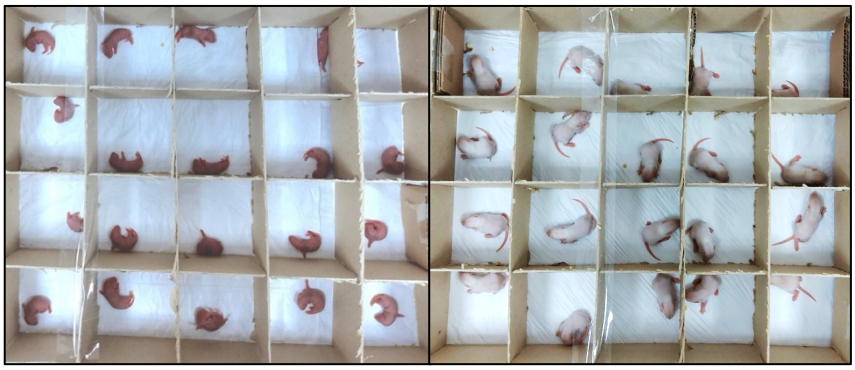
3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. DENEY DİZAYNI VE GRUPLARIN OLUŞTURULMASI

Çalışmada toplam 40 adet Sprague-Dawley erkek rat kullanıldı. Hayvanların bakımı ve üretimi Sağlık Bilimleri Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarı'nda yapıldı. Tüm hayvan deneyleri Sağlık Bilimleri Üniversitesi Hamidiye Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 19.03.2021 tarih ve 2021-02/02 sayılı onayıyla gerçekleştirildi (Ek-1). Kullanılan hayvanların 24 adetiyle doğumu takiben ÇÇT oluşturuldu.

3.1.1. Çocukluk Çağı Travma Modeli

ÇÇT modelini oluşturmak için literatürde sıkça kullanılan maternal seperasyon ve neonatal izolasyon düzeneklerinin kombinasyonu kullanıldı (167,168). Doğumun gerçekleştiği gün postnatal 0.gün (PN0) olarak kabul edilip, ratlar PN2'den PN14'e kadar her gün, günde 3 saat olmak üzere annelerinden ayrılıp farklı bir odada izole olarak kalacakları düzeneğe yerleştirildi. Düzenek, homeotermik battaniye (Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA) ve hasta altı bezi üzerinde 10 cm x 10 cm genişliğinde ve 10 cm yüksekliğinde bölmeler şeklinde hazırlandı (Resim 3.1) ve her bir hayvan bir bölmeye yerleştirilerek izolasyon gerçekleştirildi. Her gün işlemin sonunda yavrular annelerinin bulunduğu kafese geri yerleştirildi. PN14 sonrasında yavrular herhangi bir işlem yapılmadan büyümeye bırakılıp, laktasyonun sonlanmasıyla cinsiyetlerine göre yeni kafeslere alınıp normal şekilde bakımları sürdürüldü.



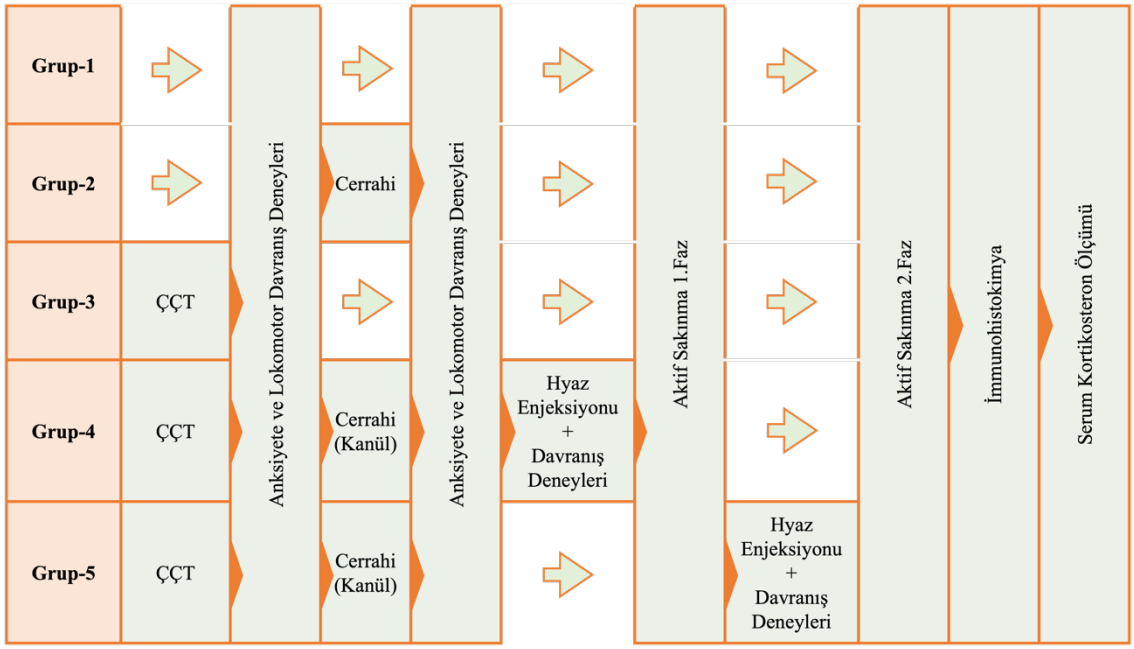
Resim 3.1: Çocukluk çağı travma modeli düzeneği (Sol; PN3, sağ; PN10)

3.1.2. Deney Grupları ve İş Akışı

Çalışma her bir grupta 8 denek olmak üzere (n=8) 5 grup ile gerçekleştirildi (Tablo 3.1). Denek sayısını belirlemek için "Power analysis/Güç analizi" yapıldı. Deneyde elde edilecek verilerin grup ortalamaları arasında anlamlı farkın bulunabilmesi için -deney sırasında olası kayıplar da göz önünde bulundurularak- her gruptaki denek sayısı 8 olarak belirlendi. (Tip 1 hata = 0.05, Testin gücü = 0.80). Güç analizi için G*Power yazılımının 3.1.9.4 versiyonu kullanıldı. Çalışma boyunca yapılan uygulamalar Şekil 3.1'deki iş akış diyagramında sunulmuştur.

Tablo 3.1: Deney grupları

Grup No	Grup Adı	Uygulama
Grup 1	Kontrol	Çocukluk Çağı Travma Modeli oluşturulmayan ve herhangi bir enzim enjeksiyonu yapılmayan grup
Grup 2	Sham Kontrol	Çocukluk Çağı Travma Modeli oluşturulmayan, kraniyum delindikten sonra kanül takılmadan kapatılan herhangi bir enzim enjeksiyonu yapılmayan grup
Grup 3	ÇÇT	Çocukluk Çağı Travma Modeli oluşturulan ve davranış deneyi sırasında herhangi bir enzim enjeksiyonu yapılmayan grup
Grup 4	ÇÇT + Faz 1 HYaz	Çocukluk Çağı Travma Modeli oluşturulan ve davranış deneyi sırasında 1.fazdan önce hyaluronidaz enjeksiyonu yapılan grup
Grup 5	ÇÇT + Faz 2 HYaz	Çocukluk Çağı Travma Modeli oluşturulan ve davranış deneyi sırasında 2.fazdan önce hyaluronidaz enjeksiyonu yapılan grup



Şekil 3.1: İş akış diyagramı

3.2. GEREÇLER

Çalışma süresnce kullanılan cihazlar, yazılımlar ve kimyasallar Tablo 3.2 ve Tablo 3.3'de listelenmiştir.

3.2.1. Cihazlar ve Yazılımlar

Tablo 3.2: Çalışmada kullanılan cihazlar ve yazılımlar

Cihaz Adı	Üretici Firma
Aktif sakınma düzeneği	Ugo Basile
Floresan mikroskop	Zeiss, Vert.A1
Görüntü analiz yazılımı	Cellprofiler 4.2.5
Homeotermik battaniye	Harvard Apparatus
İnkübatör	Nüve
İstatistik yazılımı	Spss 22.0
Kablosuz mini hoparlör	Xiaomi
Kamera	Zeiss, Axiocam 105 Color
Kanül	P1 Technologies
Kryostat	Thermo Scientific, Cryostar Nx50
Mikroplaka okuyucu ve yıkayıcı	Biotek
Orbital çalkalayıcı	
Santrifuj	
Video takip sistemi	Any-Maze

3.2.2. Kimyasallar

Tablo 3.3: Deneylerde kullanılan kimyasallar ve üretici firmaları

Kimyasal	Üretici Firma	Ürün Kodu
anti-Agrekan primer antikor	GeneTex	GTX54920
anti-Parvalbumin primer antikor	Sigma Aldrich	SAB4200545
Dental akrilik	Imicryl	
ELISA kiti	Uscn Life Science Inc.	CEA540Ge
Etil alkol	Tekkim	TK200650
Flouroshield	Sigma Aldrich	F6182
Goat anti-mouse sekonder antikor	Abcam	Ab150120
Goat anti-rabbit sekonder antikor	Abcam	Ab175652
Hyaluronidaz	Sigma-Aldrich	HX0514
Ketamin	Pfizer	Ketalar
Ksilazin	Bioveta	Xylazinbio 2%
OCT doku gömme matrisi	Bioblock	Bioblock/125
Paraformaldehid	Biobasic	Pb0684
Pikrik Asit	Sigma Aldrich	
Potasyum fosfat	Biobasic	PB0445
Potasyum klorür	Biobasic	PB0440
Serum (goat)	Capricorn Scientific	GOA-1B
Sodyum fosfat	Biobasic	S0404
Sodyum klorür	Biobasic	DB0483
Sukroz	Multicell	800-081-CG
Triton X	Sigma Aldrich	1003243275
WFA-FITC antikoru	Invitrogen	L32481

3.3. DAVRANIŞ DENEYLERİ

Çalışmanın diğer aşamalarına geçmeden önce ÇÇT modelini doğrulamak ve stres yanıtının ÇÇT geçmişi olan hayvanlarda artıp artmadığını tespit etmek için 15 haftalık ratlara, (Grup 1 ve 2 de dahil olmak üzere) yükseltilmiş artı labirenti testi ve lokomotor aktiviteyi incelemek için açık alan testi uygulandı. Cerrahi işlem sonrası, yapılan işlemlerin etkisini incelemek için davranış testleri tekrar edildi.

3.3.1. Yükseltilmiş Artı Labirenti Testi

Yükseltilmiş artı labirent testi, deney hayvanlarında anksiyete düzeyini ölçmek amacıyla yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir (169). Anksiyete düzeyi, hayvanın kapalı kollarda daha fazla zaman geçirmesiyle ifade edilir. Kapalı kol aktivitesindeki artış (süre ve/veya girişler) anksiyete düzeyindeki artışa, açık kol aktivitesindeki artış (süre ve/veya girişler) ise anksiyete düzeyindeki azalmaya işaret eder (170). Yükseltilmiş artı labirent düzeneğinde test edilen hayvanın davranışları, tavanına yerleştirilen bir kamera yardımıyla bir nesne takip yazılımı (ANY-Maze Video Tracking System, Stoelting Europe, Dublin, Ireland) ile izlenerek takip edildi. Rat labirentin dört kolunun birleşme noktasına, açık bir kola bakacak şekilde yerleştirilerek her bir kola giriş sayısı ve kollarda geçirilen süre, toplam 300 sn süreyle ANY-Maze yazılımı ile otomatik olarak tespit edildi. Bu test birçok çalışmada maternal seperasyon prosedürünün uzun vadeli stres yanıtına etkilerini göstermek için kullanılmış olduğundan, çalışmamızda modeli doğrulamak amacıyla kullanıldı (129,171,172).

3.3.2. Açık Alan Testi

Yapılacak cerrahi işlemin motor kortekse hasar vermesi durumunda, bir sonraki adımda uygulanacak aktif sakınma testinden sağlıklı sonuçlar almak mümkün olmayacağından, cerrahi işlem sonrası lokomotor aktivitenin test edilmesi gerekmektedir. Literatür incelendiğinde ÇÇT modelinin yetişkin ratlarda lokomotor aktiviteyi değiştirmediği gösterilmiştir (129,171). Ancak, çalışmanın daha sağlıklı ilerlemesi için - cerrahi işlem öncesi ve sonrasında açık alan testi yapıldı. Bu test aynı zamanda anksiyete yanıtına dair de bilgi verdiğinden yükseltilmiş artı labirenti testini bu anlamda desteklemek için kullanıldı.

Açık alan test düzeneği deney hayvanlarının lokomotor etkinliklerinin gözlemlenebileceği bir test düzeneğidir. Düzenek 16 eşit kareye bölünmüştür ve merkezi

alan 4 adet merkezi kareye karşılık gelmektedir. Hayvanların davranışları test düzeneğinin tavanına yerleştirilmiş bilgisayara bağlı bir video kamera ile kaydedildi. Davranış parametrelerinin kayıt ve analizinde bir nesne takip yazılımı (ANY-Maze Video Tracking System, Stoelting Europe, Dublin, Ireland) kullanıldı. Her bir rat açık alan test düzeneğine belirlenen bir köşeden bırakıldıktan sonra 300sn süre ile davranışları kaydedildi. Kat edilen toplam mesafe ve mobilite süresi lokomotor aktivitenin bir ölçüsü olarak kullanıldı. Merkezi alana giriş sayısı ve bu alan içinde geçirilen zaman ise anksiyete davranışına ilişkin bir gösterge olarak kabul edildi (173,174).

3.3.3. Aktif Sakınma Testi

ÇÇT'ye bağlı bilişsel esnekliğin değerlendirilmesi için ESM'ce zengin işitme korteksini hedef alan, bilişsel olarak zorlu bir aktif sakınma testi uygulandı (10). Bu çalışmada amacımız sadece bilişsel esnekliği incelemek değil, bilişsel esnekliğin ÇÇT'ye bağlı değişimini ESM yapılanması ile ilişkili olarak incelemek olduğundan, tersine öğrenme testinin kemirgenlerde ESM'ce zengin işitme korteksini hedef alan ve plastisite gerektirdiği bilinen "frekans modulasyonlu (FM) ton ayırt etme ve tersine öğrenme bilişsel görevi" olarak ifade edilen bir versiyonu seçildi (175,176). Bu yöntem daha önce Happel vd. (2014) tarafından aktif sakınma düzeneğine entegre bir şekilde ESM'nin enzimal uzaklaştırımasının bilişsel esnekliğe etkilerini göstermek üzere kullanılmıştır. Yöntemin ilk fazıyla öğrenmeyi, ikinci fazıyla tersine öğrenmeyi, yani bilişsel esnekliği test etmek mümkündür.

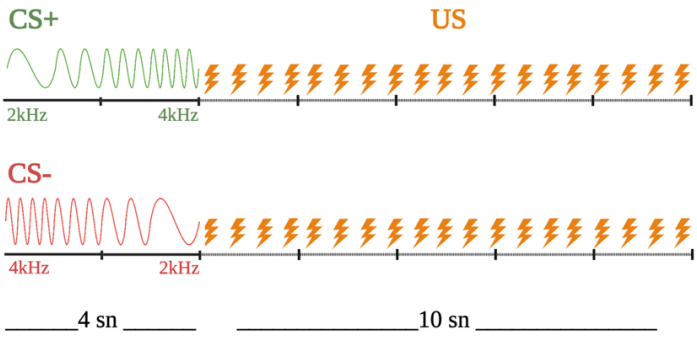
Aktif sakınma testi, şartlı olaylar için bağlantısal öğrenmeyi ve hafızayı değerlendirmekte kullanılır. Hayvanlar, zararlı uyarandan birkaç saniye önce verilen şartlı uyaran (CS) tarafından yönlendirilen belirli bir lokomotor tepkiyle zararlı bir uyarandan (US) kaçınmayı öğrenirler. Aktif sakınma test düzeneği zemin seviyesinde birbiriyle bağlantılı bir açıklığa sahip bir bölme ile ikiye bölünmüş 57x27x30 (h) cm boyutlarında bir kafes ve bu kafesle bağlantılı kontrol ünitesinden oluşmaktadır. Her iki bölmede ayak şokunun uygulanabileceği bir ızgara zemin bulunmaktadır. Kontrol ünitesi aktif sakınma test yazılımını içeren kompakt bir bilgisayardan oluşmaktadır. Aktif sakınma test yazılımı ile uygulanacak elektrik akımı, ışık ve ses parametreleri belirlenebilmekte ve deneye ilişkin protokol, deney takibi ve veri kaydı yapılabilmektedir. Aktif sakınma testinde rat aktif sakınma düzeneğinin bölmelerinden birine yerleştirilir ve öğrenme oturumları gerçekleştirilir. Günlük 30 öğrenme seansını

içeren bir öğrenme dönemi uygulanır. Her bir öğrenme seansında sesli uyaran (70dB) verildikten sonra ayak şoku uygulanır. Her seansı bir bekleme dönemi takip eder. Hayvanın ve ses uyaranları sonrasında elektrik şokunun uygulanacağını sezerek, ilgili şartlı uyaranları (CS) algıladıktan sonra ardından gelecek olan şartsız uyaran (US) olan elektrik şokundan kaçmaya çalışması beklenir. Hayvan için gelecek tehlikenin işaretçisi olan ışık ve ses, şartlı uyaran (CS) olarak adlandırılır. CS uygulandığında denek bölme değiştiriyorsa bu "sakınma davranışı-hit" (CR) olarak değerlendirilir. Denek şartlı uyaranın (CS) ardından şartsız uyaran (US) yani elektrik şoku uygulanınca bölme değiştiriyorsa o zaman bu "kaçma davranışı-miss" olarak değerlendirilir. Aktif sakınma düzeneğinde her bir deney hayvanına ilişkin "şartlı yanıtların sayısı (CR; sakınmalar)", "şartsız yanıtların sayısı (UR; ayak şokundan kaçma)" ve "denemeler arası geçişlerin sayısı" kontrol ünitesince otomatik olarak kaydedilir (177,178).

Planlanan deneyde öğrenmenin yanında -bir bilişsel esneklik göstergesi olan- tersine öğrenme de değerlendirileceğinden çalışmanın iki fazlı ve iki şartlı uyaranlı olarak (go-no go) revize edilmiş hali uygulandı (Şekil 3.2).

İlk fazda (pozitif şartlı uyaran) CS+; 2 kHz'den 4 kHz'e artan frekansta sesli uyaran; (negative şartlı uyaran) CS-; 4 kHz'ten 2 kHz'e azalan frekansta sesli uyaran olarak seçildi.

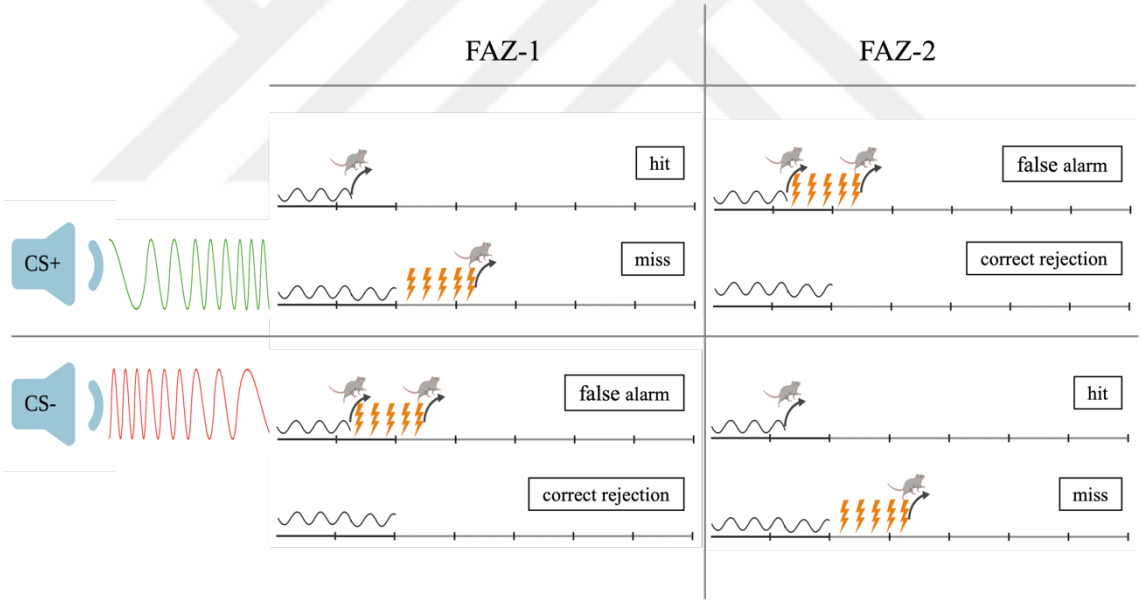
CS+ tonu 4 sn süreyle verildi ve rat diğer bölmeye geçmezse kutunun tabanından 10 sn boyunca ayak şoku (US) uygulandı. Uygulanan şokun şiddetini belirlemek için her bir hayvanın tepkileri takip edilerek kaçma yanıtı oluşturan ancak şiddetli acı vermeyen seviye tespit edildi. Her bir hayvana bu belirlenen şiddette (0,1 mA-0,4 mA) ayak şoku uygulandı.



