

**T.C**  
**MERSİN ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**ANATOMİ ANABİLİM DALI**

**İYONİZE RADYASYONUN FARE BEYİNİ ÜZERİNE OLAN**  
**ETKİLERİNİN EPİGENETİK OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Turan KOÇ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMANLAR**

**Prof. Dr. Hakan ÖZTÜRK**

**Yrd. Doç. Dr. Nail Can ÖZTÜRK**

**MERSİN-2015**

T.C  
MERSİN ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
ANATOMİ ANABİLİM DALI

# **İYONİZE RADYASYONUN FARE BEYİNİ ÜZERİNE OLAN ETKİLERİNİN EPİGENETİK OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ**

Turan KOÇ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMANLAR

Prof. Dr. Hakan ÖZTÜRK

Yrd. Doç. Dr. Nail Can ÖZTÜRK

Bu tez Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeler Birimi tarafından BAP-SBE  
TTB (TK) 2013-1 YLnolu proje olarak desteklenmiştir.

Tez No: 272

MERSİN-2015

**Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü**

Anatomi Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tez Programı çerçevesinde yürütülmüş olan “İyonize Radyasyonun Fare Beyni Üzerine Olan Etkilerinin Epigenetik Olarak Değerlendirilmesi” adlı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi  
26/12/2014



Prof. Dr. Zeliha KURTOĞLU  
Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Anatomi Anabilim Dalı  
Jüri Başkanı

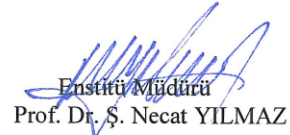


Yrd. Doç. Dr. Leyla ŞAHİN  
Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Fizyoloji Anabilim Dalı  
Jüri Üyesi



Yrd. Doç. Dr. Nail Can ÖZTÜRK  
Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Anatomi Anabilim Dalı  
Jüri Üyesi

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunun 05/01/2015 tarih ve 2015/118 sayılı kararı ile kabul edilmiştir.



Enstitü Müdürü  
Prof. Dr. Ş. Necat YILMAZ



## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince deneyimlerini ve bilgi birikimlerini paylaşarak, beni pek çok konuda aydınlatan, her konuda yardım ve desteklerini gördüğüm, bana sabırla yol gösteren, başta tez danışmanlarım Prof. Dr. Hakan ÖZTÜRK ve Yrd. Doç. Dr. Nail Can ÖZTÜRK olmak üzere, Anatomi Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Zeliha KURTOĞLU, yakın zamanda kurumumuzdan ayrılan Prof. Dr. Mustafa AKTEKİN, Doç. Dr. Alev KARA ve Yrd. Doç. Dr. Deniz UZMANSEL hocalarıma sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam sırasında, deney hayvanı modeli oluşturma konusunda bana yardımcı olan MEÜ Tıp Fakültesi Histoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Necat YILMAZ'a ve tüm Histoloji ekibine sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım. Bu süreçte, her türlü teorik ve teknik desteklerini sunan MEÜ Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarı sorumlu veteriner hekimi Vet. Hek. Tamer YENER ve tüm çalışanlarına sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Radyasyon modeli oluşturmam konusunda bana yardımcı olan Mersin Devlet Hastanesi Radyasyon Onkolojisi servisi çalışanlarından Dr. Eda Bengi YILMAZ'a, radyasyon dozu ayarlama konusunda tecrübelerinden yararlandığım Fizik Mühendisi Ahmet Kürşat ÖZKAN ve Yağız ATLI olmak üzere tüm radyoonkoloji ekibine saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım sırasında, öğrenme ve hafıza testlerini uygulama konusunda teknik ve teorik desteklerini gördüğüm Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Tolgay ERGENOĞLU ve Yrd. Doç. Dr. Leyla Şahin'e, ayrıca bu uzun süreçte gerek kendi tecrübeleri ve anlayışları, gerekse Biyofizik Anabilim Dalı'nın hiçbir imkânını benden esirgemeyen başta Prof. Dr. Ülkü ÇÖMELEKOĞLU olmak üzere tüm Biyofizik öğretim elemanlarına sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Lisansüstü eğitimim sırasında yardımlarını hiç esirgemeyen birlikte görev yaptığım Anatomi Anabilim Dalı'ndaki başta Arş. Gör. İsmail Yağmurhan GILAN olmak üzere tüm çalışma arkadaşlarıma ve Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda görev yapan değerli arkadaşım Arş. Gör. Didem ÖZGÜR'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ve son olarak, hayatımın her aşamasında olduğu gibi bu tez çalışmam sırasında beni her zaman maddi ve manevi olarak destekleyen aileme sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

# İÇİNDEKİLER

|   |      |
|---|------|
| <b>KABUL VE ONAY</b> .....  | ii   |
| <b>TEŞEKKÜR</b> .....   | iii  |
| <b>İÇİNDEKİLER</b> .....  | v    |
| <b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....  | vii  |
| <b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....  | ix   |
| <b>SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....   | x    |
| <b>ÖZET</b> .....   | xii  |
| <b>ABSTRACT</b> .....   | xiii |
| <b>1. GİRİŞ</b> .....   | 1    |
| <b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....  | 3    |
| 2.1. İyonize Radyasyon .....  | 3    |
| 2.2. Formatio Hippocampi .....  | 4    |
| 2.3. Hipocampus'un Üçlü Yollağı .....   | 7    |
| 2.4. Erişkin Hipokampal Nörogenez .....   | 8    |
| 2.5. Erişkin Hipokampal Nörogenez'deki Hücre Tipleri ve<br>Bunların Tayininde Kullanılan İşaretleyiciler..... | 9    |
| 2.6. Hipokampal bağımlı öğrenme ve hafıza.....  | 10   |
| 2.7. DNA Metilasyonu.....   | 11   |
| <b>3. GEREÇ VE YÖNTEM</b> .....   | 14   |
| 3.1. Çalışmanın Aşamaları ve Deney Gruplarının Oluşturulması .....  | 14   |
| 3.2. Kranial İyonize Radyasyon Modelinin Oluşturulması .....  | 16   |
| 3.3. Deney Gruplarının Fenotipik Olarak Takip Edilmesi .....  | 19   |
| 3.4. Morris Su Tankı Testi .....  | 19   |
| 3.5. Açık Alan Testi .....  | 21   |
| 3.6. İntrakardiyak Perfüzyon .....  | 22   |
| 3.7. Dokuların İmmunohistokimyasal İşlemler İçin Hazırlanması .....   | 22   |
| 3.8. Jelatin Blok Hazırlanması .....  | 23   |
| 3.9. Serbest Yüzdürme (Free Floating) İmmunohistokimya İşlemi .....   | 24   |
| 3.10. İstatistiksel Analiz .....  | 26   |
| <b>4. BULGULAR</b> .....  | 27   |