Şekil 3.2: Aktif sakınma deney protokolü

Sesli uyaranın verildiği 4 sn içinde bölme değiştirmek bu uyaran için pozitif şartlanma yanıtı olarak (hit); aynı bölmede kalmak negatif şartlanma yanıtı olarak kaydedildi (miss). CS- tonu 4 sn süreyle verildi ve rat diğer bölmeye geçerse kutunun tabanından 10 sn boyunca ayak şoku (US) uygulandı. 4 sn CS- boyunca aynı bölmede kalmak "correct rejection" olarak, bölme değiştirmek "false alarm" olarak değerlendirildi (Şekil 3.3).

İlk faz bu şartlarda günde, rastgele sıralanan 20 CS+ ve 20 CS- uyaranıyla olmak üzere toplam 40 kez uygulandı. Her gün çalışmaya başlamadan önce ratlar 3dk süreyle herhangi bir uyaran ve şok verilmeden habituasyon için şartlanma kutusuna bırakılıp, ardından deneye başlandı. Ratlarda öğrenme gerçekleşene kadar uygulamaya devam edilmesi planlandı ve her gün, ton ayırt etme performansı yüzdelik olarak hesaplandı. İlk faz 14 gün boyunca sürdürüldü ve ardından 2. faza geçildi.



Şekil 3.3: Aktif sakınma yanıtları

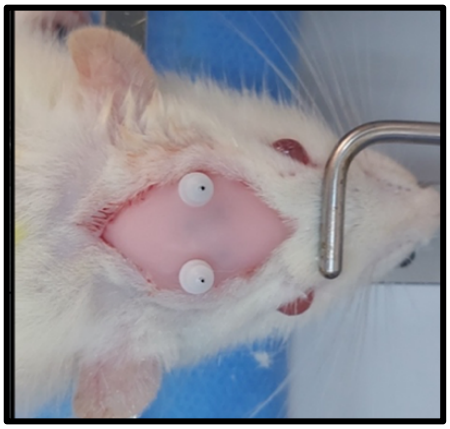
İkinci fazda, ilk faz için tanımlanan şartlar tersine çevrildi. Aynı CS+ ve CS- uyaranları için;

CS+ tonu 4 sn süreyle verildi ve rat diğer bölmeye geçerse kutunun tabanından 10 sn boyunca ayak şoku (US) verildi; 4 sn CS+ boyunca aynı bölmede kalmak "correct rejection" yanıtı olarak, bölme değiştirmek "false alarm" yanıtı olarak değerlendirildi.

CS- tonu 4 sn süreyle verildi ve rat diğer bölmeye geçmezse kutunun tabanından 10sn boyunca ayak şoku (US) uygulandı. Sesli uyaranın verildiği 4 sn içinde bölme değiştirmek bu uyaran için pozitif şartlanma yanıtı olarak hit; aynı bölmede kalmak negatif şartlanma yanıtı olarak kaydedildi (miss). 2. faz uygulaması 10 gün sürdürüldü ve sonlandırıldı.

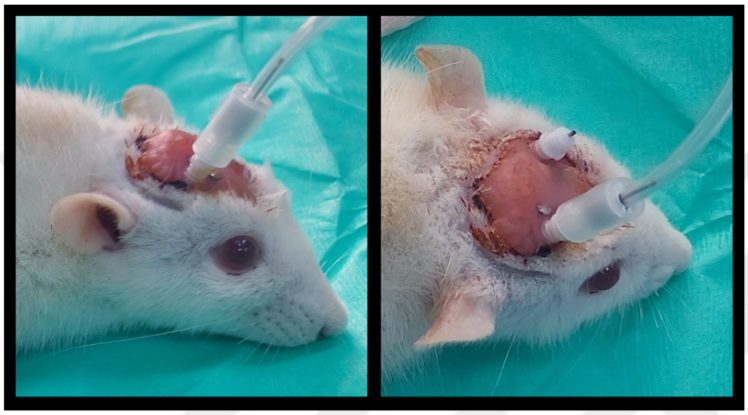
3.3.3.1.Cerrahi operasyon: Aktif sakınma testine başlamadan önce Grup 4 ve 5'teki hayvanların işitme korteksine bilateral olarak intraserebrovasküler kanül yerleştirildi. Grup 2'deki hayvanlar ise cerrahi operasyonun kontrolü olması için kraniyumun delinmesinin ardından kanül yerleştirilmeden kapatıldı.

Anestezi uygulaması (90 mg/kg ketamin ve 10 mg/kg ksilazin) sonrası ratların anestezi durumu ve vücut sıcaklıkları izlenerek kontrol altında tutuldu. Anestezi altındaki ratlar, başları traş edildikten sonra stereotaktik çerçeveye yerleştirildi ve sabitlendi. İnsizyon sonrası temporal kemiği kaplayan deri sıyrılarak, açılan bölge temizlenip referans noktalar görünür hale getirildi. Ön çalışmada tespit edilen koordinatlara (AP: -5mm; ML: 7mm) ulaşılarak açılan girişlere kraniyumdan itibaren 3mm derinliğe ulaşacak şekilde rehber kanül (C313GRL/SPC, P1 Technologies, Roanoke, VA) yerleştirildi. Kanüller vida ve dental akrilik kullanılarak sabitlendi (Resim 3.2). İşlem sonrası ratlar kafeslerine döndürüldü ve anesteziden çıkana dek takip adildi. Davranış deneylerine başlanmadan önce hayvanlara iyileşmesi için bir hafta beklendi.



Resim 3.2: Ratlara stereotaksi ile intrakortikal kanül yerleştirme işlemi

3.3.3.2. İntrakortikal hyaluronidaz enjeksiyonu: ESM miktarının bilişsel esnekliğe etkilerini ölçmek için Grup 4'e aktif sakınma deneyinin ilk fazına başlamadan önce; Grup 5'e ikinci faza başlamadan önce intrakortikal HYaz enjeksiyonu yapıldı (Resim 3.3). Yapılan ön çalışma ile enjeksiyon koordinatları AP: -5 mm; ML: ±7 mm; DV: 3 mm ve dozu 10 µl/750 Unite olarak belirlendi. Enjeksiyonun ardından, aktif sakınma deneyine başlamadan önce en az 24 saat beklendi.



Resim 3.3: HYaz enziminin intrakortikal kanüllerden temporal kortekse enjeksiyonu

3.4. DOKU ÖRNEKLERİNİN ALINMASI

In vivo deneyler tamamlandıktan bir hafta sonra ratlar anestezi (90 mg/kg ketamin ve 10 mg/kg ksilazin) altında servikal dislokasyon uygulanarak sakrifiye edildi. Hemen ardından insülin iğnesi yardımıyla kardiyak alandan kan alınarak mikrosantrifuj tüplerine transfer edildi. Kraniyum açılarak bütün olarak alınan beyin dokusu örnekleri %4 PFA içine alınarak +4°C'ye kaldırıldı. Alınan kan örnekleri 30 ila 60 dk arası koagulasyon için bekletildikten sonra 10 dk boyunca 1500 g'de santrifüj edilerek serum elde edildi. Serum örnekleri daha sonra biyokimyasal analizde kullanılmak üzere mikrosantrifuj tüplerinde -20°C'de saklandı.

3.5. BİYOKİMYASAL ANALİZ

ÇÇT'ye bağlı olarak HPA eksen hormonlarının bazal değerlerinde insan ve hayvan çalışmalarında gösterilmiş olup, bu değerler yüksek ya da düşük stres yanıtının bir göstergesi kabul edilmektedirler (128,153,167). Bu verilerden yola çıkarak ÇÇT modelinin oluşumunu biyokimyasal olarak doğrulamak adına serum örneklerinde ELISA

yöntemi kullanılarak kortikosteron ölçümü yapıldı. Ölçüm yapılmadan önce -20°C'den çıkarılan serum örnekleri oda sıcaklığına getirildi. Ölçüm için ticari ELISA kiti (CEA540Ge, Uscn Life Science Inc., Çin) kullanılarak, değerler kitte belirtilen protokole uygun olarak ölçüldü. Mikroplaka okuyucu kullanılarak 450 nm'deki absorbans değerleri kaydedildi.

3.6. İMMUNOHİSTOKİMYASAL ANALİZ

Daha önce %4 PFA içine alınan beyin dokusu örnekleri 24 saatin ardından 3 kez 0,01M PBS kullanılarak orbital çalkalayıcı üzerinde yıkandı. Ardından 0,1 M PBS içerisinde çözülmüş %15 sukroz çözeltisi ile dolu santrifüj tüplerine alınarak +4°C'ye kaldırıldı. Beyin dokuları tüpün tabanına çökene kadar (24 saat) beklendi ve çöken beyin dokusu örnekleri %30 sukroz çözeltisi ile dolu santrifüj tüplerine aktarıldı. Tekrar +4°C'ye alınarak tüpün tabanına çökene kadar bekletildi.

PFA ve sukroz çözeltileriyle fiksasyonu ve dehidrasyonu tamamlanan örnekler kurulanarak yeterli miktarda doku gömme matrisine (Bioblock) gömüldü. Kuru buz ile dondurulup doku kesitleri alınana kadar -80°C'de saklandı.

3.6.1. İmmunofloresan Boyama

Dokular -80°C'den çıkarılıp hızlıca soğuk kryostat (Cryostar NX50, Thermo Scientific) içine alındı ve doku matrisiyle kesim tablasına sabitlenerek 50 µm kalınlığında temporal korteksi içeren koronal kesitler alındı. Her bir beyin dokusundan alınan kesitler, 0,01 M PBS dolu 12 kuyucuklu plaka kuyucuğuna koyuldu. Sonraki adımların tamamı orbital çalkalayıcı üzerinde gerçekleştirildi. Doku gömme matrisini uzaklaştırmak için 3 kez 5 dk'lık PBS ile yıkama yapıldı. Ardından kesitler bloklama solusyonu (0,01 M PBS, %0,3 Triton-X, %5 goat serum) ile oda sıcaklığında inkübe edildi. Bir saat bloklama sonrasında dokular anti-agrekan (GeneTex, Hsinchu, Taiwan; 1:500), anti-PV (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, SAB4200545; 1:200), ve WFA-FITC (Invitrogen, L32481; 1:200) antikorları bloklama solüsyonu içine eklenerek 37°C'de 2 saat inkübe edildi. 3 kez 10 dk süreyle PBS ile yıkandı. Ardından goat anti-rabbit Alexa Fluor® 405 sekonder (Abcam, Ab175652; 1:500) ve goat anti-mouse sekonder Alexa Fluor® 594 (Abcam, Ab150120; 1:500) antikorlarıyla 37°C'de 2 saat inkübe edildi. Kesitler PBS içerisinde geniş bir kaba alındı ve fırça yardımıyla pozitif yüklü lamların üzerine yerleştirildi. Dokuların kuruması için 15 dk beklendikten sonra kaplama solüsyonu (Flouroshield,

Sigma Aldrich, F6182) ile kaplandı ve üzerine lamel yerleştirildi. Görüntülemeye kadar karanlıkta ve +4°C'de saklandı.

3.6.2. Mikroskobik Görüntüleme ve Analiz

Boyanan doku kesitleri Zeiss Axio Vert.A1 floresan mikroskop ile görüntülendi ve Axiocam 105 kamera kullanılarak beş ayrı bölge fotoğraflandı. Elde edilen görüntülerde ESM yoğunluğunun ve dağılımının değerlendirilmesi CellProfiler 4.2.5 yazılımı kullanılarak yapıldı.

3.7. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Çalışma bağımsız beş grup ile, her grup için n=8 olarak gerçekleştirildi. Analizler için IBM SPSS Statistic 22.0 programı kullanıldı. Shapiro-Will testi ile normallik dağılımı kontrol edildi ve tüm veriler için normal dağılım olmadığı tespit edildiğinden kullanılan testler buna göre seçildi.

Cerrahi operasyon öncesi yapılan davranış deneyleri, biyokimyasal veriler ve immunohistokimyasal veriler değerlendirilirken Grup 1 ve 2 verileri ÇÇT uygulanmayanlar, Grup 3, 4 ve 5 ÇÇT uygulananlar olarak birleştirilerek değerlendirildi. Bu iki grup arası değerlendirmeler, Mann-Whitney U testi kullanılarak yapıldı.

Cerrahi operasyon sonrası yapılan davranış deneyleri için veriler 5 ayrı grup olarak değerlendirildi. Normal dağılım olmadığı tespit edildiği için Kruskal-Wallis varyans analizi yapıldı. İkili karşılaştırmalarda Mann-Whitney U testi kullanıldı.

Yükseltilmiş artı labirenti ve açık alan testlerinin cerrahi öncesi ve cerrahi sonrası verilerinin karşılaştırılmasında Wilcoxon testleri kullanıldı.

Aktif sakınma testi verilerinde her hayvan için günlük öğrenme performansı yüzdelik olarak alınıp Friedman sonrası Wilcoxon testiyle değerlendirildi. Gruplar arası öğrenme performansı analiz edilirken Kruskal-Wallis varyans analizi sonrası Mann-Whitney U testi kullanıldı.

Tüm analizlerde istatistiksel anlamlılık düzeyi *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 şeklinde ifade edildi.

4. BULGULAR

4.1. ÇOCUKLUK ÇAĞI TRAVMA MODELİNİN DOĞRULANMASI

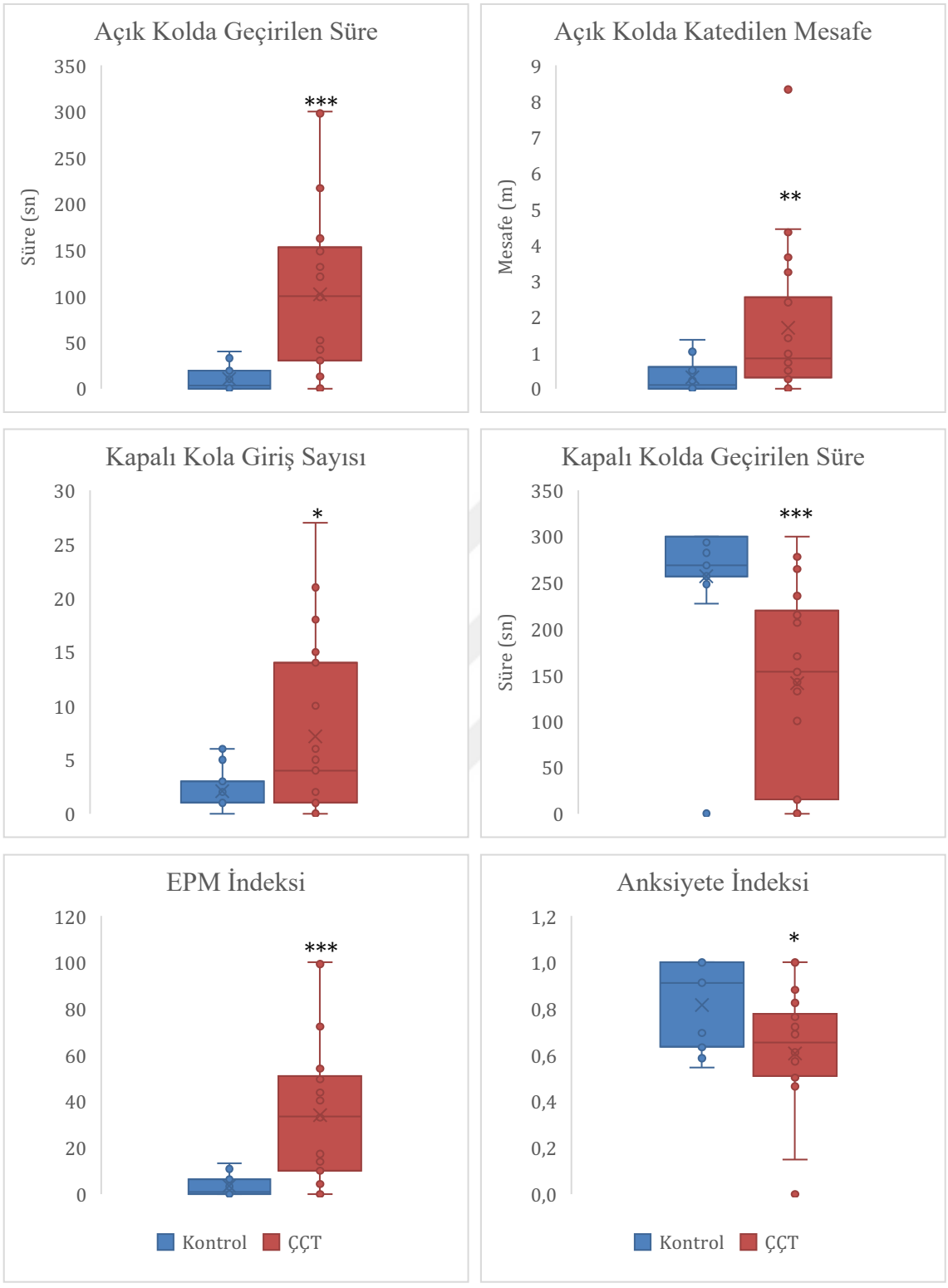
Deney grubu 3, 4 ve 5'te ÇÇT modelinin sebep olduğu potansiyel anksiyete yanıtı davranışsal ve biyokimyasal analizlerle değerlendirildi.

4.1.1. Çocukluk Çağı Travma Modelinin Davranışsal Doğrulanması

15 haftalık ÇÇT geçmişi olan ve olmayan ratlara yükseltilmiş artı labirenti ve açık alan testleri uygulanarak lokomotor becerileri ve anksiyete yanıtları değerlendirildi.

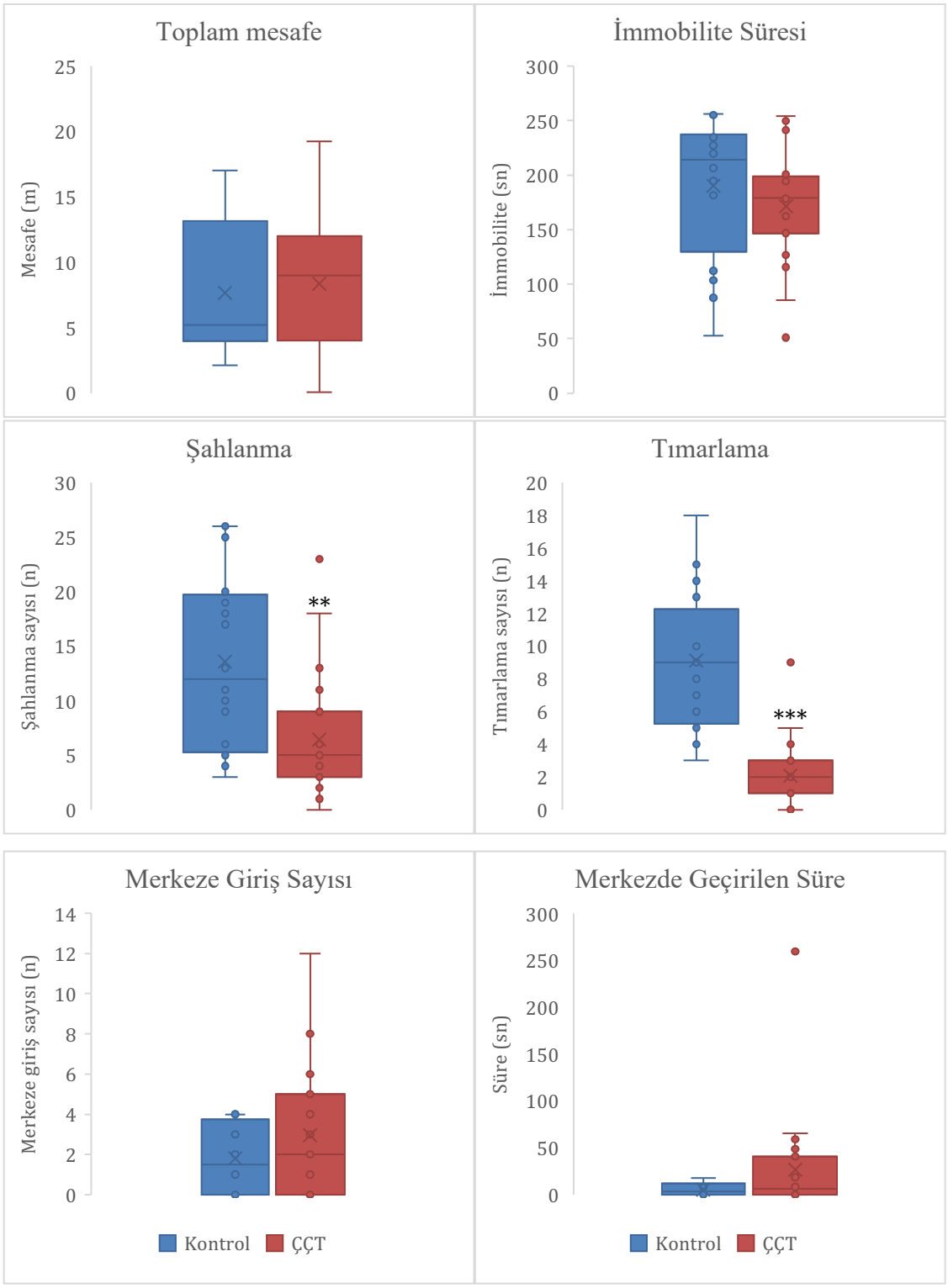
Yükseltilmiş artı labirenti testinde ÇÇT grubu hayvanlarda açık kolda geçirilen süre ($p<0,001$) ve kat edilen mesafede ($p<0,01$) kontrole kıyasla anlamlı olarak artarken, kapalı kola giriş sayısında anlamlı artış ($p<0,05$), kapalı kolda geçirilen sürede ($p<0,001$) azalma görüldü. ÇÇT grubu hayvanlarda kontrole kıyasla EPM indeksi ($p<0,001$) artarken anksiyete indeksinde ($p<0,05$) anlamlı azalma görüldü. (Şekil 4.1).