|   |           |
|---|-----------|
| 4.1. Radyasyona Bağlı Fenotipik Değişimler .....  | 27        |
| 4.1.1. Vücut Ağırlıklarının Zamana Bağlı Değişimi .....                                 | 27        |
| 4.1.2. Tüy Fenotipi .....   | 28        |
| 4.1.3. Radyasyona Maruziyetine Bağlı Oküler Hasarlar .....                              | 30        |
| 4.2. Öğrenme ve Hafızanın Değerlendirilmesi .....                                       | 32        |
| 4.3. Açık Alan Test Paradigması ve Lokomotor Aktivitenin Değerlendirilmesi...           | 34        |
| 4.4. Gyrus Dentatus Tabakalarında Doublecortin<br>Immunohistokimyasal Ekspresyonu ..... | 35        |
| 4.4. Gyrus Dentatus Tabakalarında Dnmt3a<br>Immunohistokimyasal Ekspresyonu .....       | 35        |
| 4.4. Gyrus Dentatus Tabakalarında MecP2<br>Immunohistokimyasal Ekspresyonu .....        | 36        |
| <b>5. TARTIŞMA .....</b>  | <b>38</b> |
| <b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER .....</b>   | <b>48</b> |
| <b>7. KAYNAKLAR .....</b>   | <b>50</b> |
| <b>ÖZ GEÇMİŞ .....</b>  | <b>59</b> |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

|   |    |
|---|----|
| Şekil 2.1. Hipocampus ve deniz atı .....                                  | 6  |
| Şekil 2.2. Hipocampus'un yerleşimi ve çevre yapılarla olan ilişkisi ..... | 6  |
| Şekil 2.3. Hipocampus'un üçlü yolağı.....                                 | 7  |
| Şekil 2.4. Erişkin hipokampal nöroenez basamakları .....                  | 10 |
| Şekil 2.5. DNA metilasyon ve demetilasyonu.....                           | 13 |
| Şekil 3.1. Deney modeli şeması .....                                      | 16 |
| Şekil 3.2. Radyasyon kaynağı.....   | 17 |
| Şekil 3.3. Radyasyon paradigmasının oluşturulması .....                   | 18 |
| Şekil 3.4. Morris su tankı .....  | 20 |
| Şekil 3.5. Morris su tankı testi kalibrasyonunun uygulanması .....        | 20 |
| Şekil 3.6. Morris su tankı testi deney tasarısı .....                     | 21 |
| Şekil 3.7. Açık alan test paradigması .....                               | 21 |
| Şekil 3.8. Jelatin blok görüntüsü .....                                   | 24 |
| Şekil 4.1. Fenotipik tüy değişimleri .....                                | 30 |
| Şekil 4.2. Gruplarda gözlenen göz kapağı hasarları .....                  | 31 |



|  |    |
|--|----|
| <b>Şekil 4.3.</b> Kontrol, Sham ++ ve Rad ++ gruplarının MSTT performansının istatistiksel değerlendirilmesi ..... | 33 |
| <b>Şekil 4.4.</b> Kontrol, Sham + ve Rad + gruplarının MSTT performansının istatistiksel değerlendirilmesi .....   | 33 |
| <b>Şekil 4.5.</b> Rad + ve Rad++ gruplarınınMSTT performansının istatistiksel değerlendirilmesi.....               | 34 |
| <b>Şekil 4.6.</b> Tüm grupların AAT performansının istatistiksel değerlendirilmesi .....                           | 35 |
| <b>Şekil 4.7.</b> DCX İmmunohistokimyasal Ekspresyonu .....  | 36 |
| <b>Şekil 4.8.</b> DNMT3a İmmunohistokimyasal Ekspresyonu .....   | 36 |
| <b>Şekil 4.9.</b> MecP2 İmmunohistokimyasal Ekspresyonu .....  | 37 |

## ÇİZELGELER DİZİNİ

|   |    |
|---|----|
| <b>Çizelge 4.1.</b> Tüm grupların vücut ağırlıklarının (gr) değişimi .....                                  | 28 |
| <b>Çizelge 4.2.</b> Fenotipik tüy değişimleri.....  | 29 |
| <b>Çizelge 4.3.</b> Radyasyon grubu farelerde ortaya çıkan<br>göz kapağı hasarların sınıflandırılması ..... | 31 |

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

|                |  |
|----------------|--|
| <b>5h</b>      | : 5 hidroksimetilsitozin                         |
| <b>5mc</b>     | : 5 metilsitozin                                 |
| <b>AAT</b>     | : Açık Alan Testi                                |
| <b>ALL</b>     | : Akut Lenfoblastik Lösemi                       |
| <b>Ascl1</b>   | : Achaete-scute homolog 1                        |
| <b>CA</b>      | : Cornu ammonis                                  |
| <b>DAB</b>     | : 3,3'-Diaminobenzidine                          |
| <b>DCX</b>     | : Doublecortin                                   |
| <b>dmax</b>    | : Depth of Dose Maximum                          |
| <b>DNMT</b>    | : DNA metil transferaz enzimi                    |
| <b>EHN</b>     | : Erişkin hipokampal Nörogenez                   |
| <b>GD</b>      | : Gyrus dentatus                                 |
| <b>GFAP</b>    | : Glial fibrillary acidic protein                |
| <b>GY</b>      | : Gray   |
| <b>HBÖ</b>     | : Hipokampal bağımlı öğrenme                     |
| <b>HBH</b>     | : Hipokampal bağımlı hafıza                      |
| <b>HC</b>      | : Hipocampus                                     |
| <b>Hes5</b>    | : Mammalian hairy and enhancer-of-split homologs |
| <b>İMR</b>     | : İmmatür nöronlar                               |
| <b>K</b>       | : Normal Kontrol                                 |
| <b>Ki67</b>    | : Antigen KI-67                                  |
| <b>KR</b>      | : Kraniyal iyonize radyasyon                     |
| <b>NeuroD1</b> | : Neurogenic differentiation 1                   |
| <b>Neun</b>    | : Neuronal nuclear antigen                       |
| <b>NKH</b>     | : Nöral kök hücre                                |
| <b>NPH</b>     | : Nöral progenitor hücre                         |
| <b>MecP2</b>   | : Methyl CpG binding protein 2                   |
| <b>MN</b>      | : Matür nöronlar                                 |
| <b>MÖ</b>      | : Mekansal öğrenme                               |
| <b>MSTT</b>    | : Morris Su Tankı Testi                          |

|                  |                                  |
|------------------|----------------------------------|
| <b>P</b>         | : Postnatal gün                  |
| <b>PSA-NCAM</b>  | : Neural Cell Adhesion Molecule  |
| <b>Rad</b>       | : Radyasyon grubu                |
| <b>Rad+</b>      | : Tek doz radyasyon grubu        |
| <b>Rad++</b>     | : Çift doz radyasyon grubu       |
| <b>RT</b>        | : Radyoterapi                    |
| <b>Sham</b>      | : Anestezik kontrol              |
| <b>Sham+</b>     | : Tek doz anestezi grubu         |
| <b>Sham++</b>    | : Çift doz anestezi grubu        |
| <b>Sn</b>        | : Saniye                         |
| <b>SRY</b>       | : Sex determining region Y       |
| <b>SOX2</b>      | : Sex determining region Y box-2 |
| <b>ST</b>        | : Subgranüler tabaka             |
| <b>SVT</b>       | : Subventriküler tabaka          |
| <b>SSD</b>       | : Source to Skin Distance        |
| <b>Tbr2</b>      | : T-box brain protein 2          |
| <b>TET 1/2/3</b> | : Ten Eleven Translocation       |
| <b>TFC</b>       | : Trace Fear Conditioning        |
| <b>ZK</b>        | : Zeka katsayısı                 |

## ÖZET

### İyonize Radyasyonun Fare Beyni Üzerine Olan Etkilerinin Epigenetik Olarak Değerlendirilmesi

Kraniyel radyasyon terapisi malignensilerin tedavisinde etkili bir araç olmasıyla birlikte kısa ve uzun dönemde istenmeyen yan etkiler gösterdiği bilinmektedir. Kognitif kusurlar kraniyel radyoterapinin uzun dönemde ortaya çıkabilen esas etkilerinden biri olarak kabul edilmektedir.

Rodentlerde beynin yeni gelişmeye başladığı dönemlerde kraniyel radyasyona maruziyeti, erişkin döneme gelindiğinde bu uygulamanın hipokampal nörogenezde değişikliklere yol açabildiği gösterilmiştir. Çalışmamızda C57BL6/J fare beyinlerine erken dönemdeki kraniyel radyasyon uygulamasının erişkin dönemdeki hipokampal nörogenezi azaltmasının yanında, epigenetik olaylarda da değişikliklere neden olduğu gösterilmiştir. Deneysel tasarımımda; postnatal 14. Günde (P14) yavrulara tek doz olarak 8 Gray (Gy) (Rad+ grubu) ile P14 ve P21 de birer doz 8 Gy olmak üzere çift doz (toplam 16 Gy) (Rad++) tüm kraniyel radyasyon uygulanmıştır. Ayrıca yaş ve vücut ağırlığı bakımından eş bir grup yavru da sham (anestezik) ve normal kontrol grupları olarak deneye dahil edilmiştir. Kraniyel radyasyon uygulamasından 7 ay sonra, bütün gruplar ilk önce lokomotor aktivitelerinin sınanması açısından Açık Alan Testi'ne daha sonrasında ise hipokampal bağımlı mekansal öğrenme ve uzun dönem hafızayı değerlendirmek için Morris Su Tankı Testi (MSTT) paradigmasına tabi tutulmuşlardır. Açık Alan testinde gruplar arasında önemli farklılıklar görülmemiştir. Fakat MSTT'nde Rad+ ve Rad++ gruplarında kontrol gruplarına kıyasla kognitif becerilerde çeşitli derecelerde azalma kaydedilmiştir. Ayrıca, bu farklılığın önemli derecede doza bağımlı olduğu anlaşılmıştır. MSTT testlerini takiben, tüm gruplara ait P231 beyinlerinin hipokampuslarında mevcut nörogenezi ve epigenetik olayları değerlendirebilmek için fenotipik nöronal ve epigenetik işaretleyiciler kullanılarak immünohistokimyasal boyamalar gerçekleştirilmiştir. Radyasyona maruz bırakılan fare beyinlerinde gyrus dentatus'un iç granüler tabakasında kontrol gruplarına kıyasla Doublecortin (DCX) (olgunlaşmamış nöron işaretleyicisi) ile işaretlenmiş hücre popülasyonunda önemli miktarda azalma tespit edilmiştir. Çalışmamızda ayrıca aynı hipokampal bölgelerde en temel DNA metilasyon faktörlerinden biri olarak kabul gören Methyl-CpG Binding Protein 2 immünohistokimyasal ekspresyonunun radyasyona bağlı olarak belirgin düzeyde azaldığı gösterilmiştir.

Bütün bulgularımız ışığında genel olarak erken dönemdeki kraniyel radyasyon uygulamasının sadece nörogenezi değil, aynı zamanda MSTT deneylerinde gözlenen zayıflamış kognitif yeteneklerin hücresel düzeydeki yansımaları olan erişkin hipokampusundaki epigenetiği de değiştirdiğini gösterilmiştir. İyonize radyasyonun epigenetik programlamayı ne şekilde etkilediğinin mekanizmalarının anlaşılması radyasyon maruziyetinin zararlı etkilerine karşı alınabilecek önlemlerin gelişmesine ışık tutacaktır.