Açık alan testi verileri lokomotor aktivitede gruplar arası anlamlı bir fark olmadığını gösterdi. Aynı şekilde anksiyete yanıtı ile ilişkili değerlendirilen merkez alana girme sayısı ve merkezde geçirilen sürelerde anlamlı bir değişim görülmedi. Bunların yanında şahlanma ($p<0,01$) ve tımarlama ($p<0,001$) davranışında ÇÇT grubu hayvanlarda kontrole kıyasla azalma görüldü (Şekil 4.2).



Şekil 4.1: ÇÇT modelinin yükseltilmiş artı labirenti testine göre lokomotor aktiviteye ve anksiyeteye etkileri

(*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001)

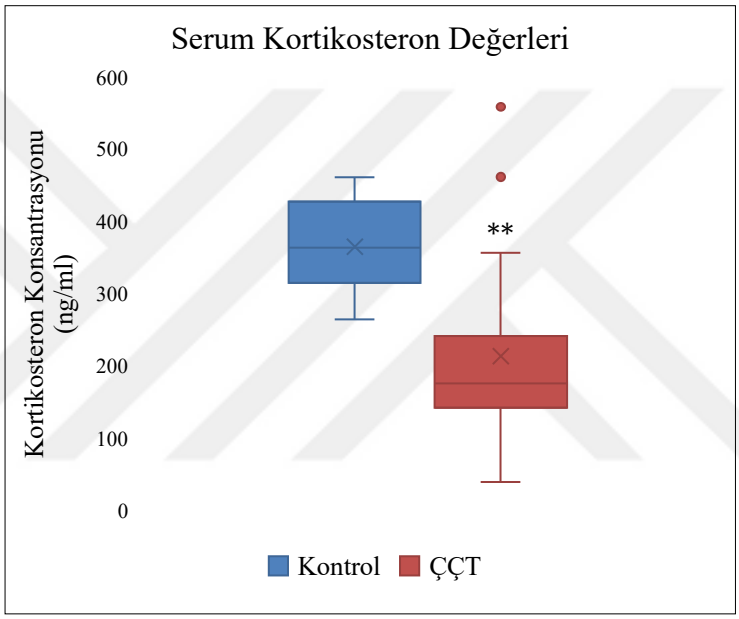


Şekil 4.2: ÇÇT modelinin açık alan testine göre lokomotor aktiviteye ve anksiyeteye etkileri

(**p<0,01; ***p<0,001)

4.1.2. Çocukluk Çağı Travma Modelinin Biyokimyasal Doğrulanması

Maternal seperasyon ve neonatal izolasyon gibi çocukluk çağı travma modellerinin HPA eksen bileşenlerinde kalıcı değişimlere sebep olduğu bilinmektedir. Çalışmada kullanılan modelin ratlarda kalıcı değişikliğe sebebiyet verdiğini doğrulamak adına ratların serum kortikosteron miktarları değerlendirildi. Yapılan biyokimyasal analiz sonucu ÇÇT modeli oluşturulan ratlarda, kontrol ratlara kıyasla kortikosteron konsantrasyonunda istatistiksel anlamlı bir değişim görüldüğü tespit edildi. (Şekil 4.3).



Şekil 4.3: ÇÇT'nin serum kortikosteron konsantrasyonuna etkisi

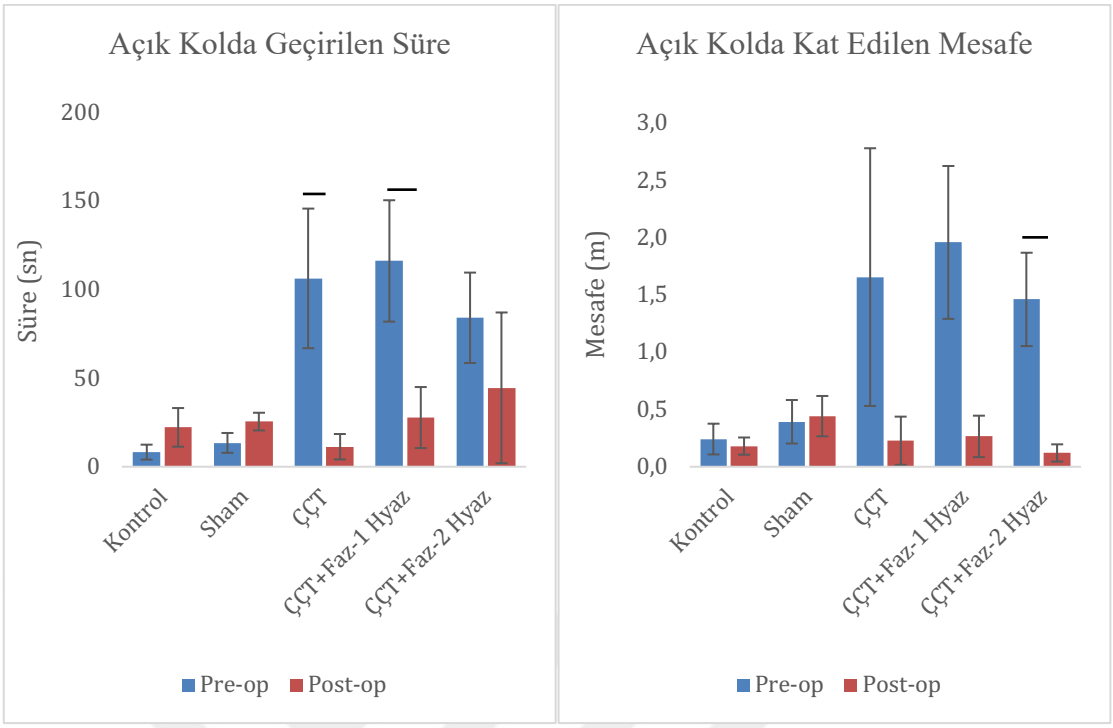
(**p<0,01)

4.2. İNTRAKORTİKAL KANÜL YERLEŞTİRME İŞLEMİNİN DAVRANIŞA ETKİLERİ

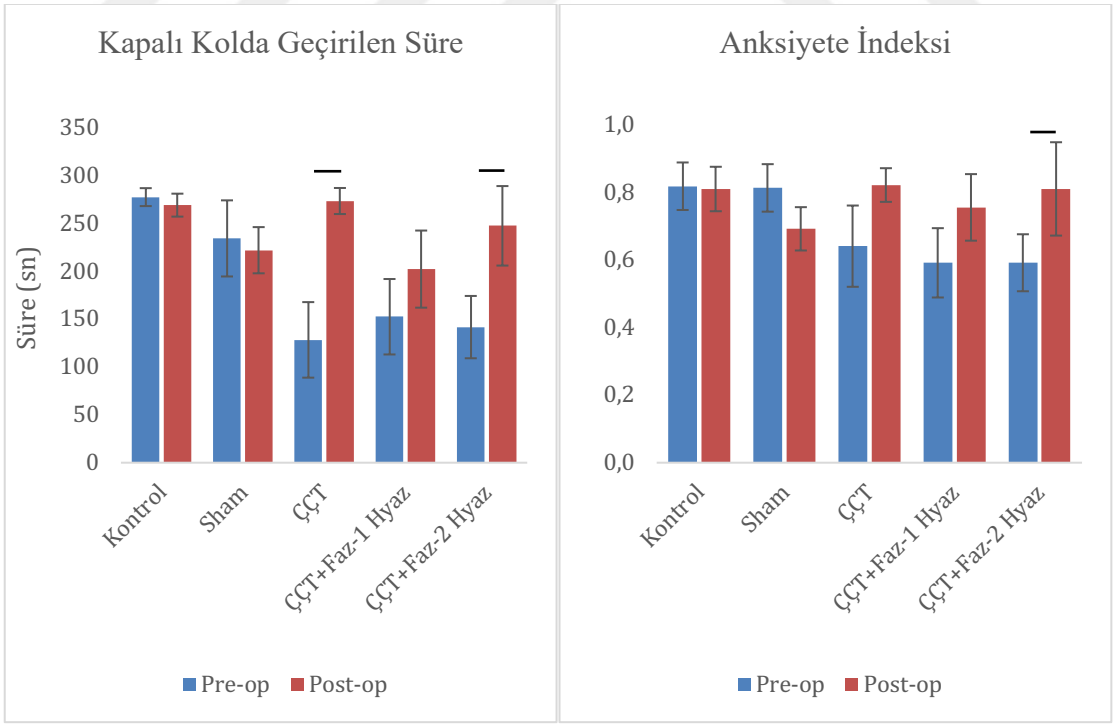
4.2.1. İntrakortikal Kanülasyonun Anksiyeteye Etkilerinin Yükseltilmiş Artı Labirenti Testiyle İncelenmesi

Grup 4 ve 5 enjeksiyon gruplarının işitme korteksine bilateral olarak yerleştirilen kanüllerin ve sham grubuna yapılan cerrahi işlemin davranışa etkilerini değerlendirmek için yükseltilmiş artı labirenti testi operasyondan bir hafta sonra tekrarlandı. Kontrol ve ÇÇT grupları da -herhangi bir cerrahi işleme maruz bırakılmadan- kontrol amaçlı bu testlere dahil edildi. Veriler gruplar arası ve grup içi olacak şekilde iki kıyas noktasından değerlendirildi.

Yükseltilmiş artı labirenti testi için operasyon sonrası grup içi karşılaştırmalarda ÇÇT grubunda ve ÇÇT+Faz1 HYaz grubunda açık kolda geçirilen süre anlamlı olarak azalırken ($p<0,05$), ÇÇT grubunda kapalı kolda geçirilen süre anlamlı olarak artmıştır ($p<0,05$). ÇÇT+Faz 2 HYaz grubunda açık kolda kat edilen mesafe operasyon sonrası anlamlı olarak azalırken ($p<0,05$), kapalı kolda geçirilen süre ($p<0,05$) ve anksiyete indeksinde ($p<0,05$) artış görüldü (Şekil 4.4, Şekil 4.5).



Şekil 4.4: Yükseltilmiş artı labirenti testi açık kolda geçirilen sürenin (solda) ve açık kolda kat edilen mesafenin (sağda) operasyon sonrası grup içi ve gruplar arası karşılaştırılması (Grup içi —$p<0,05$)

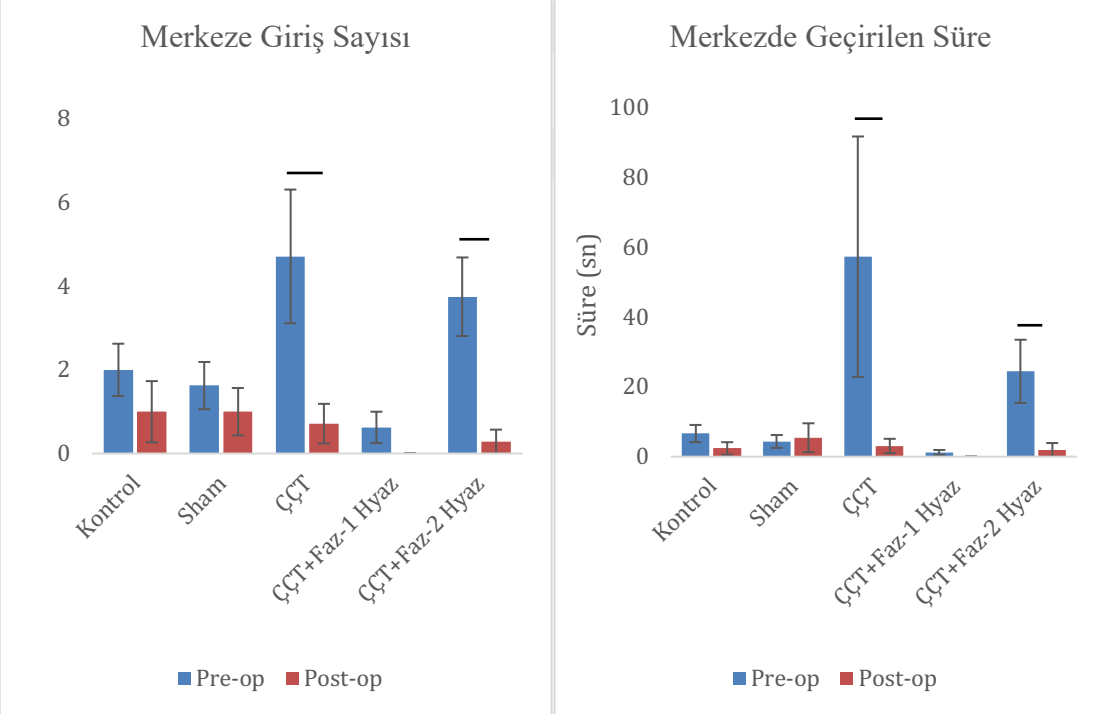


Şekil 4.5: Yükseltilmiş artı labirenti testi kapalı kolda geçirilen sürenin (solda) ve anksiyete indeksinin (sağda) operasyon sonrası grup içi ve gruplar arası karşılaştırılması (Grup içi —$p<0,05$)

4.2.2. İntrakortikal Kanülasyonun Lokomotor Aktiviteye Etkilerinin Açık Alan Testiyle İncelenmesi

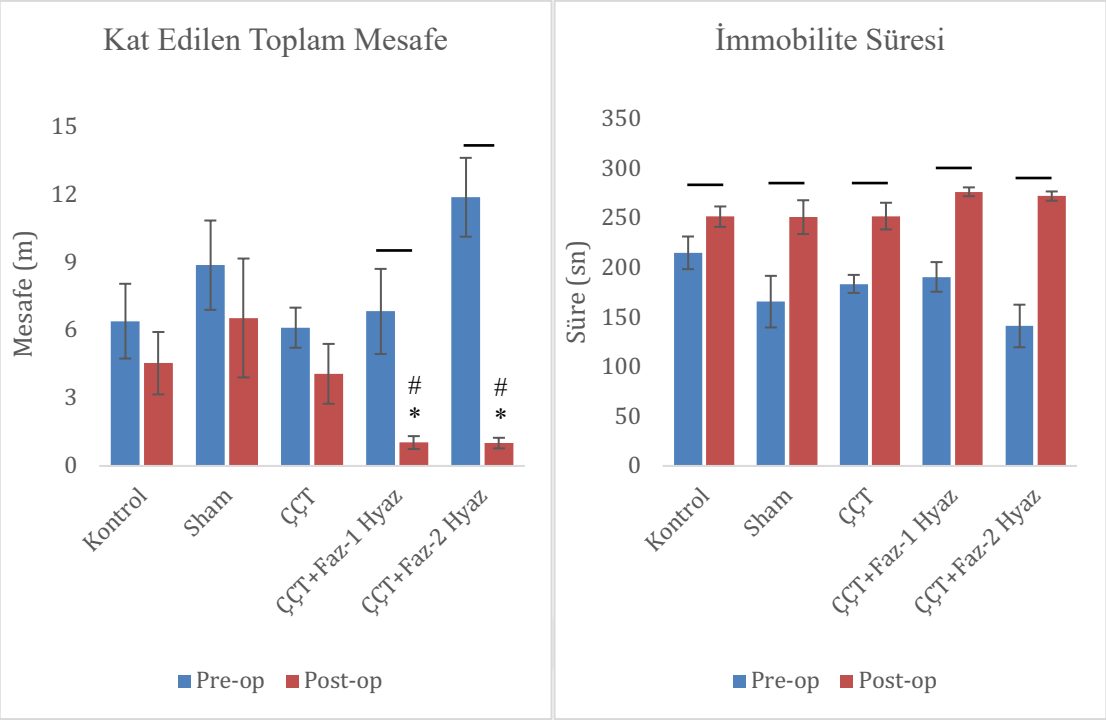
Grup 4 ve 5 enjeksiyon gruplarının işitme korteksine bilateral olarak yerleştirilen kanüllerin ve sham grubuna yapılan cerrahi işlemin davranışa etkilerini değerlendirmek için açık alan testi operasyondan bir hafta sonra tekrarlandı. Kontrol ve ÇÇT grupları da -herhangi bir cerrahi işleme maruz bırakılmadan- kontrol amaçlı bu testlere dahil edildi. Veriler gruplar arası ve grup içi olacak şekilde iki kıyas noktasından değerlendirildi.

Açık alan testi için operasyon sonrası grup içi karşılaştırmalarda ÇÇT grubunda ve ÇÇT+Faz 2 HYaz grubunda merkeze giriş sayısı (p=0,046) ve merkezde geçirilen süre anlamlı (p=0,028) olarak azalırken, kat edilen toplam mesafe için kanülasyon gruplarında anlamlı azalma görülmüştür (Şekil 4.6). İmmobilite süresi ise tüm gruplarda anlamlı oranda azalırken, anlamlılık ÇÇT gruplarında daha belirgindir (Şekil 4.7).



Şekil 4.6: Açık alan testi merkeze giriş sayısının (solda) ve merkezde geçirilen sürenin (sağda) operasyon sonrası grup içi ve gruplar arası karşılaştırılması

(Grup içi — $p<0,05$)

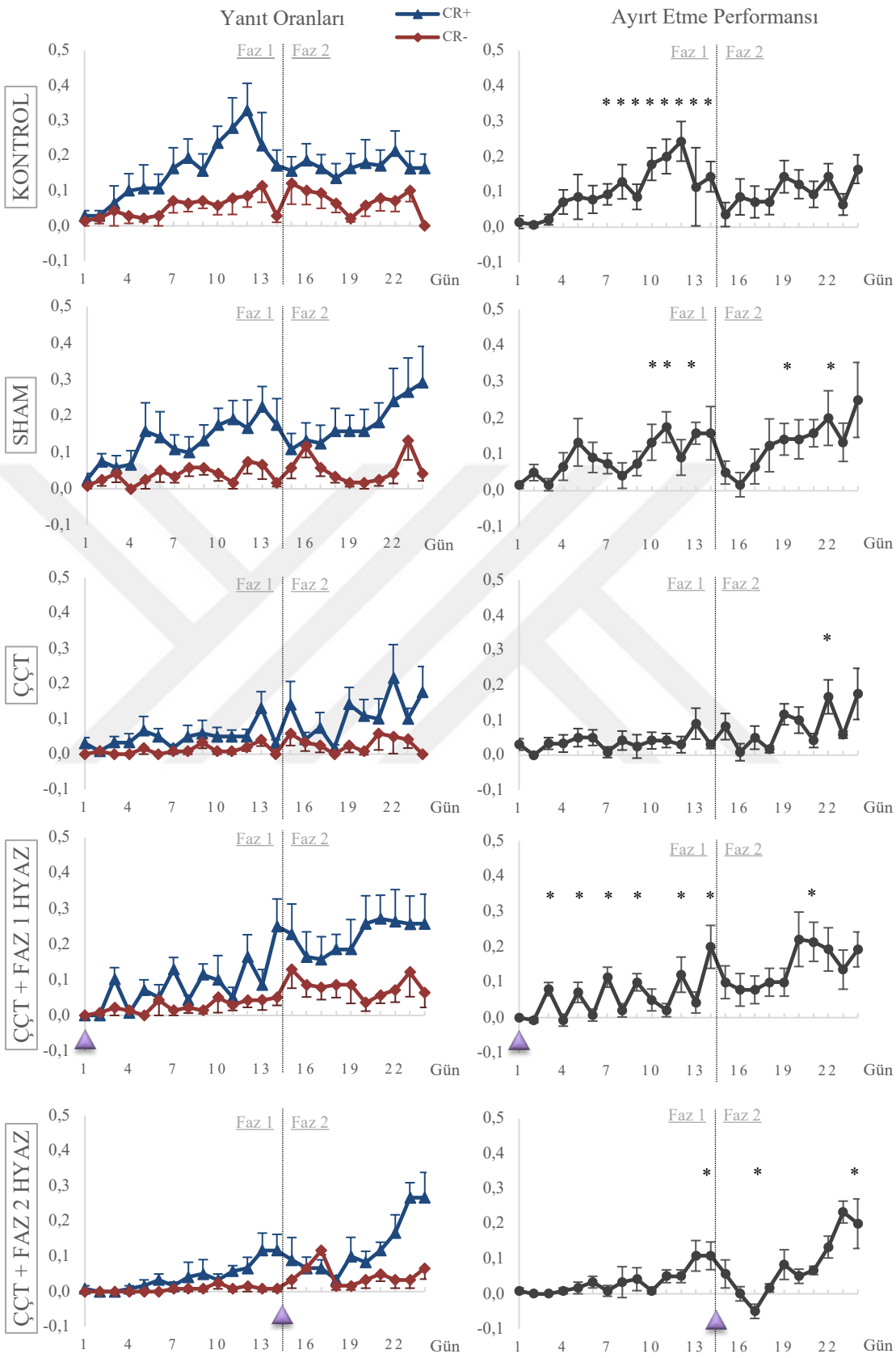


Şekil 4.7: Açık alan testi toplam kat edilen mesafenin (solda) ve immobilite süresinin (sağda) operasyon sonrası grup içi ve gruplar arası karşılaştırılması

(Kontrol grubuna göre *p<0,05; ÇÇT grubuna göre #p<0,05; Grup içi — p<0,05)

4.3. ÇOCUKLUK ÇAĞI TRAVMASINA BAĞLI BİLİŞSEL ESNEKLİK DEĞİŞİMİ

Ratların öğrenme becerilerini ve bilişsel esnekliklerini tespit etmek amacıyla gerçekleştirilen 2 fazlı aktif sakınma protokolü sonuçları iki faz için değerlendirildi. İlk fazda ÇÇT grubu ratların kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede daha düşük öğrenme ve ayırt etme performansı gösterdikleri tespit edildi (Şekil 4.8). İlk fazın öncesinde intrakortikal Hyaz enjekte edilen ÇÇT+1.Faz Hyaz grubu ratların, Hyaz enjekte edilmeyen gruplardan anlamlı derecede daha iyi öğrenme ve ayırt etme performansı gösterdiği tespit edildi. Bu grup kontrol ve sham gruplarına denk bir performansla ilk fazı tamamladı. İkinci fazın değerlendirmesi sonucu kontrol ve ÇÇT gruplarının öğrenme ve ayırt etme performanslarında anlamlı bir fark görülmedi. İkinci fazın öncesinde enjeksiyon yapılan ÇÇT+2.Faz Hyaz grubu ratlarda ise kontrol ve diğer ÇÇT gruplarına kıyasla anlamlı bir performans farkı göstermediği saptandı.