Anahtar Kelimeler: Erişkin Hipokampal Nörogenez, Kraniyel Radyasyon Maruziyeti, DNA metilasyonu, Epigenetik

## ABSTRACT

### Epigenetic Evaluation of The Effects of Cranial Irradiation On Mice Brain

Cranial radiotherapy is an effective tool in the treatment of pediatric malignancies but it is associated with adverse side effects, both short and long term. One of the cardinal late onset effects is cognitive deficits. Exposure of cranial irradiation to the early brain in rodents has been shown to potentially change the hippocampal neurogenesis levels in adulthood. Here, we demonstrated that epigenetics is also altered accompanying with the reduced hippocampal neurogenesis in the adult brain of C57BL6/J mice after the early cranial irradiation.

For the experimental design, a single dose of 8 Gray (Gy) whole cranial irradiation at postnatal day 14 (P14) (Rad+ Group) or double doses (Rad++ Group) of 8 Gy both at P14 and P21 (total of 16 Gy) were administered to the pups. Additionally, a group of age and body weight matched mice were assigned as sham (anesthetic) or naive controls. Seven months after the cranial irradiation, three main groups of mice (Control, Sham and Rad) were first assigned for Open Field test to measure the locomotor activity, and afterwards for Morris Water Maze paradigm to test the hippocampal dependent spatial learning and long term memory. No significant difference was observed between the groups in Open Field test. Meanwhile, in the Morris Water Maze experiments, Rad+ and Rad++ groups displayed significantly weaker cognitive abilities as compared to the controls. Lastly, a significant dose-dependent difference of irradiation was also detected.

Following Morris Water Maze experiments, we employed immunohistochemical stainings (im) with phenotypic neuronal and epigenetic markers to test the ongoing neurogenesis and epigenetic events in the P231 hippocampi. We found a significant decrease of Doublecortin (DCX)-im (immature neuron marker) at the inner granule cell layer of dentate gyrus of irradiated mice as compared to the controls. In the same hippocampal regions, there were also significant reduction of Methyl-CpG Binding Protein 2-im positive cells a well-known DNA methylation determinant.

Our overall data suggests that exposure of cranial irradiation to the young brain alters not only the neurogenesis but also the epigenetic profile in adult hippocampus which may reflect the cellular base of the weakened cognitive abilities observed in the Morris Water Maze experiments. understanding the mechanisms by which ionizing radiation affects epigenetic programming will provide insight into how to develop protection against the potentially harmful risks associated with radiation exposure.

Keywords: Adult Hippocampal Neurogenesis, Cranial Irradiation, DNA methylation, Epigenetics

## GİRİŞ

Günümüzde, kraniyal iyonize radyasyon (KR) maruziyetinin öğrenme ve hafıza üzerinde oluşturduğu hasarların patogenez mekanizmaları henüz istenen düzeyde aydınlatılabilmemiş değildir. Birçok deneysel çalışmada, KR maruziyetinin öğrenme ve hafıza fonksiyonlarının altında yatan hipokampal nörogenez adı verilen nörobiyolojik olayı bozduğu gösterilmiştir. Yakın geçmişte, çevresel faktörlerin epigenetiksel programları değiştirerek hücrel ve gen düzeyinde bozukluklar oluşturduğu bilinmektedir. Fakat KR maruziyetinin hipokampal nörogenez üzerinde oluşturduğu olumsuz etkinin epigenetikle ilişkisi bilinmemektedir.

Memelilerde kalıtsal bilgiye ait talimatları içeren genlerin ifade olabilmeleri, yani genlerin gerekli zamanda ve dokuda fonksiyonel protein ürünlerine dönüşebilmesi ya da tam tersi susturulması işlemlerinin kontrolünde çevresel faktörlerin büyük rol oynadığı bilinmektedir. Diğer bir deyişle kalıtsal materyalde bulunan genetik bilginin ancak çevresel yönlendirmeyle işler hale geçebileceği düşünülmektedir. Kalıtsal bilgiyi içeren DNA üzerindeki genlerin normal ya da düzensiz biçimde ifade olmaları çevresel uyarıların kalıtsal materyal üzerinde oluşturduğu genetik üstü yani Epigenetiksel mekanizmalar ile gerçekleşmektedir. Örneğin DNA ve histon proteinleri üzerinde gerçekleşen kimyasal modifikasyonlar ya da bu modifikasyonların işleyişinde rol oynayan moleküllerin beyin gelişimindeki davranışlarının birçok nöral genin aktivasyon ve inhibisyonunu kontrol ettiği bilinmektedir. Kısacası, söz konusu epigenetik mekanizmaların, intrinsik faktör olarak kabul edilen kalıtsal materyalin ya da kromatinin üç boyutlu yapısını çevresel uyarılarla birlikte dinamik bir şekilde değiştirerek genler ile çevre arasında bir köprü vazifesi gördüğü düşünülmektedir. Son yıllarda Biyoloji ve Tıp alanında yapılan araştırmalarda, hücrel çoğalma, farklılaşma, olgunlaşma ve hücrel hayatta kalma gibi birçok önemli biyolojik olayın yukarıda özetlenen epigenetik mekanizmaların sağladığı transkripsiyonel orkestrasyon sayesinde düzenlendiği anlaşılmaya başlanmıştır.

Bu tez çalışmasında, postnatal beyin gelişimi sırasında uygulanan kraniyal radyasyon maruziyetinin geç dönem erişkin beyinde, uzun dönem sonra hipokampal bağımlı öğrenme (HBÖ) ve hafıza üzerine etkisi ve bu dinamikleri oluşturan erişkin

hipokampal nörogenez'in (EHN) nörobiyolojik işleyişi epigenetiksel bir bakış açısıyla anlaşılmaya çalışılmıştır.

Çalışmamızdan elde edilecek bulgular doğrultusunda, KR maruziyetinin neden olduğu bozukluklarının etiolojisinin anlaşılması için gerçekleştirilecek temel ve klinik araştırmalara yeni bir bakış açısı kazandırılabilceği düşünölmektedir.



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. İyonize Radyasyon

Radyasyon, elektromanyetik dalga veya parçacıklar biçimindeki enerji yayımı ya da aktarımı olarak bilinmekte ve iyonize/iyonize olmayan şekilde sınıflandırılmaktadır (1, 2). İyonize radyasyon ise doku ve hücrelerde bulunan atom ve moleküllerden elektron kopararak değişiklik yapabilen, yüksek frekanslı ve dolayısıyla yüksek enerjili olan X ışınları ve gama ışınları olarak tanımlanmaktadır (3). Yaşadığımız yüzyılda, radyoaktif izotopların ve radyasyonun temel bilim, tıp, tarım ve endüstri gibi çeşitli uygulama alanlarında kullanımının çok büyük boyutlara ulaştığı bilinmektedir.