Şekil 4.8: İki fazlı aktif sakınma değeri doğru yanıt (CR+) oranı, yanlış yanıt (CR-) oranı ve ayırt etme oranı (*p<0,05; ▲ :HYaz enjeksiyonu)

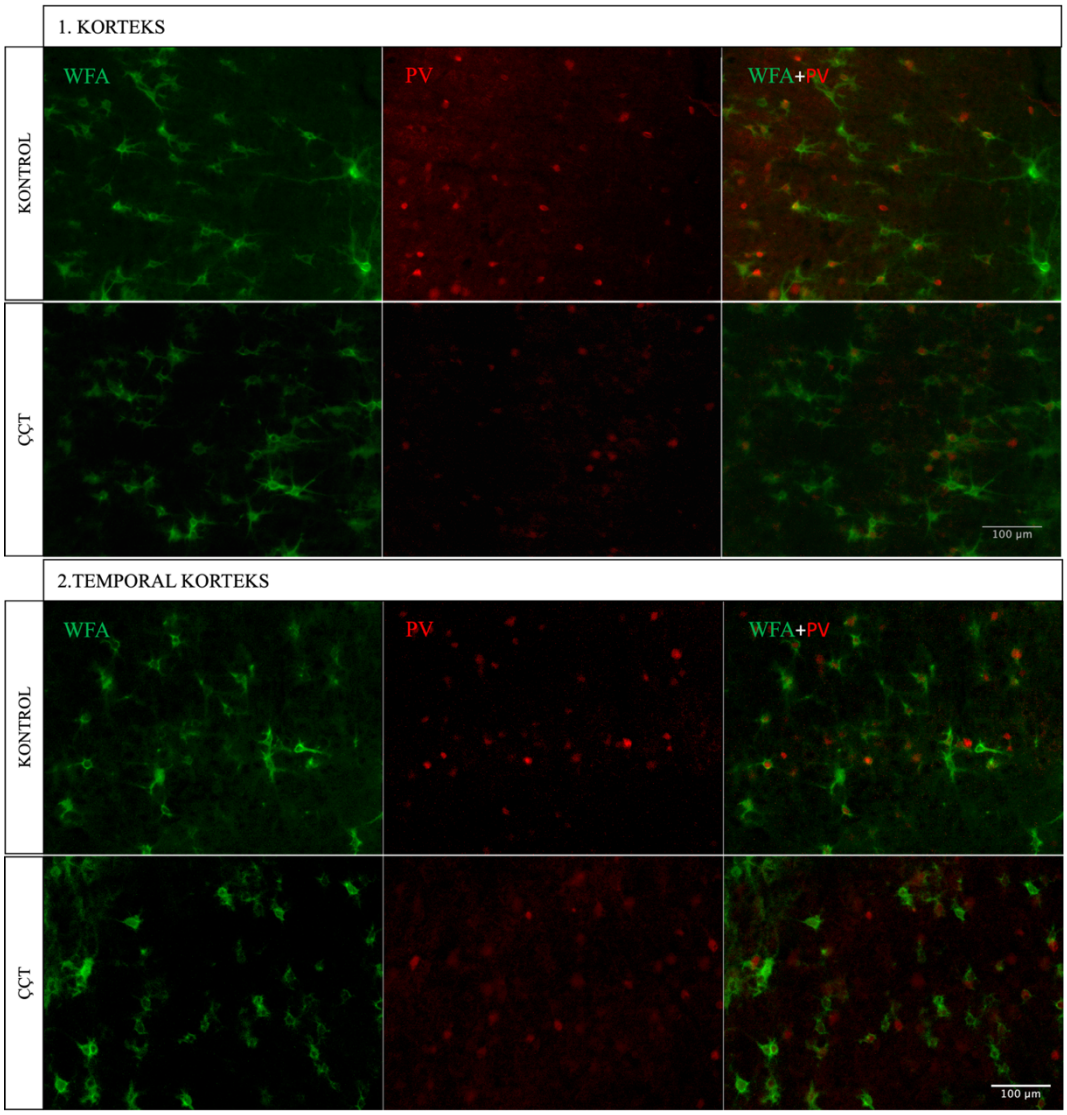
4.4. ÇOCUKLUK ÇAĞI TRAVMASINA BAĞLI BEYİN EKSTRASELÜLER MATRİS MOLEKÜLER YAPISININ DEĞİŞİMİ

Koronal beyin kesitleri anti-WFA ve anti-PV antikorlarıyla immunofloresan boyandıktan sonra beş ayrı bölgeden (Şekil 4.9) görüntüler alındı (Resim 4.1) ve WFA yoğunluğu analiz edilerek kontrol, sham, ÇÇT, ÇÇT+Faz1 HYaz ve ÇÇT+Faz2 HYaz grupları için değerler istatistiksel olarak değerlendirildi (Şekil 4.10). İstatistiksel analiz aynı zamanda kontrol ve sham grubunun birleştirildiği çocukluk çağı stresi uygulanmayanlar ve ÇÇT gruplarının birleştirildiği stres uygulananlar olarak uygulandı.

Bir numaralı alan incelendiğinde stres uygulanan gruplarda WFA yoğunluğu stres uygulanmayanlara kıyasla anlamlı olarak azalırken, beşli karşılaştırmalarda cerrahi işlem yapılmayan ÇÇT grubunun WFA yoğunluğunun kontrolden ve cerrahi-enjeksiyon uygulanan ÇÇT gruplarından anlamlı oranda fazla olduğu tespit edildi (Şekil 4.10A). Temporal kortekste ise tüm gruplarda WFA yoğunluğu kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha az görüldü (Şekil 4.10B). Hipokampüsün CA1 bölgesi değerlendirildiğinde cerrahi-enjeksiyon uygulanan ÇÇT gruplarında kontrole ve cerrahi uygulanmayan ÇÇT grubuna kıyasla WFA yoğunluğunu azalmış olup, bu durum ÇÇT gruplarının birleştirildiği hesaplamalara da yansıyarak çocukluk travması olmayan gruplardan anlamlı olarak daha az WFA görülmesiyle sonuçlandı (Şekil 4.10C). Hipokampüsün CA3 bölgesinde cerrahi-enjeksiyon gruplarından biri dışında anlamlı bir farklılık görülmezken (Şekil 4.10D).; retiküler nükleus verilerinde travma gruplarında kontrol gruplarından anlamlı olarak daha fazla WFA yoğunluğu olduğu tespit edildi (Şekil 4.10E). Bunun istisnası, cerrahi-enjeksiyon gruplarından birinin diğer tüm gruplara kıyasla daha az WFA yoğunluğu göstermesi oldu.

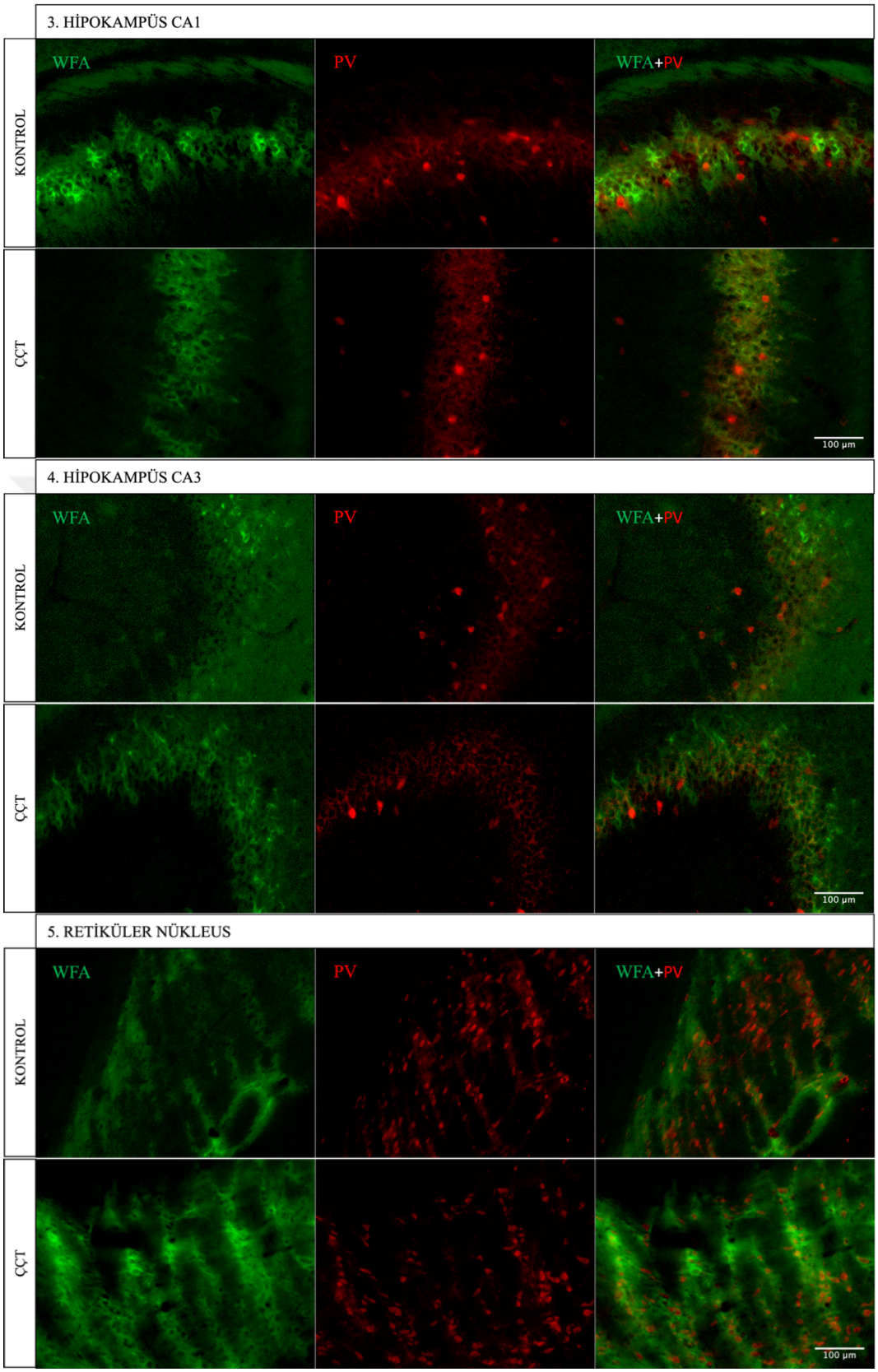


Şekil 4.9: İmmunofloresan boyama sonrası fotoğraflanan ve analiz edilen bölgeler



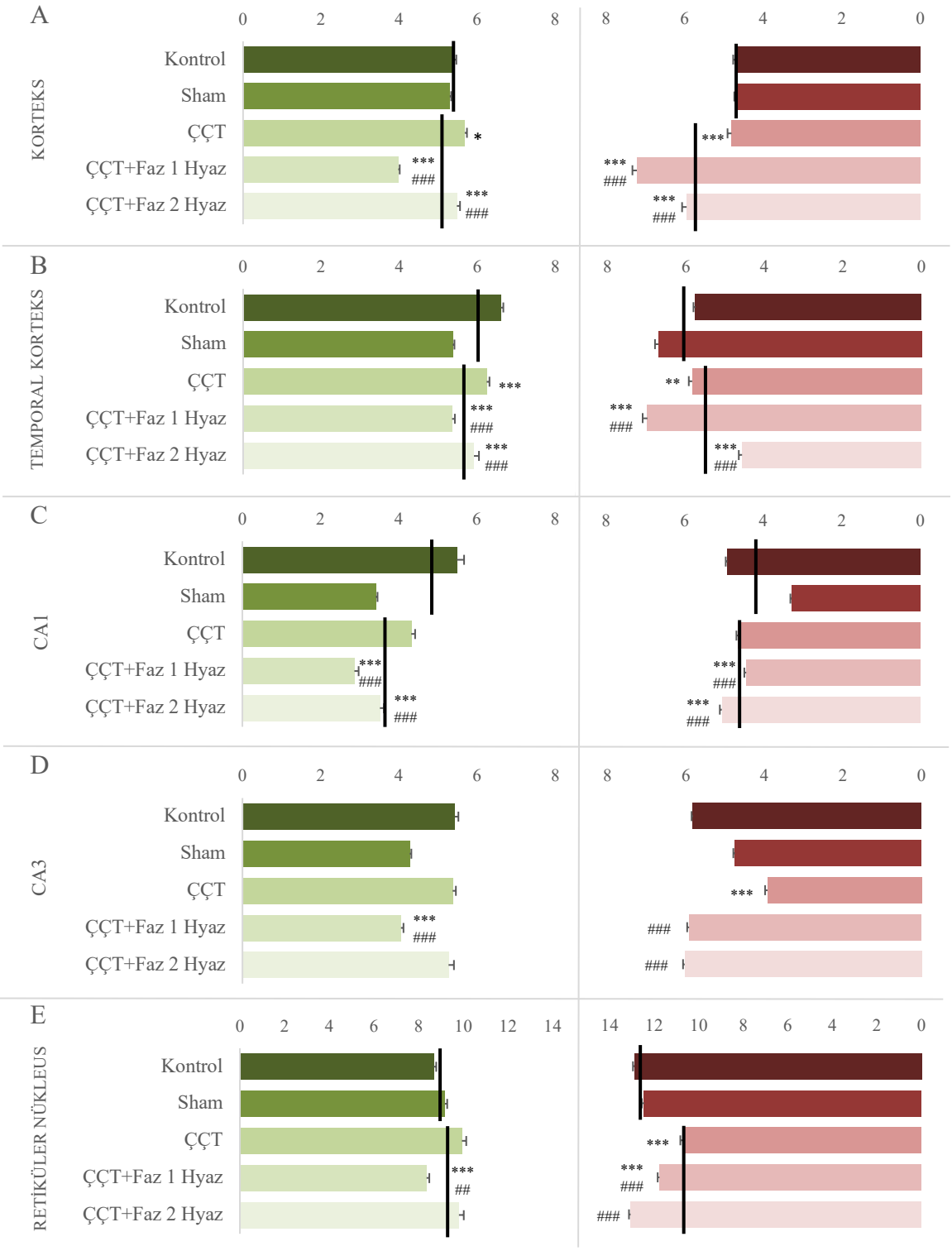
Resim 4.1: WFA ve PV floresan boyama görüntüleri

Kontrol (Kontrol ve Sham) ve ÇÇT (ÇÇT, ÇÇT+Faz 1 HYaz, ÇÇT+Faz 2 HYaz) grupları için korteks (A) ve temporal korteks (B) bölgelerinden alınmış (Objektif:10X)



Resim 4.1 (devam): WFA ve PV floresan boyama görüntüleri

Hipokampüs CA1 (C), hipokampüs CA3 (D) ve retiküler nükleus (E) bölgelerinden alınmış (Objektif:10X)



Şekil 4.10: WFA (sol) ve PV (sağ) sinyal yoğunluğunun karşılaştırılması

Korteks (A), temporal korteks (B), hipokampüs CA1 (C) hipokampüs CA3 (D) ve retiküler nükleus (E) bölgelerinde (Kontrol grubuna göre *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001; ÇÇT grubuna göre #p<0,05, ##p<0,01, ###p<0,001; grup ortalaması için —p<0,001)

5. TARTIŞMA

Kaos teorisine göre bir sürecin başlangıcındaki ufak değişimler, sürecin sonucunda çok büyük etkilere sebep olabilir. Kelebek etkisi olarak bilinen bu prensip; insan hayatında çocukluk çağı deneyimlerinin etkisi için de geçerli gibi görünmektedir. Bu yüzdendir ki nörobilimci Doug Watt çocukluk dönemini tanımlarken "hatırlanamaz ve unutulmaz" ifadelerini kullanmıştır (143). Bu dönemdeki deneyimlerin çoğunu biliş düzeyinde hatırlayamasak da biyolojik ve psikolojik varlığımızı şekillendirmede önemli rol oynarlar. Çocukluk çağında deneyimlenen olumsuzlukların beyin gelişimine etkisi üzerine yapılan çalışmalar her geçen gün artmaktadır. Bu olumsuzluklar beyin bölgelerinin boyutu, aktivitesi, birbiriyle bağlantısının yanı sıra nörotransmitter salınımı, geri alım mekanizmaları, sinaptik plastisite benzeri sistemlerin normalini de değiştirmektedir (17,19,22,138,144,145,151,152,154). Yürüttüğümüz bu tez çalışmasında; beyinde sinaptik plastisite ve bilişsel esneklik konusunda kritik rol sahibi olan ESM moleküllerinin miktarının ÇÇT geçmişi olan ratlarda, normal gelişim gösteren ratlara kıyasla anlamlı miktarda değiştiğini gösterdik. Bu değişimin yönü incelenen beyin bölgesine bağlı olarak değişiklik göstermekle birlikte, yaygın olarak ÇÇT sonucu kontrole kıyasla ESM'de azalma olduğu tespit edildi. Bu moleküler farklılaşmanın sinaptik plastisiteye, öğrenmeye ve tersine öğrenmeye etkileri incelendiğinde; ÇÇT grubu ratların kontrol grubu ratlara göre daha başarısız bir öğrenme performansı sergilediği ancak bilişsel esnekliği temsil eden tersine öğrenme performansı açısından ise herhangi bir farkın olmadığı görüldü. ESM moleküllerini degrede eden HYaz enziminin ÇÇT geçmişi olan ratlara intrakortikal enjeksiyonu, öğrenme performanslarını kontrole benzer şekilde iyileşirken, tersine öğrenme performansında herhangi bir değişime sebep olmadı.

Çocukluk çağı travmalarına yönelik klinik çalışmaların en büyük handikapı, travmayı tanımlama ve sınıflandırma noktasında bireylerin öznel raporlamasına bağlı kalma zorunluluğudur. Her ne kadar nesnel raporlamayı mümkün kılacak testler geliştirilmeye çalışılsa da, kişilerin kendi geçmişini anlamlandırma şekli ve bakış açısı testlere verilen cevapları yönlendirmektedir. Bu sorunun önüne geçmek amacıyla, travma oluşumunu standardize etme avantajı sağladığı için deney hayvanı kullanımı önplana çıkmıştır (168). Ancak deney hayvanı modelleri de insan zihninin karmaşık bilişsel ve sosyal özelliklerini kapsamakta eksik kalmaktadır. Bu sebepledir ki hayvan

ÇÇT modelleriyle yapılan çalışmalarda anksiyete belirteci olarak kullanılan davranış deneyleri ve kan belirteçleri genel-geçer standartlara uymamaktadır.

Stres yanıtının kanda en belirgin göstergesi HPA eksen elemanları ve özellikle de kortizoldur (146). Yaygın kanı; erken yaşlarda deneyimlenen kronik stresin bazal kortizol değerlerini yükselttiği gibi, tehlike ve korkuya karşı da kortizol seviyelerinin yükseleceği yönündedir. İnsan ve ÇÇT model hayvan çalışmaları da çoğunlukla bu kanıyı destekler (145,146,157). Öte yandan erken yaşlarda uzun süreli kronik strese maruz kalmış çocuklarda bazal kortizol değerlerinde düşüş olduğu da görülmüştür (179). Bu düşük kortizol seviyesinde bulunma durumu insanlarda bir tür duygusal baş etme mekanizması olarak değerlendirilmektedir (180). Ancak bunun hayvan modellerinde karşılığı olup-olmadığı bilinmemektedir.

Bu çalışmada, oluşturduğumuz ÇÇT hayvan modelinin kan plazması kortikosteron değerleri incelendiğinde, kontrole göre anlamlı bir azalma tespit edilmiştir. Bu sonuç yaygın kanının ve beklentimizin zıttı olmakla beraber, farklı stres uygulamalarında benzer sonuçlar elde eden araştırmacılar mevcuttur (181,182). Benzer şekilde yaptığımız yükseltilmiş artı labirenti ve açık alan testlerinde de ÇÇT grubu hayvanlarda anksiyete belirteçlerinde anlamlı bir artış görülmemiştir.

Yapılan bazı hayvan çalışmalar maternal seperasyon uygulamasında, seperasyon süresinin günde 15 dk gibi kısa tutulması halinde annenin yavrulara gösterdiği ilginin arttığı ve bu sebeple yavrularda uzun vadede anksiyetede artış olmadığı görülmüştür (155,183). Ancak bu çalışmada kullanılan ve günlük 3 saat seperasyon uygulanan protokol bu model grubuna girmemektedir, ve moleküler ve davranışsal olarak geçerli bir model olduğu bir çok yayında gösterilmiştir (130,153,184). Bunun yanında, 3 saatlik MS protokolü kullanıldığı halde anksiyete artışı görülmeyen çalışmalar da literatürde mevcuttur (185–188).

Kullandığımız davranış deneylerinde ÇÇT grubunda anlamlı bir anksiyete artışı görülmemesine dair bir diğer potansiyel açıklama Stupart ve ark. (189) yayınladıkları derlemede ayrıntılı olarak ele almışlardır. Gerçekleştirdikleri meta-analizin de desteğiyle ortaya koydukları gibi; yükseltilmiş artı labirenti gibi şartsız davranış testlerinin maternal seperasyona bağlı stresi tespit etmede yetersiz kaldığı, bunun yerine aktif sakınma gibi şartlı davranış testlerinin kullanılmasının sağlıklı olacağı sonucunu savunmuşlardır.

Söz konusu derlemede değinilen bir diğer önemli noktaysa MS modelinin davranışsal çıktılarının yetişkinlik döneminde uygulanan ikincil bir stres faktöründen sonra şiddetleneceği ve davranış testleriyle tespit edilir hale geleceğidir (190). Bahsedilen durumu çalışmamızın sonucunda da görmek mümkündür. ÇÇT grubu ratlarda post-op uygulanan davranış testlerinde kapalı kolda geçirilen süre artarken, açık kola giriş sayısı ve açık kolda geçirilen sürede pre-op testlere kıyasla anlamlı derecede azalma vardır. Üstelik bu değişim herhangi bir cerrahi müdahale yapılmadan testlerin tekrarlandığı ÇÇT grubunda da gözlenmektedir. Dolayısıyla söz konusu anksiyete yanıtı artışı cerrahi müdahaleden ziyade tekrarlanan stresli şartlardan kaynaklanmaktadır. Bu çıkarımı destekler şekilde kontrol ve sham grubu ratlarda post-op testlerde, pre-op testlere kıyasla anlamlı bir fark gözlenmemektedir. Bu veriler yetişkinlikte tekrarlanan stresli uygulamalarda ÇÇT grubu hayvanların kontrol grubundan çok daha reaktif davrandığını doğrulamaktadır. Tüm bunlar birlikte değerlendirildiğinde uygulanan ÇÇT modelinin başarılı olduğunu ve geri kalan verileri bu kanı ışığında değerlendirmenin doğru olacağını söylemek mümkündür.

Çalışmada kullandığımız iki fazlı frekans modulasyonlu aktif sakınma deneyinin ilk fazı korteks plastisitesi gerektiren bir duyusal öğrenme testidir. Dönüşümlü ve randomize uygulanan iki ayrı sesli uyaran için doğru yanıtları vermek ratların sadece sesli uyarana yanıt vermeyi öğrenmesiyle değil, iki ayrı uyaranı ayırt edebilmesiyle mümkündür. Bu da ciddi bir kortikal plastisiteyi gerekli kılar. Dolayısıyla bu deneyin verilerini değerlendirirken öğrenme performansını kortikal plastisiteyle doğrudan ilişkili olduğunu göz önünde bulundurmak gerekmektedir.

İlk faz için ratların günden güne ayırt etme performansları değerlendirildiğinde, kontrol grubu ratların 7. günden itibaren sesli uyaranları istatistiksel olarak anlamlı şekilde birbirinden ayırt etmeye başladığını görülmektedir. Benzer şekilde sham grubunda da ilk fazın ikinci haftasında anlamlı ayırt etme mevcuttur. Ancak ÇÇT grubu ratlar 14 gün boyunca anlamlı bir ayırt etme düzeyine ulaşamamıştır. Bunun yanında, ilk faz başlamadan önce intrakortikal HYaz enjeksiyonu yapılan ÇÇT + Faz 1 HYaz grubu ratlar 3.günden itibaren anlamlı düzeyde sesli uyaranları ayırt etmeye başlamıştır. Bu veriler birlikte değerlendirildiğinde ÇÇT modelinin yetişkin ratlarda öğrenmeyi güçleştirdiğini,

ÇÇT'li ratlarda HYaz enzimi ile ESM'nin degrede edilmesinin ise öğrenme becerisini geri kazandırdığını söylemek mümkündür.

ÇÇT grubunda öğrenmenin zorlaşması beklenen bir sonuçtur. ÇÇT geçmişi olan bireylerin beyinlerinde öğrenme ve bellekte önemli rol oynayan PFK, OFK ve hipokampüs bölgelerinin gelişiminin ve bu yapılar arası nöral ağların oluşumunun olumsuz etkilediği çok sayıda çalışmayla kanıtlanmış ve yaygın kabul görmüş bir düşüncedir (19,22,138,143). Aynı zamanda çalışmada kullanılan aktif sakınma protokolün korku şartlanmasına dayalı olması da önemli bir faktördür. ÇÇT deneyimi sonucu amigdala aktivitesi artmakta ve kortikal alanlar üzerindeki etkisi yoğunlaşmaktadır. Bu da korkuya dayalı şartlanma sonucu öğrenmeyi bu grupta daha güç hale getirir. Öte yandan temporal kortekse enjekte edilen HYaz enziminin öğrenme becerisinin geri kazandırması okları ESM'nin öğrenme üzerine etkisine çekmektedir.

Beyinde homeostatik plastisite sırasında ESM moleküllerinin endojen proteinler aracılığıyla proteolize uğradıkları ve bu sayede yapısal plastisiteye alan açıldığı bilinmektedir (114). Dolayısıyla HYaz ile ESM'yi degrede etmek de plastisiteyi arttıracak ve öğrenmeyi kolaylaştıracaktır. Aynı zamanda, yapılan çalışmalarda HYaz enziminin hipokampüse enjekte edilmesiyle korku şartlanmasının zayıfladığı görülmüştür (87). Ancak bu çalışmada kullanılan hayvanlar bizim çalışmamızda olduğu gibi şartlanma öncesinde ÇÇT benzeri bir travma faktörüne maruz kalmamışlardır ve amigdala aktiviteleri normalin üzerinde değildir. Bu sebeple o hayvanlarda HYaz enjeksiyonu korkuya dayalı öğrenmeyi ortadan kaldırırken, bizim çalışmamızda aşırı korkuyu normal seviyelere çekerek öğrenmeyi mümkün kılmıştır diyebiliriz.

Aktif sakınma deneyinin ikinci fazında, bilişsel esnekliğin bir ölçütü olarak uygulanan tersine öğrenme verileri değerlendirildiğinde kontrol dahil olmak üzere hiçbir grupta artarda 3 gün anlamlı ayırt etme gerçekleşmediği görülmektedir. Veriler yakından incelendiğinde ayırt etme yüzdesinin tüm gruplarda her geçen gün arttığı ancak bu artışın istatistiksel anlamlılık taşımadığı ortaya çıkmıştır. Kıyaslamada temel alınan ikinci fazın ilk gün performansında standart sapmanın oldukça geniş olması bu sonucun bir sebebi olabilir. Bunun yanında tersine öğrenme protokolünü ve

uygulamada yaşanan aksaklıkları yakından değerlendirmek, bu veriyi doğru yorumlamakta faydalı olacaktır.

Tersine öğrenme, ilk öğrenmeden de daha kompleks bir mekanizmadır. Tersine öğrenme iki aşamadan oluşur; ilk olarak hayvanlar eski öğrenme stratejilerinin yanlış olduğunu fark edip terk ederler, ikinci aşamada ise yeni şartları öğrenirler (10). Bu da doğal olarak daha uzun bir öğrenme süreci gerektirir. Bu noktada ikinci fazın teknik aksaklıklar sebebiyle 10 günde sonlanması istatistiksel anlamlılık görmemizin önündeki engellerden biri olabilir. Öte yandan çalışma ilk planlandığında, literatürdeki örnekler temel alınarak, günlük uyaran sayısı her bir sesli uyaran için 30 olarak belirlenmişti (10,177,191–193). Ancak uygulama sırasında, deney hayvanlarının sayısı ve deneyin hayvanlar için optimum olan 12 saat gece 12 saat gündüz döngüsünün gündüz saatlerinde tamamlanması gerekliliği göz önünde bulundurularak her bir uyaranın 20 tekrarlı uygulanması uygun görülmüştür. Bu düzenleme de tersine öğrenmenin gerçekleşmesi için daha uzun süre gerekmesiyle sonuçlanmış olabilir. Bu noktada ikinci fazı planlanan 14 günden uzun tutmak ne yazık ki uygulanabilir bir seçenek değildir. Çünkü deneyin önemli parçalarından olan ve 2. faz başında ÇÇT + Faz 2 HYaz grubuna enjekte edilen HYaz enziminin etkinlik süresi 14 gündür (10). Yani 14 günden uzun bir protokolle ESM degredasyonunun tersine öğrenmeye etkisini test etmemiz mümkün değildir.

ESM molekülleri, daha önce de belirtildiği gibi, beynin homeostatik dengesi içerisinde yıkımı ve yapımı sürekli devam eden moleküllerdir (3,114). Bu moleküllerin yoğunluklarının ve kombinasyonlarının işlevsel etkisi hala anlaşılma aşamasındadır ancak beyinde çok ince hesaplanmış bir dengenin bulunduğu aşikardır (42,49,53,109,115). Enzimal degredasyon ya da genetik müdahaleler ile ESM miktarı değiştirilirken de bu dengenin hangi yöne ve ne miktarda kaydığını doğru hesaplamak ve anlamak gerekir. Mesela ESM degredasyonu çok yüksek oranda olduğunda beynin epileptik bir hal almasına sebebiyet verdiği bilinmektedir (63,65,194). Öte yandan az miktarda degredasyonu sinaptik plastisiteyi arttırabilir (43,195,196) ya da korkuya dayalı hafızaya hasar verebilir (197).

Bu çalışmada uygulanan HYaz ile ESM'nin ne oranda degrede edildiğini moleküler ya da davranışsal olarak test etmeye dayalı ek bir deney uygulanmamıştır. Enjeksiyonu takip eden 2 hafta içerisinde ESM'nin eski haline döndüğü bilinmektedir

(10). Dolayısıyla bu 14 günlük süreç içerisinde ESM miktarı sabit değildir, her geçen gün gittikçe artmakta ve homeostatik dengeye doğru ilerlemektedir. ESM miktarının her gün aynı olduğu bir aktif sakınma deneyi için tamamen farklı bir deney tasarımı yapmak gerekir. Bunun için HYaz enjeksiyonu 2-3 günde bir gibi belirlenen aralıklarla tekrarlanabilir, ancak bu durum hayvanların stres düzeyini çok arttıracaktır. Özellikle de ÇÇT modeli olan ve stres etkenlerine normalin üstünde reaktif davranan hayvanlar için bu çok sağlıklı bir uygulama olmayacaktır. Alternatif olarak kontrollü salım teknolojisini kullanan bir ajan ile ESM degredasyonu yapılabilir ve etkileri incelenebilir.

HYaz enziminin hedef aldığı temel ESM yapısı, ağırlıklı olarak PV+ nöronları kaplayan PNK'lerdir. PNK'ler temelde sinaptik plastisiteyi kısıtlamaları ve kritik dönemi sonlandırmalarıyla bilinirler (198,199). PNK'lerin yoğunluğunun deneyime bağlı olarak değiştiği bilinmekle birlikte, değişimin yönü deneyimin türüne, canlının deneyimleme yaşına ve söz konusu beyin bölgesine göre değişmektedir (22). Örneğin; zenginleştirilmiş çevrede yetiştirme serebellumda PNK miktarını azaltırken (92), CA2 bölgesinde arttırır (200); yetişkinlikte zenginleştirilmiş çevre maruziyeti bazı beyin bölgelerinde PNK'leri azaltırken bazılarında arttırır (201); ÇÇT amigdalada PNK miktarını azaltırken (202) ventral hipokampüsde arttırır (22). Biz de çalışmamızda ÇÇT'ye bağlı olarak beş farklı beyin bögesinde motor korteks, temporal korteks, CA1, CA3 ve retiküler nükleus) ESM yoğunluğunun kontrole kıyasla değişimini inceledik.

Aktif sakınma deneyi dahilinde yapılan kanülasyon ve enjeksiyon müdahaleleri hesaba katılmayıp, ÇÇT uygulanan ratlar tek bir grup olarak değerlendirildiğinde korteks ve CA1 bölgelerinde ESM ekspresyonu azalırken, retiküler nükleusta artmış, CA3'te istatistiksel anlamlı değişiklik görülmemiştir. Ueno ve arkadaşları da C57BL/6J farelerle yaptıkları çalışmada CA1, dorsal ASK, prelimbik korteks ve primer motor kortekste PV+ nöronları çevreleyen PNK yapılarını anti-WFA ile görüntülemiş ve ÇÇT grubu hayvanlarda sinyal yoğunluğunun azaldığını gözlemlemişlerdir (203). ESM miktarının azalması sinaptik plastisiteyi arttırırken nöronları hasara karşı hassas hale getirir ve sinaptik bağlantıların stabilitesini tehdit eder. Amigdalada ÇÇT sonrası görülen PNK azalmasıyla birlikte dendrit uzunlunun ve dallanmasının artışı bunu doğrular niteliktedir (204). ESM verisi tek başına bu bakış açısıyla değerlendirildiğinde, aktif sakınma ilk faz verileriyle çeliştiği izlenimini bırakmaktadır. Çünkü ÇÇT grubu ratlarda -özellikle temporal kortekste- azalan ESM ile birlikte sinaptik plastisite artmalı, dolayısıyla

öğrenme performansı daha iyi olmalıdır. Ancak yıllardır yapılan sayısız çalışmanın da doğrulayacağı gibi sinaptik plastisite ve öğrenme tek faktörle açıklanabilen bir mekanizma değildir. Bu çalışmada ÇÇT grubu ratlarda ESM azalsa da tek başına sinaptik plastisiteyi, en azından öğrenme performansına yansıyacak şekilde, arttıramamıştır. Literatüre bakıldığında başka ÇÇT modelleme çalışmalarında hipokampal LTP'nin azaldığı görülmüştür (205,206). Bu çalışmaların bir kısmı LTP'nin azalma mekanizmasına herhangi bir açıklama getirmezken, diğerlerinde ESM dışı sebeplere bağlanmıştır (197). Öte yandan ESM enzimal olarak degrede edilen Long-Evans ratlarla ÇÇT modeli oluşturulan Long-Evans ratlarda nöronal aktivite ve korku davranışı yönünden aynı etkilerin görülmesi verilerimizi destekler niteliktedir (202).

Dikkat çekici bir diğer veri de ÇÇT grupları ayrı ayrı değerlendirildiğinde hem kontrole kıyasla hem kendi aralarında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar göstermeleridir. Özellikle ÇÇT+Faz1 HYaz grubu için ESM miktarı ciddi oranda azalmış görünmektedir. Ratlardan beyin dokularının alınması, HYaz enjeksiyonundan en az 6 hafta sonra gerçekleştiğinden enjekte edilen enzimin etkisini devam ettirmesi olası değildir. Ayrıca enjeksiyon sadece temporal kortekse yapılmışken incelenen beş bölgede de ESM azalması, bu sonucun HYaz enjeksiyonunun direkt sonucu olmadığını göstermektedir. Beyinde fiziksel travma sonrasında da ESM miktarının azaldığı bilinmektedir (207). Travma sonucu oluşan hasarı onarmak için gereken yüksek plastisite, dendritik dallanma ve uzama süreçleri için MMP ve ADAMTS grubu endojen proteazların ekspresyonu arttırılır ve ESM degrede edilir (107,207–209). Bu mekanizmanın tedavi amaçlı kullanılma ihtimali üzerinde de çalışmalar mevcuttur (210,211). Bu tez çalışmasında da kanülasyon ve enjeksiyon işlemleri bir tür hasar olduğundan benzer etki yaratmaları oldukça muhtemeldir. ÇÇT+Faz1 HYaz grubunda HYaz enjeksiyonu operasyona yani hasara daha yakın bir zamanda gerçekleştiğinden iki faktör birleşerek ESM degredasyonunu kalıcı hale getirmiş olabilir. Ancak yine ESM azalmasının temporal kortekse has olmaması başka faktörleri de değerlendirme ihtiyacı doğurmuştur. Peki temporal kortekste oluşan hasarın ve/veya HYaz ile temporal kortekste ESM degredasyonunun etkilerini beynin diğer bölgelerine taşıyacak bir mekanizmadan bahsedebilir miyiz? Bu sorunun cevabı, ESM kaplı PV+ internöronların sorumlu olduğu osilasyon aktivitesinde olabilir.

ESM kaplı yapılardan en ön planda olanı PV+ internöronlardır. Bu nöronlar beynin geneline yayılmış durumdadırlar ve çoğunlukla inhibitör olarak çalışırlar (212). Bu çalışmada ESM miktarının görüntülendiği bölgelerde PV+ nöronların sayısı ve PV sinyal yoğunluğu da incelenmiş ve PV+ nöronların sayısında gruplar arası anlamlı değişim görülmezken, PV yoğunluğunun tün deney gruplarında ve tüm beyin bölgelerinde ESM yoğunluğuyla ters orantılı olacak şekilde anlamlı değişim göstermesi dikkat çekmiştir.

Gama osilasyonları, çoğunlukla PV+ inhibitör internöronların, sahip oldukları dendritik gap junctionların da desteğiyle, oluşturdukları yüksek frekanslı osilasyonlardır (100,101). Bu osilasyonlar korteks (213), amigdala (214), hipokampus (215), talamus (216) ve diğer bir çok beyin bölgesinde görülmektedir ve duyusal işleme, hafıza, dikkat gibi yüksek bilişsel fonksiyonların gerçekleşmesinde kritik öneme sahiptir (217,218). Bu osilasyonların oluşumunda her ne kadar PV+ internöronlar aktif rol alsa da parvalbumin molekülü gama osilasyonlarını sınırlayıcı etkiye sahiptir (98). ESM'nin enzimal degredasyonunun da ASK'de ve PFK'de gama osilasyonlarını azalttığı tespit edilmiştir (219). ÇÇT sonrası nöral osilasyonları inceleyen çalışmalarda ise nöral popülasyonların daha senkronize hareket etmeye başladığı saptanmış olmakla birlikte özellikle kortekste gama osilasyonlarının değişimine dair veri bulunmamaktadır (220). Ancak ventral hipokampüste teta osilasyonlarının ve teta-gama eşleşmesinin arttığı gösterilmiştir ki bu gama üzerindeki kontrolün artması demektir (22). Tüm bu bilgiler ışığında IF verileri tekrar incelendiğinde ÇÇT+Faz1 HYaz grubunda temporal kortekste travma, hasar ve enzim etkisiyle ESM azalması ve PV artmasını takiben gama osilasyonunun da azalacağını öngörmek mümkündür. Bu azalış teta-gama eşleşmesi sayesinde beynin diğer bölgelerine de taşınarak o bölgelerde benzer moleküler yapılanmalara sebebiyet vermiş olabilir (213). Diğer bir değişle lokal gama osilasyonlarının kodladığı bilgi distal teta osilasyonlarıyla beynin farklı bölgelerine taşınmış ve o bölgelerde de hasar yanıtı oluşturarak ESM ve PV miktarını değiştirmiştir.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmayla; MS ve NI ile oluşturulan ÇÇT modeli yetişkin erkek ratlarda ESM miktarının anlamlı derecede azaldığını, yüksek korteks plastisitesi gerektiren öğrenmenin zorlaştığını ve intrakortikal HYaz enjeksiyonu ile öğrenme becerisinin geri kazanılabileceğini gösterdik. Bunun yanında beklentimizin aksine bilişsel esneklik ÇÇT modelinde değişmemiş ve HYaz enjeksiyonu bilişsel esneklik becerisinde anlamlı bir farka yol açmamıştır.

Davranış deneyleri ve IF verileri birlikte değerlendirildiğinde öğrenme ve sinaptik plastisite kaybını doğrudan ESM miktarı ile ilişkilendirmek mümkün görünmemektedir. Her ne kadar mevcut literatür ESM'nin plastisite sınırlayıcı etkisine yoğunlaşmış olsa da, bu yapının sağladığı stabiliteyi ve desteği dolayısıyla öğrenme sürecine katkısını göz ardı etmek mümkün değildir. Bu çalışmada da ESM enjeksiyonunun öğrenme becerisini iyileştirmesi aslında ESM için işlevsel bir optimum olduğunu açıkça göstermektedir. Yani ESM sinaptik plastisite ilişkisi doğrudan ters orantılı değildir. Özellikle de sinaptik plastisitenin karmaşık ve çok faktörlü bir süreç olması bu ilişkiyi kurmayı zorlaştırmaktadır.

Bilişsel esneklikte anlamlı bir değişim görülmese de veriler bir öğrenme trendinin oluşmaya başladığını ve yeterli zamanla gruplar arası farklılaşmanın da oluşabileceğini göstermektedir. Bu çalışmada bazı teknik aksaklıklar ve HYaz enzim aktivitesinin sebep olduğu süre sınırlaması da anlamlı değişim görmemize engel olmuş olabilir. Bilişsel esnekliği tersine öğrenme dışında bir görevle test etmek veya etkisi HYaz'dan daha uzun olan enzimlerle çalışmayı dizayn etmek faydalı olacaktır.