Radyoterapi (RT), primer ve metastatik beyin tümörleri, merkezi sinir sistemi odaklı lösemik lenfomalar ve baş boyun kanserlerinde başlıca tedavi yöntemi olarak kullanılmaktadır (4, 5). Yakın dönem araştırmalar, Amerika Birleşik Devletleri'nde yılda 200.000 kadar hastanın ışın tedavisi amaçlı kısmi veya tüm KR'a maruz kaldığını göstermektedir (6).

Radyasyon tedavisine olumlu yanıt olarak hayatta kalma süresi artmakla birlikte radyasyon maruziyetinin yan etkisi olarak ortaya çıkan kognitif bozuklukların büyük bir sağlık problemi oluşturduğu bilinmektedir (6, 7). Farklı beyin bölge ve hücre gruplarında oluşan radyasyona bağlı biyolojik hasarın derecesi maruziyetin dozu, süresi ve sıklığına bağlı olarak değişkenlik gösterebilmektedir (8, 9). Ağır yapısal ve fonksiyonel hasarların çoğunlukla yüksek dozlardaki maruziyete (>60 Gray (Gy) ) bağlı ortaya çıktığı bilinmekle birlikte, daha düşük dozların da belirgin bir morfolojik değişimin gözlenmediği kognitif bozukluklara neden olduğu gözlenmiştir (10, 11). Geniş bir yelpazede değişkenlik göstermekle birlikte, RT gerçekleştikten birkaç ay ile birkaç yıl sonraki süreçte hastaların birçoğunda kısa dönem hafıza, mekansal algılama, görüntüsel motor fonksiyonlarda bozulma, sayısal yeteneklerde zayıflama ve dikkat bozukluğu gibi anormallikler gözlemlendiği bilinmektedir (12). Özellikle akut lenfoblastik lösemili (ALL) çocuklarda kranial RT uygulandığı (13, 14, 15) ve bu tip malignitelerden kurtulanlarda uzun dönemde çeşitli kognitif bozuklukların sıkça ikincil hasar olarak ortaya çıktığı bilinmektedir (16, 17, 18, 19). Bu hastalarda uzun dönemde öğrenme güçlükleri, hafıza ve dikkat bozuklukları, depresyona ve madde bağımlılığına eğilim başta olmak üzere çeşitli sağlık problemleri görülmüştür. Uzun dönem hayatta

kalan pediyatrik hastaların akranlarına kıyasla daha düşük Zeka Kat Sayısı (ZK) değerlerine sahip olmaları; öğrenme ve entelektüel fonksiyon bozukluklarının altına yatan esas yapısal unsurlardan biri olarak kabul edilmektedir (20, 21). Ayrıca bu hastalardaki ZK seviyelerindeki düşüklük ile RT görme yaşı arasında ters bir ilişki olduğu saptanmıştır (22, 23, 24). Buna göre daha erken yaşta RT gören çocukların ZK'nın daha geç görenlere kıyasla düşük olduğu görülmüştür. Bu hastaların bir kısmının önceden öğrenilen bilgilerin hatırlanmasında sorunlar yaşadıkları gözlenmiştir. Diğer bir kısmının ise eski bilgileri hatırladıkları fakat yeni bilgilerin öğrenilmesinde zorluk yaşadıkları bildirilmiştir (25). Çeşitlilik gösteren bu klinik tablonun altında yatan patogeneze çok iyi bilinmemekle birlikte beyinde farklı anatomik yapıların (örneğin; subventriküler tabaka (SVT) ve hipocampus'un (HC) gyrus dentatus'u (GD) ve bu tabakalarda değişime uğrayan hücre gruplarının (örneğin; nöral kök hücreler (NKH), immatür nöronlar (İMR), matür nöronlar (MN) ve astrositler vb.) radyasyondan olumsuz etkilenmiş olduğu in-vivo ve in-vitro olarak gösterilmiştir (26, 27, 28, 29). Bahsedilen mikro ve makro anatomik yapıların hasara uğradığının deneysel olarak gösterilmesine rağmen radyasyona bağlı gelişen patogeneze mekanizmaları halen istenilen düzeyde anlaşılammıştır. Literatür incelendiğinde RT sonrası gözlenen kognitif bozuklukların altında yatan temellerin moleküler düzeyde daha iyi anlaşılabilmesi için konunun farklı bakış açılarından değerlendirilmesi gerektiği görülmektedir.

Özetlemek gerekirse, birçok deneysel hayvan modeli ve klinik bulgulara ait bilimsel raporlar göz önünde bulundurulduğunda, radyasyon maruziyetinin genetik veya genetik kökenli olmayan gelişimsel kusurlara yol açtığı bilinmektedir.

## **2.2. Formatio Hippocampi Anatomisi**

Formatio hippocampi, öğrenme ve hafızada anahtar rol oynadığı düşünülen limbik sistem parçası olarak bilinmektedir. Bu anatomik yapıyı hipocampus (HC), GD, subiculum ve entorhinal korteks oluşturmaktadır (30, 31).

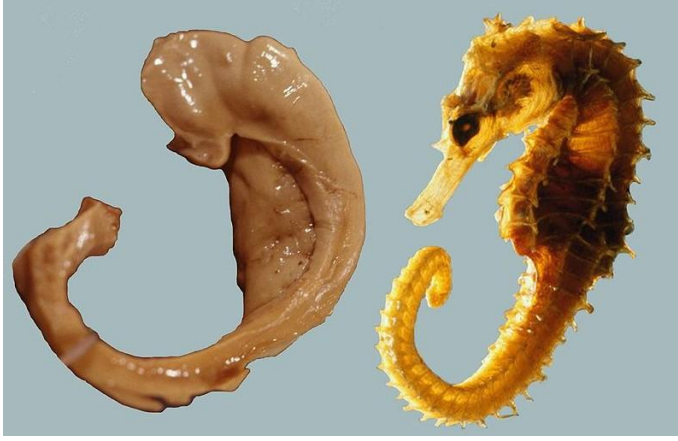
Formatio hippocampi, ventriculus lateralis'in cornu inferius'unun (cornu temporale) tabanı boyunca uzanan kıvrılmış bir korteks bölümü olarak bilinmektedir ve şekil olarak deniz atına benzediği için yunanca deniz atı anlamına gelen hippocampus (Yunanca: *ἵππος*, *hippos* = at, *καμπος*, *kampos* = deniz) adı verilmiştir (Şekil 2.1) (32).

Bilaminer yapıdaki HC'un bir laminası içe doğru katlanarak cornu ammonis (CA) ya da HC proper'i oluşturmakta; diğer lamina ise GD (fascia dentata, gyrus involutus) olarak uzanmaktadır (Şekil 2.2) (33). Gyrus parahippocampalis – CA geçiş bölümünde yer alan subiculum (area 27) da formatio hippocampi kapsamında değerlendirilmektedir. Cornu ammonis insanlarda en iyi bilinen limbik sistem oluşumudur. Cornu ammonis ve GD'taki kortikal yapı filogenetik olarak en eski korteks (archicortex) özelliğindedir. Genişlemiş ön ucu pes hippocampi olarak adlandırılmakta ve buradaki 3-4 yuvarlak çıkıntıya digitationes hippocampi adı verilmektedir (31).

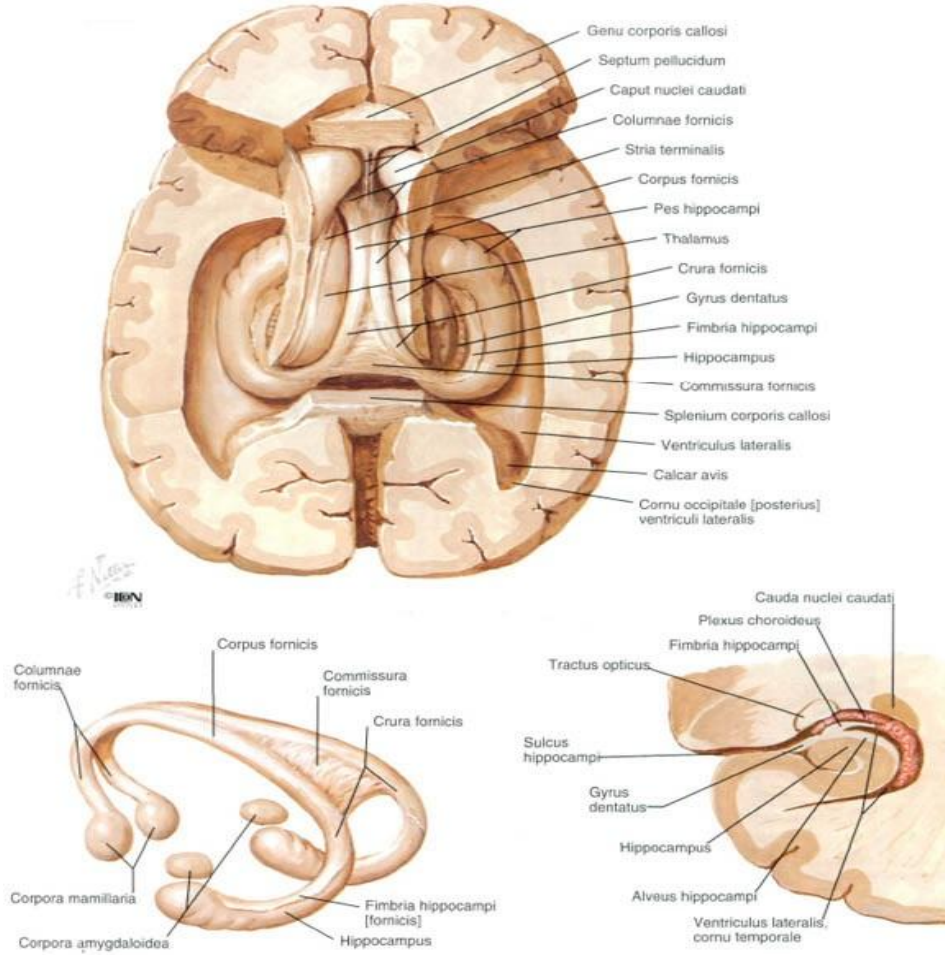
Hipocampus'un konveks olan ventriküler yüzü endim tabakası ile kaplıdır. Endim tabakası ile korteks arasında alveus tabakası yer almaktadır ve alveus HC'tan çıkan efferent lifler tarafından oluşturulmaktadır. Bu lifler toplanarak HC'un konkav iç kenarı boyunca (HC ile GD arasında) uzanan fimbria hippocampi'yi oluşturmaktadır (31).

Hipocampus'un korteks yapısı, stratum oriens (polimorfik tabaka), stratum pyramidale, stratum moleculare olmak üzere 3 tabakadan oluşmaktadır. Cornu ammonis ise temel hücreler olan piramidal hücre tabakasındaki hücrelerin çeşitli bölgelerde çok farklı görünüşleri dikkate alınarak CA1, CA2, CA3 ve CA4 alanlarına ayrılmıştır. İnsanlarda en büyük alan subiculum ile HC'nin geçiş yerinde bulunan CA1 alanıdır. Bu alanların her birinin spesifik işlevlerinin ve patolojilerinin mevcut olduğu bilinmektedir (31, 34, 35).

Fornix, formatio hippocampi'nin 1,5 – 2 milyon lif içeren temel efferent lif demeti olarak bilinmektedir. Gyrus dentatus ise fimbria hippocampi ile gyrus parahippocampalis arasında yer alan 3 katmanlı dar, çentikli bir bölümdür. Bu katmanlarda bulunan hücreler HC'tan impulslar alarak; subiculum ve HC'a impulslar göndermektedir (31, 36, 37)