ÇÇT sonucu kaybedilen öğrenme becerisinin HYaz enjeksiyonuyla geri kazanılmış olması önemli ve umut vaadeden bir sonuçtur. ESM ile ilişkilendirilen patolojilerde -ki ÇÇT ve ÇÇT'yi takip eden patolojileri de bunlara dahil edebiliriz- HYaz vb. enzimlerin terapötik ajan olarak kullanılabileceğine dair bulgular gittikçe artmaktadır. Tabi bu enzimlerin tedavi amaçlı kullanımına giden yolda insanlarda psikopatolojik süreçlerin hayvanlardan çok daha karmaşık olması ciddi bir engel oluşturmaktadır.

Bir diğer dikkat çekici sonuç ise ÇÇT+Faz 1 HYaz grubunun kanülasyon ve enjeksiyondan haftalar sonra bile ESM miktarının hem kontrole hem ÇÇT grubuna kıyasla anlamlı olarak az olmasıdır. Yapılan işlemlerin sebep olduğu fiziksel hasar bu sonuca sebep olabilir ancak bu değişim, sadece hasar bölgesinde değil, incelenen tüm bölgelerde tespit edilmiştir. Bu bölgedeki moleküler değişimin nasıl yayılmış olabileceği konusu nöral osilasyonları akla getirmiştir. Çalışmanın hipotezlerine dahil olmamakla birlikte ilginç sonuçlarından biri PV ile ESM miktarının özellikle kortekste ters orantılı olmasıdır. Hem ESM, hem de PV beyinde yürütücü işlevlerden sorumlu olarak bilinen gama osilasyonlarıyla ilişkilendirilmektedir. Bu da ÇÇT'ye bağlı görülen bazı patolojilerin, ESM ve PV miktarındaki değişimden etkilenen gama osilasyonlarla ilişkili olma ihtimalini doğurmaktadır. Ayrıca lokal gama osilasyonlarının distal teta osilasyonlarıyla eşleşerek kodladığı bilgiyi taşıdığı düşünülmektedir. Nöral osilasyonların ÇÇT ile ilişkisi çalışmamızın kapsamında olmadığından bu ihtimal üzerine verimiz bulunmamakla birlikte, bu konu üzerine çalışmak ÇÇT'nin beyin gelişimi üzerinde etkisini ve bu çalışmanın verilerini daha iyi anlamak için faydalı olacaktır.

KAYNAKLAR

1. Theocharis, A.D., Skandalis, S.S., Gialeli, C., Karamanos, N.K. (2016). Extracellular Matrix Structure. *Adv Drug Deliv Rev*, 97, 4–27.
2. Abedin, M., King, N. (2010). Diverse Evolutionary Paths to Cell Adhesion. *Trends Cell Biol*, 20:12, 734–742.
3. Dityatev, A., Schachner, M., Sonderegger, P. (2010). The Dual Role of the Extracellular Matrix in Synaptic Plasticity and Homeostasis. *Nat Rev Neurosci*, 11:11, 735–746.
4. Gundelfinger, E.D., Frischknecht, R., Choquet, D., Heine, M. (2010). Converting Juvenile into Adult Plasticity: A Role for the Brain's Extracellular Matrix. *Eur J Neurosci*, 31:12, 2156–2165.
5. Carulli, D., Broersen, R., de Winter, F., Muir, E.M., Meskovic, M., de Waal, M., de Vries, S., Boele, H.J., Canto, C.B., De Zeeuw, C.I., Verhaagen, J. (2020). Cerebellar Plasticity and Associative Memories Are Controlled by Perineuronal Nets. *Proc Natl Acad Sci U A*, 117:12, 6855–6865.
6. Pizzorusso, T., Medini, P., Berardi, N., Chierzi, S., Fawcett, J.W., Maffei, L. (2002). Reactivation of Ocular Dominance Plasticity in the Adult Visual Cortex. *Science*, 298:5596, 1248–1251.
7. Celio, M.R., Spreafico, R., De Biasi, S., Vitellaro-Zuccarello, L. (1998). Perineuronal Nets: Past and Present. *Trends Neurosci*, 21:12, 510–515.
8. Wang, D., Fawcett, J. (2012). The Perineuronal Net and the Control of CNS Plasticity. *Cell Tissue Res*, 349:1, 147–160.
9. Grondahl, F., Tveit, H., Akslen-Hoel, L.K., Prydz, K. (2011). Easy HPLC-Based Separation and Quantitation of Chondroitin Sulphate and Hyaluronan Disaccharides after Chondroitinase ABC Treatment. *Carbohydr Res*, 346:1, 50–57.
10. Happel, M.F., Niekisch, H., Castiblanco Rivera, L.L., Ohl, F.W., Deliano, M., Frischknecht, R. (2014). Enhanced Cognitive Flexibility in Reversal Learning Induced by Removal of the Extracellular Matrix in Auditory Cortex. *Proc Natl Acad Sci U A*, 111:7, 2800–2805.
11. Morellini, F., Schachner, M. (2006). Enhanced Novelty-Induced Activity, Reduced Anxiety, Delayed Resynchronization to Daylight Reversal and Weaker Muscle Strength in Tenascin-C-Deficient Mice. *Eur J Neurosci*, 23:5, 1255–1268.
12. Scott, W.A. (1962). Cognitive Complexity and Cognitive Flexibility. *Sociometry*, 25:4, 405–414.
13. Highgate, Q., Schenk, S. (2020). Cognitive Flexibility in Humans and Other Laboratory Animals. *J. R. Soc. N. Z.*, 1–31.
14. Gioia, G.A., Isquith, P.K., Retzlaff, P.D., Espy, K.A. (2002). Confirmatory Factor Analysis of the Behavior Rating Inventory of Executive Function (BRIEF) in a Clinical Sample. *Child Neuropsychol*, 8:4, 249–257.
15. Mothes, L., Kristensen, C.H., Grassi-Oliveira, R., Fonseca, R.P., de Lima, A., II, Irigaray, T.Q. (2015). Childhood Maltreatment and Executive Functions in Adolescents. *Child Adolesc Ment Health*, 20:1, 56–62.
16. Nolin, P., Ethier, L. (2007). Using Neuropsychological Profiles to Classify Neglected Children with or without Physical Abuse. *Child Abuse Negl*, 31:6, 631–643.
17. Spann, M.N., Mayes, L.C., Kalmar, J.H., Guiney, J., Womer, F.Y., Pittman, B., Mazure, C.M., Sinha, R., Blumberg, H.P. (2012). Childhood Abuse and Neglect and Cognitive Flexibility in Adolescents. *Child Neuropsychol*, 18:2, 182–189.
18. Association, A.P. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders : DSM-5*; American Psychiatric, A., American Psychiatric Association, D. S. M. T. F., Series Eds.; American Psychiatric Association: Arlington, VA, 2013.
19. De Bellis, M.D., Zisk, A. (2014). The Biological Effects of Childhood Trauma. *Child Adolesc Psychiatr Clin N Am*, 23:2, 185–222, vii.
20. Suzuki, A., Poon, L., Papadopoulos, A.S., Kumari, V., Cleare, A.J. (2014). Long Term Effects of Childhood Trauma on Cortisol Stress Reactivity in Adulthood and Relationship to the Occurrence of Depression. *Psychoneuroendocrinology*, 50, 289–299.
21. Gildawie, K.R., Honeycutt, J.A., Brenhouse, H.C. (2020). Region-Specific Effects of Maternal Separation on Perineuronal Net and Parvalbumin-Expressing Interneuron Formation in Male and Female Rats. *Neuroscience*, 428, 23–37.
22. Murthy, S., Kane, G.A., Katchur, N.J., Lara Mejia, P.S., Obiofuma, G., Buschman, T.J., McEwen, B.S., Gould, E. (2019). Perineuronal Nets, Inhibitory Interneurons, and Anxiety-Related Ventral Hippocampal Neuronal Oscillations Are Altered by Early Life Adversity. *Biol Psychiatry*, 85:12, 1011–1020.

23. Spijker, S., Koskinen, M.K., Riga, D. (2020). Incubation of Depression: ECM Assembly and Parvalbumin Interneurons after Stress. *Neurosci Biobehav Rev*, 118, 65–79.
24. Faissner, A., Pyka, M., Geissler, M., Sobik, T., Frischknecht, R., Gundelfinger, E.D., Seidenbecher, C. (2010). Contributions of Astrocytes to Synapse Formation and Maturation - Potential Functions of the Perisynaptic Extracellular Matrix. *Brain Res Rev*, 63:1–2, 26–38.
25. Cragg, B. (1979). Brain Extracellular Space Fixed for Electron Microscopy. *Neurosci. Lett.*, 15:2–3, 301–306.
26. Bandtlow, C.E., Zimmermann, D.R. (2000). Proteoglycans in the Developing Brain: New Conceptual Insights for Old Proteins. *Physiol Rev*, 80:4, 1267–1290.
27. Milev, P., Maurel, P., Chiba, A., Mevissen, M., Popp, S., Yamaguchi, Y., Margolis, R.K., Margolis, R.U. (1998). Differential Regulation of Expression of Hyaluronan-Binding Proteoglycans in Developing Brain: Aggrecan, Versican, Neurocan, and Brevican. *Biochem Biophys Res Commun*, 247:2, 207–212.
28. Carulli, D., Rhodes, K.E., Fawcett, J.W. (2007). Upregulation of Aggrecan, Link Protein 1, and Hyaluronan Synthases during Formation of Perineuronal Nets in the Rat Cerebellum. *J Comp Neurol*, 501:1, 83–94.
29. Rauch, U., Karthikeyan, L., Maurel, P., Margolis, R.U., Margolis, R.K. (1992). Cloning and Primary Structure of Neurocan, a Developmentally Regulated, Aggregating Chondroitin Sulfate Proteoglycan of Brain. *J. Biol. Chem.*, 267:27, 19536–19547.
30. Meyer-Puttlitz, B., Junker, E., Margolis, R.U., Margolis, R.K. (1996). Chondroitin Sulfate Proteoglycans in the Developing Central Nervous System. II. Immunocytochemical Localization of Neurocan and Phosphacan. *J. Comp. Neurol.*, 366:1, 44–54.
31. Galtrey, C.M., Fawcett, J.W. (2007). The Role of Chondroitin Sulfate Proteoglycans in Regeneration and Plasticity in the Central Nervous System. *Brain Res Rev*, 54:1, 1–18.
32. Fawcett, J. (2009). Molecular Control of Brain Plasticity and Repair. *Prog Brain Res*, 175, 501–509.
33. Lander, C., Kind, P., Maleski, M., Hockfield, S. (1997). A Family of Activity-Dependent Neuronal Cell-Surface Chondroitin Sulfate Proteoglycans in Cat Visual Cortex. *J. Neurosci.*, 17:6, 1928–1939.
34. Hensch, T.K. (2004). CRITICAL PERIOD REGULATION. *Annu. Rev. Neurosci.*, 27:1, 549–579.
35. Kwok, J.C.F., Dick, G., Wang, D., Fawcett, J.W. (2011). Extracellular Matrix and Perineuronal Nets in CNS Repair. *Dev. Neurobiol.*, 71:11, 1073–1089.
36. Celio, M.R., Blumcke, I. (1994). Perineuronal Nets--a Specialized Form of Extracellular Matrix in the Adult Nervous System. *Brain Res Brain Res Rev*, 19:1, 128–145.
37. Brückner, G., Bringmann, A., Köppe, G., Härtig, W., Brauer, K. (1996). In Vivo and in Vitro Labelling of Perineuronal Nets in Rat Brain. *Brain Res.*, 720:1–2, 84–92.
38. Wintergerst, E.S., Weisenhorn, D.M.V., Rathjen, F.G., Riederer, B.M., Lambert, S., Celio, M.R. (1996). Temporal and Spatial Appearance of the Membrane Cytoskeleton and Perineuronal Nets in the Rat Neocortex. *Neurosci. Lett.*, 209:3, 173–176.
39. Gianfranceschi, L., Siciliano, R., Walls, J., Morales, B., Kirkwood, A., Huang, Z.J., Tonegawa, S., Maffei, L. (2003). Visual Cortex Is Rescued from the Effects of Dark Rearing by Overexpression of BDNF. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 100:21, 12486–12491.
40. Toole, B.P. (2004). Hyaluronan: From Extracellular Glue to Pericellular Cue. *Nat. Rev. Cancer*, 4:7, 528–539.
41. Průsová, A., Conte, P., Kucerík, J., Alonzo, G. (2010). Dynamics of Hyaluronan Aqueous Solutions as Assessed by Fast Field Cycling NMR Relaxometry. *Anal. Bioanal. Chem.*, 397:7, 3023–3028.
42. Fawcett, J.W., Oohashi, T., Pizzorusso, T. (2019). The Roles of Perineuronal Nets and the Perinodal Extracellular Matrix in Neuronal Function. *Nat. Rev. Neurosci.*, 20:8, 451–465.
43. Carulli, D., Pizzorusso, T., Kwok, J.C.F., Putignano, E., Poli, A., Forostyak, S., Andrews, M.R., Deepa, S.S., Glant, T.T., Fawcett, J.W. (2010). Animals Lacking Link Protein Have Attenuated Perineuronal Nets and Persistent Plasticity. *Brain*, 133:8, 2331–2347.
44. Dityatev, A., Schachner, M. (2003). Extracellular Matrix Molecules and Synaptic Plasticity. *Nat. Rev. Neurosci.*, 4:6, 456–468.
45. Brauer, K., Brückner, G., Leibnitz, L., Werner, L. (1984). Structural and Cytochemical Features of Perineuronal Glial Nets in the Rat Brain. *Acta Histochem.*, 74:1, 53–60.
46. Brückner, G., Grosche, J., Schmidt, S., Hürtig, W., Margolis, R.U., Delpech, B., Seidenbecher, C.I., Czaniera, R., Schachner, M. (2000). Postnatal Development of Perineuronal Nets in Wild-Type Mice and in a Mutant Deficient in Tenascin-R. *J. Comp. Neurol.*, 428:4, 616–629.
47. Dauth, S., Grevesse, T., Pantazopoulos, H., Campbell, P.H., Maoz, B.M., Berretta, S., Parker, K.K. (2016). Extracellular Matrix Protein Expression Is Brain Region Dependent: Brain Extracellular Matrix Distribution Analysis. *J. Comp. Neurol.*, 524:7, 1309–1336.

48. Morikawa, S., Ikegaya, Y., Narita, M., Tamura, H. (2017). Activation of Perineuronal Net-Expressing Excitatory Neurons during Associative Memory Encoding and Retrieval. *Sci. Rep.*, 7:1, 46024.
49. Ueno, H., Fujii, K., Suemitsu, S., Murakami, S., Kitamura, N., Wani, K., Aoki, S., Okamoto, M., Ishihara, T., Takao, K. (2018). Expression of Aggrecan Components in Perineuronal Nets in the Mouse Cerebral Cortex. *IBRO Rep.*, 4, 22–37.
50. John, N., Krügel, H., Frischknecht, R., Smalla, K.-H., Schultz, C., Kreutz, M.R., Gundelfinger, E.D., Seidenbecher, C.I. (2006). Brevican-Containing Perineuronal Nets of Extracellular Matrix in Dissociated Hippocampal Primary Cultures. *Mol. Cell. Neurosci.*, 31:4, 774–784.
51. Oohashi, T., Hirakawa, S., Bekku, Y., Rauch, U., Zimmermann, D.R., Su, W.-D., Ohtsuka, A., Murakami, T., Ninomiya, Y. (2002). Bral1, a Brain-Specific Link Protein, Colocalizing with the Versican V2 Isoform at the Nodes of Ranvier in Developing and Adult Mouse Central Nervous Systems. *Mol. Cell. Neurosci.*, 19:1, 43–57.
52. Rasband, M.N. (2010). The Axon Initial Segment and the Maintenance of Neuronal Polarity. *Nat. Rev. Neurosci.*, 11:8, 552–562.
53. Novak, U., Kaye, A.H. (2000). Extracellular Matrix and the Brain: Components and Function. *J. Clin. Neurosci. Off. J. Neurosurg. Soc. Australas.*, 7:4, 280–290.
54. You, Y., Gupta, V. (2018). The Extracellular Matrix and Remyelination Strategies in Multiple Sclerosis. *eneuro*, 5:1, ENEURO.0435-17.2018.
55. Roll, L., Faissner, A. (2014). Influence of the Extracellular Matrix on Endogenous and Transplanted Stem Cells after Brain Damage. *Front. Cell. Neurosci.*, 8.
56. Cabungcal, J.-H., Steullet, P., Morishita, H., Kraftsik, R., Cuenod, M., Hensch, T.K., Do, K.Q. (2013). Perineuronal Nets Protect Fast-Spiking Interneurons against Oxidative Stress. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 110:22, 9130–9135.
57. Bikbaev, A., Frischknecht, R., Heine, M. (2015). Brain Extracellular Matrix Retains Connectivity in Neuronal Networks. *Sci Rep*, 5, 14527.
58. Davies, S.J.A., Fitch, M.T., Memberg, S.P., Hall, A.K., Raisman, G., Silver, J. (1997). Regeneration of Adult Axons in White Matter Tracts of the Central Nervous System. *Nature*, 390:6661, 680–683.
59. Asher, R.A., Morgenstern, D.A., Moon, L.D.F., Fawcett, J.W. Chondroitin Sulphate Proteoglycans: Inhibitory Components of the Glial Scar. In *Progress in Brain Research*; Elsevier, 2001; Vol. 132, pp 611–619.
60. Beller, J., Snow, D. (2014). Proteoglycans: Road Signs for Neurite Outgrowth. *Neural Regen. Res.*, 9:4, 343.
61. Rhodes, K.E., Fawcett, J.W. (2004). Chondroitin Sulphate Proteoglycans: Preventing Plasticity or Protecting the CNS? *J. Anat.*, 204:1, 33–48.
62. Fontanil, T., Mohamedi, Y., Espina-Casado, J., Obaya, Á.J., Cobo, T., Cal, S. (2021). Hyalectanase Activities by the ADAMTS Metalloproteases. *Int. J. Mol. Sci.*, 22:6, 2988.
63. Balashova, A., Pershin, V., Zaborskaya, O., Tkachenko, N., Mironov, A., Guryev, E., Kurbatov, L., Gainullin, M., Mukhina, I. (2019). Enzymatic Digestion of Hyaluronan-Based Brain Extracellular Matrix in Vivo Can Induce Seizures in Neonatal Mice. *Front. Neurosci.*, 13, 1033.
64. Arisi, G.M., Foresti, M.L., Katki, K., Shapiro, L.A. (2015). Increased CCL2, CCL3, CCL5, and IL-1β Cytokine Concentration in Piriform Cortex, Hippocampus, and Neocortex after Pilocarpine-Induced Seizures. *J. Neuroinflammation*, 12:1, 129.
65. Perkins, K.L., Arranz, A.M., Yamaguchi, Y., Hrabetova, S. (2017). Brain Extracellular Space, Hyaluronan, and the Prevention of Epileptic Seizures. *Rev Neurosci*, 28:8, 869–892.
66. Bonneh-Barkay, D., Wiley, C.A. (2009). Brain Extracellular Matrix in Neurodegeneration. *Brain Pathol.*, 19:4, 573–585.
67. Pantazopoulos, H., Woo, T.-U.W., Lim, M.P., Lange, N., Berretta, S. (2010). Extracellular Matrix-Glial Abnormalities in the Amygdala and Entorhinal Cortex of Subjects Diagnosed With Schizophrenia. *Arch. Gen. Psychiatry*, 67:2, 155.
68. Morawski, M., Brückner, G., Jäger, C., Seeger, G., Arendt, T. (2010). Neurons Associated with Aggrecan-Based Perineuronal Nets Are Protected against Tau Pathology in Subcortical Regions in Alzheimer's Disease. *Neuroscience*, 169:3, 1347–1363.
69. Hughes, J.R. (1958). Post-Tetanic Potentiation. *Physiol. Rev.*, 38:1, 91–113.
70. Turrigiano, G.G., Nelson, S.B. (2004). Homeostatic Plasticity in the Developing Nervous System. *Nat. Rev. Neurosci.*, 5:2, 97–107.
71. Abraham, W.C., Goddard, G.V. (1983). Asymmetric Relationships between Homosynaptic Long-Term Potentiation and Heterosynaptic Long-Term Depression. *Nature*, 305:5936, 717–719.
72. Abbott, L.F., Nelson, S.B. (2000). Synaptic Plasticity: Taming the Beast. *Nat. Neurosci.*, 3:S11, 1178–1183.

73. Shouval, H.Z., Castellani, G.C., Blais, B.S., Yeung, L.C., Cooper, L.N. (2002). Converging Evidence for a Simplified Biophysical Model of Synaptic Plasticity. *Biol. Cybern.*, 87:5–6, 383–391.
74. Gerrow, K., Triller, A. (2010). Synaptic Stability and Plasticity in a Floating World. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 20:5, 631–639.
75. Frischknecht, R., Fejtova, A., Viesti, M., Stephan, A., Sonderegger, P. (2008). Activity-Induced Synaptic Capture and Exocytosis of the Neuronal Serine Protease Neurotrypsin. *J Neurosci*, 28:7, 1568–1579.
76. Frischknecht, R., Heine, M., Perrais, D., Seidenbecher, C.I., Choquet, D., Gundelfinger, E.D. (2009). Brain Extracellular Matrix Affects AMPA Receptor Lateral Mobility and Short-Term Synaptic Plasticity. *Nat Neurosci*, 12:7, 897–904.
77. Heine, M., Groc, L., Frischknecht, R., Beique, J.C., Lounis, B., Rumbaugh, G., Huganir, R.L., Cognet, L., Choquet, D. (2008). Surface Mobility of Postsynaptic AMPARs Tunes Synaptic Transmission. *Science*, 320:5873, 201–205.
78. Kochlamazashvili, G., Henneberger, C., Bukalo, O., Dvoretskova, E., Senkov, O., Lievens, P.M., Westenbroek, R., Engel, A.K., Catterall, W.A., Rusakov, D.A., Schachner, M., Dityatev, A. (2010). The Extracellular Matrix Molecule Hyaluronic Acid Regulates Hippocampal Synaptic Plasticity by Modulating Postsynaptic L-Type Ca(2+) Channels. *Neuron*, 67:1, 116–128.
79. Srinivasan, J., Schachner, M., Catterall, W.A. (1998). Interaction of Voltage-Gated Sodium Channels with the Extracellular Matrix Molecules Tenascin-C and Tenascin-R. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 95:26, 15753–15757.
80. Weber, P., Bartsch, U., Rasband, M.N., Czaniera, R., Lang, Y., Bluethmann, H., Margolis, R.U., Levinson, S.R., Shrager, P., Montag, D., Schachner, M. (1999). Mice Deficient for Tenascin-R Display Alterations of the Extracellular Matrix and Decreased Axonal Conduction Velocities in the CNS. *J. Neurosci.*, 19:11, 4245–4262.
81. Saghatelyan, A.K., Dityatev, A., Schmidt, S., Schuster, T., Bartsch, U., Schachner, M. (2001). Reduced Perisomatic Inhibition, Increased Excitatory Transmission, and Impaired Long-Term Potentiation in Mice Deficient for the Extracellular Matrix Glycoprotein Tenascin-R. *Mol. Cell. Neurosci.*, 17:1, 226–240.
82. Favuzzi, E., Marques-Smith, A., Deogracias, R., Winterflood, C.M., Sánchez-Aguilera, A., Mantoan, L., Maeso, P., Fernandes, C., Ewers, H., Rico, B. (2017). Activity-Dependent Gating of Parvalbumin Interneuron Function by the Perineuronal Net Protein Brevican. *Neuron*, 95:3, 639-655.e10.
83. Kind, P.C., Sengpiel, F., Beaver, C.J., Crocker-Buque, A., Kelly, G.M., Matthews, R.T., Mitchell, D.E. (2013). The Development and Activity-Dependent Expression of Aggrecan in the Cat Visual Cortex. *Cereb. Cortex*, 23:2, 349–360.
84. McRae, P.A., Rocco, M.M., Kelly, G., Brumberg, J.C., Matthews, R.T. (2007). Sensory Deprivation Alters Aggrecan and Perineuronal Net Expression in the Mouse Barrel Cortex. *J. Neurosci.*, 27:20, 5405–5413.
85. Kalb, R.G., Hockfield, S. (1994). Electrical Activity in the Neuromuscular Unit Can Influence the Molecular Development of Motor Neurons. *Dev. Biol.*, 162:2, 539–548.
86. Myers, A.K., Ray, J., Kulesza, R.J. (2012). Neonatal Conductive Hearing Loss Disrupts the Development of the Cat-315 Epitope on Perineuronal Nets in the Rat Superior Olivary Complex. *Brain Res.*, 1465, 34–47.
87. Gogolla, N., Caroni, P., Luthi, A., Herry, C. (2009). Perineuronal Nets Protect Fear Memories from Erasure. *Science*, 325:5945, 1258–1261.
88. Banerjee, S.B., Gutzeit, V.A., Baman, J., Aoued, H.S., Doshi, N.K., Liu, R.C., Ressler, K.J. (2017). Perineuronal Nets in the Adult Sensory Cortex Are Necessary for Fear Learning. *Neuron*, 95:1, 169-179.e3.
89. Slaker, M., Churchill, L., Todd, R.P., Blacktop, J.M., Zuloaga, D.G., Raber, J., Darling, R.A., Brown, T.E., Sorg, B.A. (2015). Removal of Perineuronal Nets in the Medial Prefrontal Cortex Impairs the Acquisition and Reconsolidation of a Cocaine-Induced Conditioned Place Preference Memory. *J. Neurosci.*, 35:10, 4190–4202.
90. Bowes, C., Massey, J.M., Burish, M., Cerkevich, C.M., Kaas, J.H. (2012). Chondroitinase ABC Promotes Selective Reactivation of Somatosensory Cortex in Squirrel Monkeys after a Cervical Dorsal Column Lesion. *Proc Natl Acad Sci U A*, 109:7, 2595–2600.
91. Tan, C.L., Andrews, M.R., Kwok, J.C., Heintz, T.G., Gumy, L.F., Fassler, R., Fawcett, J.W. (2012). Kindlin-1 Enhances Axon Growth on Inhibitory Chondroitin Sulfate Proteoglycans and Promotes Sensory Axon Regeneration. *J Neurosci*, 32:21, 7325–7335.
92. Foscarin, S., Ponchione, D., Pajaj, E., Leto, K., Gawlak, M., Wilczynski, G.M., Rossi, F., Carulli, D. (2011). Experience-Dependent Plasticity and Modulation of Growth Regulatory Molecules at Central Synapses. *PLoS ONE*, 6:1, e16666.

93. Sale, A., Maya Vetencourt, J.F., Medini, P., Cenni, M.C., Baroncelli, L., De Pasquale, R., Maffei, L. (2007). Environmental Enrichment in Adulthood Promotes Amblyopia Recovery through a Reduction of Intracortical Inhibition. *Nat. Neurosci.*, 10:6, 679–681.
94. Favuzzi, E., Rico, B. (2018). Molecular Diversity Underlying Cortical Excitatory and Inhibitory Synapse Development. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 53, 8–15.
95. Collin, T., Chat, M., Lucas, M.G., Moreno, H., Racay, P., Schwaller, B., Marty, A., Llano, I. (2005). Developmental Changes in Parvalbumin Regulate Presynaptic Ca^{2+} Signaling. *J. Neurosci.*, 25:1, 96–107.
96. Aponte, Y., Bischofberger, J., Jonas, P. (2008). Efficient Ca^{2+} Buffering in Fast-Spiking Basket Cells of Rat Hippocampus: Ca^{2+} Signalling in Fast-Spiking Hippocampal Interneurons. *J. Physiol.*, 586:8, 2061–2075.
97. Eggermann, E., Jonas, P. (2012). How the "slow" Ca2+ Buffer Parvalbumin Affects Transmitter Release in Nanodomain-Coupling Regimes. *Nat. Neurosci.*, 15:1, 20–22.
98. Vreugdenhil, M., Jefferys, J.G.R., Celio, M.R., Schwaller, B. (2003). Parvalbumin-Deficiency Facilitates Repetitive IPSCs and Gamma Oscillations in the Hippocampus. *J. Neurophysiol.*, 89:3, 1414–1422.
99. Freund, T.F., Ylinen, A., Miettinen, R., Pitkänen, A., Lahtinen, H., Baimbridge, K.G., Riekkinen, P.J. (1992). Pattern of Neuronal Death in the Rat Hippocampus after Status Epilepticus. Relationship to Calcium Binding Protein Content and Ischemic Vulnerability. *Brain Res. Bull.*, 28:1, 27–38.
100. Fukuda, T., Kosaka, T. (2000). Gap Junctions Linking the Dendritic Network of GABAergic Interneurons in the Hippocampus. *J. Neurosci.*, 20:4, 1519–1528.
101. Tamás, G., Buhl, E.H., Lörincz, A., Somogyi, P. (2000). Proximally Targeted GABAergic Synapses and Gap Junctions Synchronize Cortical Interneurons. *Nat. Neurosci.*, 3:4, 366–371.
102. Abhang, P.A., Gawali, B.W., Mehrotra, S.C. Technical Aspects of Brain Rhythms and Speech Parameters. In *Introduction to EEG- and Speech-Based Emotion Recognition*; Elsevier, 2016; pp 51–79.
103. Sandy, J.D. (2006). A Contentious Issue Finds Some Clarity: On the Independent and Complementary Roles of Aggrecanase Activity and MMP Activity in Human Joint Aggrecanolysis. *Osteoarthritis Cartilage*, 14:2, 95–100.
104. Howell, M.D., Gottschall, P.E. (2012). Lectican Proteoglycans, Their Cleaving Metalloproteinases, and Plasticity in the Central Nervous System Extracellular Microenvironment. *Neuroscience*, 217, 6–18.
105. Nagy, V., Bozdagi, O., Matynia, A., Balcerzyk, M., Okulski, P., Dzwonek, J., Costa, R.M., Silva, A.J., Kaczmarek, L., Huntley, G.W. (2006). Matrix Metalloproteinase-9 Is Required for Hippocampal Late-Phase Long-Term Potentiation and Memory. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.*, 26:7, 1923–1934.
106. Brzdąk, P., Włodarczyk, J., Mozrzymas, J.W., Wójtowicz, T. (2017). Matrix Metalloprotease 3 Activity Supports Hippocampal EPSP-to-Spike Plasticity Following Patterned Neuronal Activity via the Regulation of NMDAR Function and Calcium Flux. *Mol. Neurobiol.*, 54:1, 804–816.
107. Lech, A., Wiera, G., Mozrzymas, J. (2019). Matrix Metalloproteinase-3 in Brain Physiology and Neurodegeneration. *Adv. Clin. Exp. Med.*, 28:12, 1717–1722.
108. Wiera, G., Wozniak, G., Bajor, M., Kaczmarek, L., Mozrzymas, J.W. (2013). Maintenance of Long-Term Potentiation in Hippocampal Mossy Fiber-CA3 Pathway Requires Fine-Tuned MMP-9 Proteolytic Activity. *Hippocampus*, 23:6, 529–543.
109. Meighan, S.E., Meighan, P.C., Choudhury, P., Davis, C.J., Olson, M.L., Zornes, P.A., Wright, J.W., Harding, J.W. (2006). Effects of Extracellular Matrix-Degrading Proteases Matrix Metalloproteinases 3 and 9 on Spatial Learning and Synaptic Plasticity. *J. Neurochem.*, 96:5, 1227–1241.
110. Cua, R.C., Lau, L.W., Keough, M.B., Midha, R., Apte, S.S., Yong, V.W. (2013). Overcoming Neurite-Inhibitory Chondroitin Sulfate Proteoglycans in the Astrocyte Matrix. *Glia*, 61:6, 972–984.
111. Murase, S., Lantz, C.L., Quinlan, E.M. (2017). Light Reintroduction after Dark Exposure Reactivates Plasticity in Adults via Perisynaptic Activation of MMP-9. *eLife*, 6, e27345.
112. Ganguly, K., Rejmak, E., Mikosz, M., Nikolaev, E., Knapska, E., Kaczmarek, L. (2013). Matrix Metalloproteinase (MMP) 9 Transcription in Mouse Brain Induced by Fear Learning. *J. Biol. Chem.*, 288:29, 20978–20991.
113. Yuan, W., Matthews, R.T., Sandy, J.D., Gottschall, P.E. (2002). Association between Protease-Specific Proteolytic Cleavage of Brevican and Synaptic Loss in the Dentate Gyrus of Kainate-Treated Rats. *Neuroscience*, 114:4, 1091–1101.
114. Valenzuela, J.C., Heise, C., Franken, G., Singh, J., Schweitzer, B., Seidenbecher, C.I., Frischknecht, R. (2014). Hyaluronan-Based Extracellular Matrix under Conditions of Homeostatic Plasticity. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.*, 369:1654, 20130606.
115. Bozdagi, O., Nagy, V., Kwei, K.T., Huntley, G.W. (2007). In Vivo Roles for Matrix Metalloproteinase-9 in Mature Hippocampal Synaptic Physiology and Plasticity. *J. Neurophysiol.*, 98:1, 334–344.

116. Brown, T.E., Wilson, A.R., Cocking, D.L., Sorg, B.A. (2009). Inhibition of Matrix Metalloproteinase Activity Disrupts Reconsolidation but Not Consolidation of a Fear Memory. *Neurobiol. Learn. Mem.*, 91:1, 66–72.
117. Wright, J.W., Brown, T.E., Harding, J.W. (2007). Inhibition of Hippocampal Matrix Metalloproteinase-3 and -9 Disrupts Spatial Memory. *Neural Plast.*, 2007, 73813.
118. Domenici, E., Willé, D.R., Tozzi, F., Prokopenko, I., Miller, S., McKeown, A., Brittain, C., Rujescu, D., Giegling, I., Turck, C.W., Holsboer, F., Bullmore, E.T., Middleton, L., Merlo-Pich, E., Alexander, R.C., Muglia, P. (2010). Plasma Protein Biomarkers for Depression and Schizophrenia by Multi Analyte Profiling of Case-Control Collections. *PloS One*, 5:2, e9166.
119. Lundberg, A.K., Jönsson, S., Stenmark, J., Kristenson, M., Jonasson, L. (2016). Stress-Induced Release of Matrix Metalloproteinase-9 in Patients with Coronary Artery Disease: The Possible Influence of Cortisol. *Psychoneuroendocrinology*, 73, 117–124.
120. Bobińska, K., Szemraj, J., Czarny, P., Gałecki, P. (2016). Expression and Activity of Metalloproteinases in Depression. *Med. Sci. Monit. Int. Med. J. Exp. Clin. Res.*, 22, 1334–1341.
121. Yoshida, T., Ishikawa, M., Niitsu, T., Nakazato, M., Watanabe, H., Shiraishi, T., Shiina, A., Hashimoto, T., Kanahara, N., Hasegawa, T., Enohara, M., Kimura, A., Iyo, M., Hashimoto, K. (2012). Decreased Serum Levels of Mature Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF), but Not Its Precursor ProBDNF, in Patients with Major Depressive Disorder. *PloS One*, 7:8, e42676.
122. Shibasaki, C., Takebayashi, M., Itagaki, K., Abe, H., Kajitani, N., Okada-Tsuchioka, M., Yamawaki, S. (2016). Altered Serum Levels of Matrix Metalloproteinase-2, -9 in Response to Electroconvulsive Therapy for Mood Disorders. *Int. J. Neuropsychopharmacol.*, 19:9, pyw019.
123. van der Kooij, M.A., Fantin, M., Rejmak, E., Grosse, J., Zanoletti, O., Fournier, C., Ganguly, K., Kalita, K., Kaczmarek, L., Sandi, C. (2014). Role for MMP-9 in Stress-Induced Downregulation of Nectin-3 in Hippocampal CA1 and Associated Behavioural Alterations. *Nat. Commun.*, 5, 4995.
124. Aguayo, F.I., Pacheco, A.A., García-Rojo, G.J., Pizarro-Bauerle, J.A., Doberti, A.V., Tejos, M., García-Pérez, M.A., Rojas, P.S., Fiedler, J.L. (2018). Matrix Metalloproteinase 9 Displays a Particular Time Response to Acute Stress: Variation in Its Levels and Activity Distribution in Rat Hippocampus. *ACS Chem. Neurosci.*, 9:5, 945–956.
125. Fiorentino, M., Sapone, A., Senger, S., Camhi, S.S., Kadzielski, S.M., Buie, T.M., Kelly, D.L., Cascella, N., Fasano, A. (2016). Blood-Brain Barrier and Intestinal Epithelial Barrier Alterations in Autism Spectrum Disorders. *Mol. Autism*, 7, 49.
126. Bilousova, T.V., Dansie, L., Ngo, M., Aye, J., Charles, J.R., Ethell, D.W., Ethell, I.M. (2009). Minocycline Promotes Dendritic Spine Maturation and Improves Behavioural Performance in the Fragile X Mouse Model. *J. Med. Genet.*, 46:2, 94–102.
127. Lin, R., Kwok, J.C.F., Crespo, D., Fawcett, J.W. (2007). Chondroitinase ABC Has a Long-Lasting Effect on Chondroitin Sulphate Glycosaminoglycan Content in the Injured Rat Brain. *J. Neurochem.*, 0:0, 071116233414006-???
128. Agorastos, A., Pervanidou, P., Chrousos, G.P., Kolaitis, G. (2018). Early Life Stress and Trauma: Developmental Neuroendocrine Aspects of Prolonged Stress System Dysregulation. *Horm. Athens*, 17:4, 507–520.
129. Imanaka, A., Morinobu, S., Toki, S., Yamawaki, S. (2006). Importance of Early Environment in the Development of Post-Traumatic Stress Disorder-like Behaviors. *Behav Brain Res*, 173:1, 129–137.
130. Vetulani, J. (2013). Early Maternal Separation: A Rodent Model of Depression and a Prevailing Human Condition. *Pharmacol Rep*, 65:6, 1451–1461.
131. van Dyck, L.I., Morrow, E.M. (2017). Genetic Control of Postnatal Human Brain Growth. *Curr. Opin. Neurol.*, 30:1, 114–124.
132. Cisneros-Franco, J.M., Voss, P., Thomas, M.E., de Villers-Sidani, E. Critical Periods of Brain Development. In *Handbook of Clinical Neurology*; Elsevier, 2020; Vol. 173, pp 75–88.
133. Tau, G.Z., Peterson, B.S. (2010). Normal Development of Brain Circuits. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.*, 35:1, 147–168.
134. Knickmeyer, R.C., Gouttard, S., Kang, C., Evans, D., Wilber, K., Smith, J.K., Hamer, R.M., Lin, W., Gerig, G., Gilmore, J.H. (2008). A Structural MRI Study of Human Brain Development from Birth to 2 Years. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.*, 28:47, 12176–12182.
135. Huttenlocher, P.R. (1990). Morphometric Study of Human Cerebral Cortex Development. *Neuropsychologia*, 28:6, 517–527.
136. Ó Scalaidhe, S.P., Wilson, F.A.W., Goldman-Rakic, P.S. (1999). Face-Selective Neurons During Passive Viewing and Working Memory Performance of Rhesus Monkeys: Evidence for Intrinsic Specialization of Neuronal Coding. *Cereb. Cortex*, 9:5, 459–475.

137. Nelson, C.A. (2001). The Development and Neural Bases of Face Recognition. *Infant Child Dev.*, 10:1–2, 3–18.
138. Hanson, J.L., Chung, M.K., Avants, B.B., Shirtcliff, E.A., Gee, J.C., Davidson, R.J., Pollak, S.D. (2010). Early Stress Is Associated with Alterations in the Orbitofrontal Cortex: A Tensor-Based Morphometry Investigation of Brain Structure and Behavioral Risk. *J Neurosci*, 30:22, 7466–7472.
139. De Brito, S.A., Viding, E., Sebastian, C.L., Kelly, P.A., Mechelli, A., Maris, H., McCrory, E.J. (2013). Reduced Orbitofrontal and Temporal Grey Matter in a Community Sample of Maltreated Children. *J Child Psychol Psychiatry*, 54:1, 105–112.
140. Dannlowski, U., Ohrmann, P., Konrad, C., Domschke, K., Bauer, J., Kugel, H., Hohoff, C., Schoning, S., Kersting, A., Baune, B.T., Mortensen, L.S., Arolt, V., Zwitserlood, P., Deckert, J., Heindel, W., Suslow, T. (2009). Reduced Amygdala-Prefrontal Coupling in Major Depression: Association with MAOA Genotype and Illness Severity. *Int J Neuropsychopharmacol*, 12:1, 11–22.
141. Kim, M.J., Whalen, P.J. (2009). The Structural Integrity of an Amygdala-Prefrontal Pathway Predicts Trait Anxiety. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.*, 29:37, 11614–11618.
142. Schore, A.N. *Affect Regulation and the Origin of the Self: The Neurobiology of Emotional Development*; Psychology Press: New York, NY, 2016.
143. Gerhardt, S. *Why Love Matters: How Affection Shapes a Baby's Brain*; Routledge: London, 2004.
144. McEwen, B.S. (2007). Physiology and Neurobiology of Stress and Adaptation: Central Role of the Brain. *Physiol. Rev.*, 87:3, 873–904.
145. Lupien, S.J., McEwen, B.S., Gunnar, M.R., Heim, C. (2009). Effects of Stress throughout the Lifespan on the Brain, Behaviour and Cognition. *Nat. Rev. Neurosci.*, 10:6, 434–445.
146. Herman, J.P., Ostrander, M.M., Mueller, N.K., Figueiredo, H. (2005). Limbic System Mechanisms of Stress Regulation: Hypothalamo-Pituitary-Adrenocortical Axis. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, 29:8, 1201–1213.
147. Chrousos, G.P., Gold, P.W. (1992). The Concepts of Stress and Stress System Disorders. Overview of Physical and Behavioral Homeostasis. *JAMA*, 267:9, 1244–1252.
148. Pruessner, M., Cullen, A.E., Aas, M., Walker, E.F. (2017). The Neural Diathesis-Stress Model of Schizophrenia Revisited: An Update on Recent Findings Considering Illness Stage and Neurobiological and Methodological Complexities. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 73, 191–218.
149. Flinn, M., Nepomnaschy, P., Muehlenbein, M.P., Ponzi, D. (2011). Evolutionary Functions of Early Social Modulation of Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Development in Humans. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 35, 1611–1629.
150. Radley, J.J., Rocher, A.B., Miller, M., Janssen, W.G., Liston, C., Hof, P.R., McEwen, B.S., Morrison, J.H. (2006). Repeated Stress Induces Dendritic Spine Loss in the Rat Medial Prefrontal Cortex. *Cereb Cortex*, 16:3, 313–320.
151. Vyas, A., Mitra, R., Shankaranarayana Rao, B.S., Chattarji, S. (2002). Chronic Stress Induces Contrasting Patterns of Dendritic Remodeling in Hippocampal and Amygdaloid Neurons. *J Neurosci*, 22:15, 6810–6818.
152. Bremner, J.D., Vermetten, E. (2001). Stress and Development: Behavioral and Biological Consequences. *Dev. Psychopathol.*, 13:3, 473–489.
153. Ladd, C.O., Owens, M.J., Nemeroff, C.B. (1996). Persistent Changes in Corticotropin-Releasing Factor Neuronal Systems Induced by Maternal Deprivation. *Endocrinology*, 137:4, 1212–1218.
154. Liu, D., Diorio, J., Tannenbaum, B., Caldji, C., Francis, D., Freedman, A., Sharma, S., Pearson, D., Plotsky, P.M., Meaney, M.J. (1997). Maternal Care, Hippocampal Glucocorticoid Receptors, and Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Responses to Stress. *Science*, 277:5332, 1659–1662.
155. Plotsky, P.M., Meaney, M.J. (1993). Early, Postnatal Experience Alters Hypothalamic Corticotropin-Releasing Factor (CRF) MRNA, Median Eminence CRF Content and Stress-Induced Release in Adult Rats. *Mol. Brain Res.*, 18:3, 195–200.
156. Sánchez, M.M., Ladd, C.O., Plotsky, P.M. (2001). Early Adverse Experience as a Developmental Risk Factor for Later Psychopathology: Evidencefrom Rodent and Primate Models. *Dev. Psychopathol.*, 13:3, 419–449.
157. Miyake, A., Friedman, N.P., Emerson, M.J., Witzki, A.H., Howerter, A., Wager, T.D. (2000). The Unity and Diversity of Executive Functions and Their Contributions to Complex "Frontal Lobe" Tasks: A Latent Variable Analysis. *Cogn Psychol*, 41:1, 49–100.
158. Buhren, K., Mainz, V., Herpertz-Dahlmann, B., Schafer, K., Kahraman-Lanzerath, B., Lente, C., Konrad, K. (2012). Cognitive Flexibility in Juvenile Anorexia Nervosa Patients before and after Weight Recovery. *J Neural Transm Vienna*, 119:9, 1047–1057.