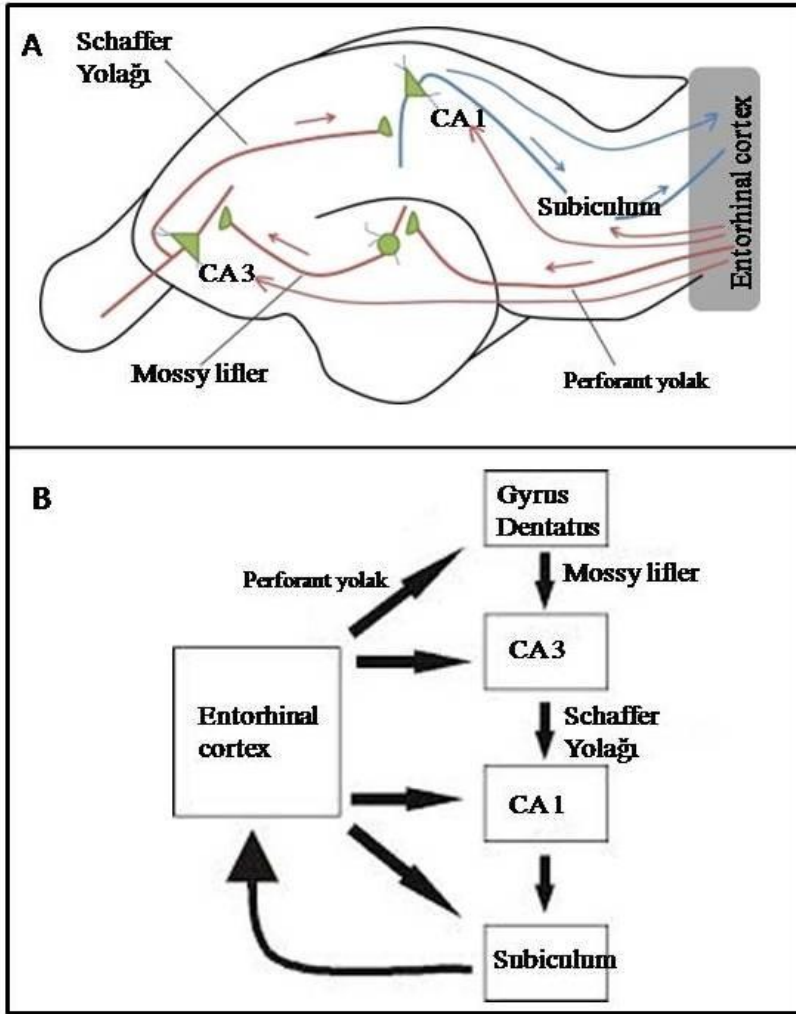
Şekil 2.1. Hipocampus ve deniz atı (32)



Şekil 2.2. Hipocampus'un yerleşimi ve çevre yapılarla olan ilişkisi (33)

### 2.3. Hipocampus'un Üçlü Yolağı

Hafıza ile ilişkili sinirsel uyarıların, perforant lifler adı verilen lifler ile entorhinal korteks'ten geldiği ve GD'un granüler hücreleri ile sinaps yaptığı bilinmektedir (1. yolak). Granüler hücrelerden başlayan mossy lifler, CA3 bölgesindeki piramidal hücrelere projekte olmaktadır (2. yolak). Buradan başlayan aksonlarsa iki dala ayrılarak karşı taraf HC'una projekte olan komissural lifleri ve CA1 alanındaki hücrelerle bağlantı kuran Schaffer'ın kollateral yolağını oluşturmaktadır (3. yolak). Bu yolaklardaki hücresel haberleşme, yani sinaptik olayların öğrenmenin temelini oluşturduğu düşünülmektedir (Şekil 2.3) (34, 35).



Şekil 2.3. Hipocampus'un üçlü yolağı. (A: rodent beyninde yolakların görüntüsü, B: yolakların şematik görüntüsü).

## 2.4. Erişkin Hipokampal Nörogenez

Nörogenez, prenatal ve neonatal yaşam sırasında genlerin iç ve dış hücresel faktörler ile etkileşimiyle, temel anatomik yapının şekillenmesi ve oluşmakta olan bu anatomik yapının fizyolojik olarak aktif bir sisteme dönüşmesi periyodu olarak bilinmektedir (38).

1975 yılına kadar, Santiago Ramón y Cajal'ın öne sürdüğü üzere nörogenezin gelişim tamamlandıktan sonra beynin tüm bölgelerinde durduğu ve hücrelerin hayatın sonuna kadar sabit olduğu fikri kabul görmekteydi (39).

Ancak Goldman ve ark. (40) kanaryalarda yaptıkları çalışmalarda Cajal'ın yanlış olduğunu öne sürmüşlerdir. Bu çalışmada, kanaryaların kışın ötme davranışının yoğun olduğunu ve sonbaharda ise bu davranışın durduğundan yola çıkarak kanaryaların vokal korteksini incelemişlerdir. Kışın kanaryaların ötme fonksiyonu yoğunken vokal korteks'inde çok sayıda yeni nöron oluşumu olduğunu, ötme davranışının durduğu sonbaharda ise nöronların programlı hücre ölümüne gittiğini tespit etmişlerdir. Böylece Goldman ve ark. (40), Santiago Ramón y Cajal'ın (39) yapmış olduğu tanımlamanın aksine erişkin yaşamda hücrelerin statik olmadığını ve sürekli değişim halinde olduğunu öne sürmüşler ve bu olayı da Erişkin Nörogenez olarak isimlendirmişlerdir.

İlerleyen yıllarda gerçekleştirilen araştırmalarda, erişkin yaşamda nörogenez'in beynin sadece iki tabakasında sınırlandığı anlaşılmıştır. Bunlardan birincisi beynin lateral ventriküllerini çevreleyen subventriküler tabaka (SVT), ikincisi ise HC'un GD'unun subgranüler tabakası (ST) olarak bilinmektedir (41, 42, 43, 44). Bu iki tabakanın hayat boyu sürekli bir kök hücre üreticisi gibi görev yaptığı bilinmektedir. Bu tabakalarda doğan kök hücreler hızlıca sayılarını arttırarak ve farklılaşmaya başlayarak hedef bölgelere göç etmektedirler. Göç ettikleri bölgelerde özel nöral kimliklere farklılaşarak o bölgeyle ilgili fonksiyonları gerçekleştirmek üzere farklı nöron karakterlerinde (GABAerjik, dopaminerjik ve bunun gibi) elektrofizyolojik olarak aktif (sinaps yapabilir) fenotiplere dönüştükleri bilinmektedir (45, 46, 47, 48).