159. Chamberlain, S.R., Blackwell, A.D., Fineberg, N.A., Robbins, T.W., Sahakian, B.J. (2005). The Neuropsychology of Obsessive Compulsive Disorder: The Importance of Failures in Cognitive and Behavioural Inhibition as Candidate Endophenotypic Markers. *Neurosci Biobehav Rev*, 29:3, 399–419.
160. Steinglass, J.E., Walsh, B.T., Stern, Y. (2006). Set Shifting Deficit in Anorexia Nervosa. *J Int Neuropsychol Soc*, 12:3, 431–435.
161. Dajani, D.R., Uddin, L.Q. (2015). Demystifying Cognitive Flexibility: Implications for Clinical and Developmental Neuroscience. *Trends Neurosci.*, 38:9, 571–578.
162. Diamond, A. (2013). Executive Functions. *Annu. Rev. Psychol.*, 64:1, 135–168.
163. Sohn, M.-H., Ursu, S., Anderson, J.R., Stenger, V.A., Carter, C.S. (2000). The Role of Prefrontal Cortex and Posterior Parietal Cortex in Task Switching. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 97:24, 13448–13453.
164. den Ouden, H.E.M., Daw, N.D., Fernandez, G., Elshout, J.A., Rijpkema, M., Hoogman, M., Franke, B., Cools, R. (2013). Dissociable Effects of Dopamine and Serotonin on Reversal Learning. *Neuron*, 80:4, 1090–1100.
165. D'Cruz, A.M., Ragozzino, M.E., Mosconi, M.W., Shrestha, S., Cook, E.H., Sweeney, J.A. (2013). Reduced Behavioral Flexibility in Autism Spectrum Disorders. *Neuropsychology*, 27:2, 152–160.
166. Swainson, R., Rogers, R.D., Sahakian, B.J., Summers, B.A., Polkey, C.E., Robbins, T.W. (2000). Probabilistic Learning and Reversal Deficits in Patients with Parkinson's Disease or Frontal or Temporal Lobe Lesions: Possible Adverse Effects of Dopaminergic Medication. *Neuropsychologia*, 38:5, 596–612.
167. Daniels, W.M., Pietersen, C.Y., Carstens, M.E., Stein, D.J. (2004). Maternal Separation in Rats Leads to Anxiety-like Behavior and a Blunted ACTH Response and Altered Neurotransmitter Levels in Response to a Subsequent Stressor. *Metab Brain Dis*, 19:1–2, 3–14.
168. Whitaker, A.M., Gilpin, N.W., Edwards, S. (2014). Animal Models of Post-Traumatic Stress Disorder and Recent Neurobiological Insights. *Behav Pharmacol*, 25:5–6, 398–409.
169. Hogg, S. (1996). A Review of the Validity and Variability of the Elevated Plus-Maze as an Animal Model of Anxiety. *Pharmacol Biochem Behav*, 54:1, 21–30.
170. Pellow, S., Chopin, P., File, S.E., Briley, M. (1985). Validation of Open:Closed Arm Entries in an Elevated plus-Maze as a Measure of Anxiety in the Rat. *J Neurosci Methods*, 14:3, 149–167.
171. Aisa, B., Tordera, R., Lasheras, B., Del Rio, J., Ramirez, M.J. (2007). Cognitive Impairment Associated to HPA Axis Hyperactivity after Maternal Separation in Rats. *Psychoneuroendocrinology*, 32:3, 256–266.
172. Kalinichev, M., Easterling, K.W., Plotsky, P.M., Holtzman, S.G. (2002). Long-Lasting Changes in Stress-Induced Corticosterone Response and Anxiety-like Behaviors as a Consequence of Neonatal Maternal Separation in Long-Evans Rats. *Pharmacol Biochem Behav*, 73:1, 131–140.
173. Arslan, F.C., Tiryaki, A., Yildirim, M., Ozkorumak, E., Alver, A., Altun, I.K., Ince, I., Gedikli, O. (2016). The Effects of Edaravone in Ketamine-Induced Model of Mania in Rats. *Acta Neurobiol Exp Wars*, 76:3, 192–198.
174. Yilmaz, T., Gedikli, O., Yildirim, M. (2015). Evaluation of Spatial Memory and Locomotor Activity during Hypercortisolism Induced by the Administration of Dexamethasone in Adult Male Rats. *Brain Res*, 1595, 43–50.
175. Ohl, F.W., Scheich, H. (2005). Learning-Induced Plasticity in Animal and Human Auditory Cortex. *Curr Opin Neurobiol*, 15:4, 470–477.
176. Talwar, S.K., Gerstein, G.L. (2001). Reorganization in Awake Rat Auditory Cortex by Local Microstimulation and Its Effect on Frequency-Discrimination Behavior. *J Neurophysiol*, 86:4, 1555–1572.
177. Getova, D., Bowery, N.G. (1998). The Modulatory Effects of High Affinity GABA(B) Receptor Antagonists in an Active Avoidance Learning Paradigm in Rats. *Psychopharmacol. Berl*, 137:4, 369–373.
178. Shishmanova-Doseva, M., Peychev, L., Koeva, Y., Terzieva, D., Georgieva, K., Peychev, Z. (2018). Chronic Treatment with the New Anticonvulsant Drug Lacosamide Impairs Learning and Memory Processes in Rats: A Possible Role of BDNF/TrkB Ligand Receptor System. *Pharmacol Biochem Behav*, 169, 1–9.
179. Mason, J.W., Wang, S., Yehuda, R., Riney, S., Charney, D.S., Southwick, S.M. (2001). Psychogenic Lowering of Urinary Cortisol Levels Linked to Increased Emotional Numbing and a Shame-Depressive Syndrome in Combat-Related Posttraumatic Stress Disorder: *Psychosom. Med.*, 63:3, 387–401.
180. Flack, W.F., Litz, B.T., Hsieh, F.Y., Kaloupek, D.G., Keane, T.M. (2000). Predictors of Emotional Numbing, Revisited: A Replication and Extension. *J. Trauma. Stress*, 13:4, 611–618.
181. Ogawa, T., Mikuni, M., Kuroda, Y., Muneoka, K., Mori, K.J., Takahashi, K. (1994). Periodic Maternal Deprivation Alters Stress Response in Adult Offspring: Potentiates the Negative Feedback Regulation of Restraint Stress-Induced Adrenocortical Response and Reduces the Frequencies of Open Field-Induced Behaviors. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 49:4, 961–967.

182. Pryce, C.R., Bettschen, D., Feldon, J. (2001). Comparison of the Effects of Early Handling and Early Deprivation on Maternal Care in the Rat. *Dev. Psychobiol.*, 38:4, 239–251.
183. Francis, D.D., Caldji, C., Champagne, F., Plotsky, P.M., Meaney, M.J. (1999). The Role of Corticotropin-Releasing Factor--Norepinephrine Systems in Mediating the Effects of Early Experience on the Development of Behavioral and Endocrine Responses to Stress. *Biol. Psychiatry*, 46:9, 1153–1166.
184. Ladd, C.O., Huot, R.L., Thrivikraman, K.V., Nemeroff, C.B., Plotsky, P.M. (2004). Long-Term Adaptations in Glucocorticoid Receptor and Mineralocorticoid Receptor MRNA and Negative Feedback on the Hypothalamo-Pituitary-Adrenal Axis Following Neonatal Maternal Separation. *Biol Psychiatry*, 55:4, 367–375.
185. Millstein, R.A., Holmes, A. (2007). Effects of Repeated Maternal Separation on Anxiety- and Depression-Related Phenotypes in Different Mouse Strains. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 31:1, 3–17.
186. Lehmann, J., Pryce, C.R., Bettschen, D., Feldon, J. (1999). The Maternal Separation Paradigm and Adult Emotionality and Cognition in Male and Female Wistar Rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 64:4, 705–715.
187. Slotten, H.A., Kalinichev, M., Hagan, J.J., Marsden, C.A., Fone, K.C.F. (2006). Long-Lasting Changes in Behavioural and Neuroendocrine Indices in the Rat Following Neonatal Maternal Separation: Gender-Dependent Effects. *Brain Res.*, 1097:1, 123–132.
188. Savignac, H.M., Dinan, T.G., Cryan, J.F. (2011). Resistance to Early-Life Stress in Mice: Effects of Genetic Background and Stress Duration. *Front. Behav. Neurosci.*, 5.
189. Stupart, O., Robbins, T.W., Dalley, J.W. (2022). "The Wrong Tools for the Right Job": A Critical Meta-Analysis of Traditional Tests to Assess Behavioural Impacts of Maternal Separation. *Psychopharmacology (Berl.)*,.
190. van Bodegom, M., Homberg, J.R., Henckens, M.J.A.G. (2017). Modulation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis by Early Life Stress Exposure. *Front. Cell. Neurosci.*, 11.
191. Happel, M.F.K., Deliano, M., Ohl, F.W. (2015). Combined Shuttle-Box Training with Electrophysiological Cortex Recording and Stimulation as a Tool to Study Perception and Learning. *J. Vis. Exp.*, No. 104, 53002.
192. Ohl, F.W., Wetzel, W., Wagner, T., Rech, A., Scheich, H. (1999). Bilateral Ablation of Auditory Cortex in Mongolian Gerbil Affects Discrimination of Frequency Modulated Tones but Not of Pure Tones. *Learn. Mem.*, 6:4, 347–362.
193. Rybalko, N., Šuta, D., Nwabueze-Ogbo, F., Syka, J. (2006). Effect of Auditory Cortex Lesions on the Discrimination of Frequency-Modulated Tones in Rats: Discrimination of FM Tones after Cortical Lesioning. *Eur. J. Neurosci.*, 23:6, 1614–1622.
194. Vedunova, M., Sakharnova, T., Mitroshina, E., Perminova, M., Pimashkin, A., Zakharov, Y., Dityatev, A., Mukhina, I. (2013). Seizure-like Activity in Hyaluronidase-Treated Dissociated Hippocampal Cultures. *Front. Cell. Neurosci.*, 7.
195. Lensjø, K.K., Lepperød, M.E., Dick, G., Hafting, T., Fyhn, M. (2017). Removal of Perineuronal Nets Unlocks Juvenile Plasticity Through Network Mechanisms of Decreased Inhibition and Increased Gamma Activity. *J. Neurosci.*, 37:5, 1269–1283.
196. Orlando, C., Ster, J., Gerber, U., Fawcett, J.W., Raineteau, O. (2012). Perisynaptic Chondroitin Sulfate Proteoglycans Restrict Structural Plasticity in an Integrin-Dependent Manner. *J. Neurosci.*, 32:50, 18009–18017.
197. Lesuis, S.L., Lucassen, P.J., Krugers, H.J. (2019). Early Life Stress Impairs Fear Memory and Synaptic Plasticity; a Potential Role for GluN2B. *Neuropharmacology*, 149, 195–203.
198. Beurdeley, M., Spatazza, J., Lee, H.H.C., Sugiyama, S., Bernard, C., Di Nardo, A.A., Hensch, T.K., Prochiantz, A. (2012). Otx2 Binding to Perineuronal Nets Persistently Regulates Plasticity in the Mature Visual Cortex. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.*, 32:27, 9429–9437.
199. Lensjø, K.K., Lepperød, M.E., Dick, G., Hafting, T., Fyhn, M. (2017). Removal of Perineuronal Nets Unlocks Juvenile Plasticity Through Network Mechanisms of Decreased Inhibition and Increased Gamma Activity. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.*, 37:5, 1269–1283.
200. Carstens, K.E., Phillips, M.L., Pozzo-Miller, L., Weinberg, R.J., Dudek, S.M. (2016). Perineuronal Nets Suppress Plasticity of Excitatory Synapses on CA2 Pyramidal Neurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.*, 36:23, 6312–6320.
201. Slaker, M., Barnes, J., Sorg, B.A., Grimm, J.W. (2016). Impact of Environmental Enrichment on Perineuronal Nets in the Prefrontal Cortex Following Early and Late Abstinence from Sucrose Self-Administration in Rats. *PloS One*, 11:12, e0168256.
202. Santiago, A.N., Lim, K.Y., Opendak, M., Sullivan, R.M., Aoki, C. (2018). Early Life Trauma Increases Threat Response of Peri-Weaning Rats, Reduction of Axo-Somatic Synapses Formed by

Parvalbumin Cells and Perineuronal Net in the Basolateral Nucleus of Amygdala. *J. Comp. Neurol.*, 526:16, 2647–2664.
203. Ueno, H., Suemitsu, S., Murakami, S., Kitamura, N., Wani, K., Matsumoto, Y., Okamoto, M., Aoki, S., Ishihara, T. (2018). Juvenile Stress Induces Behavioral Change and Affects Perineuronal Net Formation in Juvenile Mice. *BMC Neurosci.*, 19:1, 41.
204. Koe, A.S., Ashokan, A., Mitra, R. (2016). Short Environmental Enrichment in Adulthood Reverses Anxiety and Basolateral Amygdala Hypertrophy Induced by Maternal Separation. *Transl. Psychiatry*, 6:2, e729–e729.
205. Sousa, V.C., Vital, J., Costenla, A.R., Batalha, V.L., Sebastião, A.M., Ribeiro, J.A., Lopes, L.V. (2014). Maternal Separation Impairs Long Term-Potentiation in CA1-CA3 Synapses and Hippocampal-Dependent Memory in Old Rats. *Neurobiol. Aging*, 35:7, 1680–1685.
206. Heydari, A., Esmaeilpour, K., Sheibani, V. (2019). Maternal Separation Impairs Long Term-Potentiation in CA3-CA1 Synapses in Adolescent Female Rats. *Behav. Brain Res.*, 376, 112239.
207. Lau, L.W., Cua, R., Keough, M.B., Haylock-Jacobs, S., Yong, V.W. (2013). Pathophysiology of the Brain Extracellular Matrix: A New Target for Remyelination. *Nat. Rev. Neurosci.*, 14:10, 722–729.
208. Wang, X., Bozdagi, O., Nikitczuk, J.S., Zhai, Z.W., Zhou, Q., Huntley, G.W. (2008). Extracellular Proteolysis by Matrix Metalloproteinase-9 Drives Dendritic Spine Enlargement and Long-Term Potentiation Coordinately. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 105:49, 19520–19525.
209. Wee Yong, V., Forsyth, P.A., Bell, R., Krekoski, C.A., Edwards, D.R. (1998). Matrix Metalloproteinases and Diseases of the CNS. *Trends Neurosci.*, 21:2, 75–80.
210. Bradbury, E.J., McMahon, S.B. (2006). Spinal Cord Repair Strategies: Why Do They Work? *Nat. Rev. Neurosci.*, 7:8, 644–653.
211. Gonzenbach, R.R., Schwab, M.E. (2008). Disinhibition of Neurite Growth to Repair the Injured Adult CNS: Focusing on Nogo. *Cell. Mol. Life Sci.*, 65:1, 161–176.
212. Bucher, E.A., Collins, J.M., King, A.E., Vickers, J.C., Kirkcaldie, M.T.K. (2021). Coherence and Cognition in the Cortex: The Fundamental Role of Parvalbumin, Myelin, and the Perineuronal Net. *Brain Struct. Funct.*, 226:7, 2041–2055.
213. Sirota, A., Montgomery, S., Fujisawa, S., Isomura, Y., Zugaro, M., Buzsáki, G. (2008). Entrainment of Neocortical Neurons and Gamma Oscillations by the Hippocampal Theta Rhythm. *Neuron*, 60:4, 683–697.
214. Popescu, A.T., Popa, D., Paré, D. (2009). Coherent Gamma Oscillations Couple the Amygdala and Striatum during Learning. *Nat. Neurosci.*, 12:6, 801–807.
215. Mann, E.O., Suckling, J.M., Hajos, N., Greenfield, S.A., Paulsen, O. (2005). Perisomatic Feedback Inhibition Underlies Cholinergically Induced Fast Network Oscillations in the Rat Hippocampus in Vitro. *Neuron*, 45:1, 105–117.
216. Pinault, D., Deschênes, M. (1992). Voltage-Dependent 40-Hz Oscillations in Rat Reticular Thalamic Neurons in Vivo. *Neuroscience*, 51:2, 245–258.
217. Sohal, V.S., Zhang, F., Yizhar, O., Deisseroth, K. (2009). Parvalbumin Neurons and Gamma Rhythms Enhance Cortical Circuit Performance. *Nature*, 459:7247, 698–702.
218. Engel, A.K., Singer, W. (2001). Temporal Binding and the Neural Correlates of Sensory Awareness. *Trends Cogn. Sci.*, 5:1, 16–25.
219. Carceller, H., Guirado, R., Ripolles-Campos, E., Teruel-Marti, V., Nacher, J. (2020). Perineuronal Nets Regulate the Inhibitory Perisomatic Input onto Parvalbumin Interneurons and γ Activity in the Prefrontal Cortex. *J. Neurosci.*, 40:26, 5008–5018.
220. Murthy, S., Gould, E. (2020). How Early Life Adversity Influences Defensive Circuitry. *Trends Neurosci.*, 43:4, 200–212.

EK

Etik Kurul Onayı

Evrak Tarih ve Sayısı: 23.08.2021-55319
23.08.2021-55319

T.C.
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
Hamidiye Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

Sayı : E-46418926-605.02--55319 23.08.2021
Konu : Etik Kurul Kararı (2021-02/02)

Sayın Prof. Dr. Yunus KARAKOÇ
(SBÜ Hamidiye Tıp Fakültesi Biyofizik Ana Bilim Dalı)

Yürütücüsü (Araştırmacılar: Aişe Rumeysa MAZI ve Cumaali DEMİRTAŞ) olduğunuz **"Çocukluk Çağı Travmalarının Yetişkin Beyin Ekstrasellüler Matris Yapılanmasına ve Bilişsel Esnekliğe Etkileri"** başlıklı bilimsel çalışma önerisi, SBÜ Hamidiye Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 19.03.2021 tarih ve **2021-02/02** sayılı toplantısında görüşülerek, çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde ve sunulan prosedürlere uygun olarak, 3 yıllık bir süre içerisinde gerçekleştirilmesinin etik açıdan **"uygun"** olduğuna karar verilmiştir.

Bilgilerinize rica ederim.

Prof. Dr. Ülkan KILIÇ
HADYEK Başkanı

Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

Belge Doğrulama Kodu :*BSC4JYREY4* Pin Kodu :23782 Belge Takip Adresi : https://www.turkiye.gov.tr/sbu-ebys

Adres:Mekteb-i Tıbbiye-i Şahane Kampüsü, Tıbbiye Cad. No:38 Selimiye
Telefon:0216 346 36 38 Faks:0216 346 36 40
Web:http://sbu.edu.tr
Kep Adresi:sbu@hs01.kep.tr

Bilgi için: Esra ALPTEKİN
Unvanı: Veri Giriş Personeli

Bu belge,güvenli elektronik imza ile imzanlamıştır.