Örneğin Erişkin Olfaktör Nörogenez'de SVT'da doğan kök hücrelerin çoğalmalarını takiben hızlı bir biçimde farklılaşarak bulbus olfactorius'a doğru göç ettikleri bilinmektedir (45, 46, 47). Göçlerini tamamlayan hücrelerin ise bulbus olfactorius'da farklı tip nöral kimliklere, örneğin GABAerjik ya da dopaminerjik

nöronlara olgunlaşmalarıyla birlikte kokuya bağlı öğrenme ve koku ayırt edebilmede görev aldıkları bilinmektedir (49, 50, 51, 52).

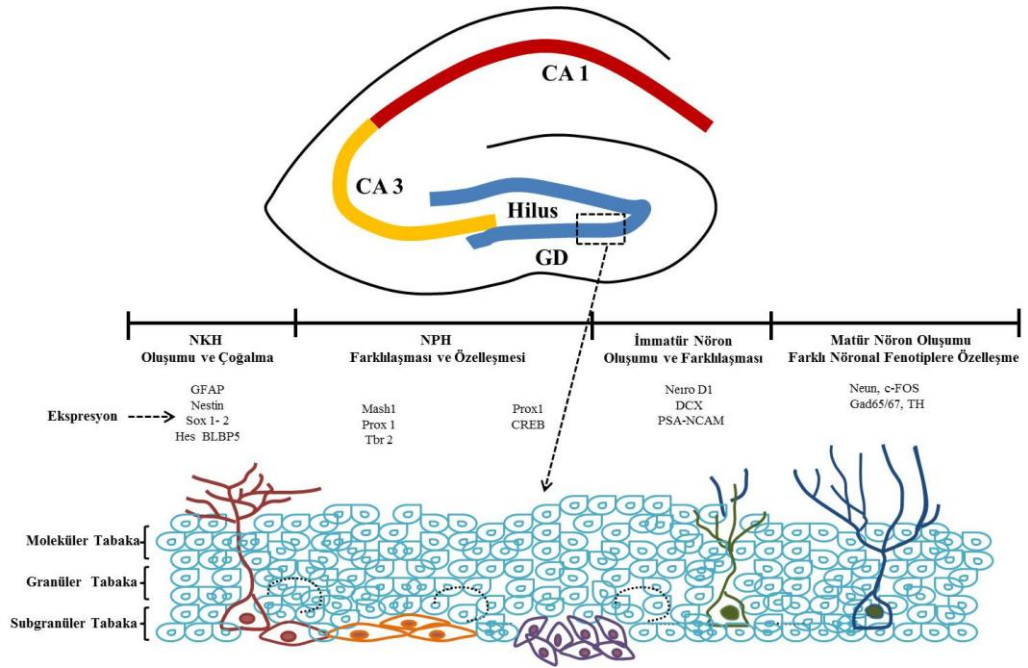
Yukarıda Erişkin Olfaktör Nörogenез'le benzer bir şekilde hipokampus'un subgranüler tabakasında doğan hücrelerin ise hızlıca çoğalarak farklı CA bölgelerine göç ettiği ve bu tabakalarda olgun granül nöronlara farklılaşarak öğrenme yollarında görev yapacak esas hücreleri oluşturdukları bilinmektedir. Bu tezin araştırma konusu kapsamında da olan HC'un GD'u ile ST arasında gerçekleşen bu nörobiyolojik hücresel dönüşümler olayına ise Erişkin Hipokampal Nörogenез (EHN) adı verilmektedir (53, 54, 55, 56, 57 ).

## **2.5. Erişkin Hipokampal Nörogenез'deki Hücre Tipleri ve Bunların Tayininde Kullanılan İşaretleyiciler**

Erişkin hipokampal nörogenезin gerçekleştiği ST'nin yaşam boyu süren bir nöral kök hücre (NKH) üreticisi gibi görev yaptığı bilinmektedir (41, 42, 43, 44). Ayrıca, rodentlerde ST'da 12-24 saatlik bir süreçte yaklaşık 8000 ile 10000 arası yeni nöron oluşumunun gerçekleştiği bildirilmektedir (58). Yakın dönemdeki çalışmalarda, hipokampal nörogenез döngüsü kısaca 4 basamak tanımlanmaktadır: yeni NKH oluşumu ve çoğalma, çoğalmadan sonraki hücrenin kaderinin belirlendiği (fate differentiation) ve nöral progenitör hücre (NPH) oluşumu (58), NPH'lerin maturasyon için göç ederek nöroblastlara ve nöroblastlardan olgunlaşmamış nöronlara farklılaşma ve son aşama olan elektrofizyolojik olarak inaktif haldeki olgun nöronlara dönüşmesi (60, 61). Nöral kök hücre (NKH) oluşumundan elektrofizyolojik olarak aktif hale gelme aşaması yaklaşık olarak 28 gün sürdüğü bilinmektedir (61) .

Yenidoğan NKH'ler ve onların çoğalmaları SRY (sex determining region Y)-box 2 (SOX2), Glial fibrillary acidic protein (GFAP), nestin, mammalian hairy and enhancer-of-split homologs (Hes5), Achaete-scute homolog 1 (Ascl1), Paired box protein (Pax6) gibi NKH ve Antigen KI-67 (Ki67) gibi bilindik proliferasyon işaretleyicileri ile gösterilmiştir (50, 62, 63, 64). Subgranüler tabakada çoğalan NKH'lerin ilk olarak ara geçiş formu olarak bilinen NPH'lere farklılaştığı T-box brain protein 2 (Tbr2) ve Neurogenin-2 (Neurog2) gibi bilindik NPH işaretleyiciler kullanılarak tespit edilebilmektedir (50, 65, 66, 67, 68). Maturasyon yönündeki farklılaşmanın gerçekleşmesi için nöral progenitor hücrelerin nöroblastlara dönüşmesi

ve göçe başlaması ise Transcription factor SOX-2 (Sox2), Neurogenic differentiation 1 (NeuroD1), Neuronal migration protein doublecortin (DCX) ve Neural Cell Adhesion Molecule (PSA-NCAM) gibi işaretleyiciler kullanılarak gösterilmektedir (69). Matürasyon ve göçün gerçekleştiği ve elektrofizyolojik olarak aktif hale gelmeden önceki son formu olan olgun nörona dönüşümü ise Neuronal nuclear antigen (Neun) işaretleyici kullanılarak gösterilmiştir (70, 71). Erişkin hipokampal nörogenez'in bir sonraki aşaması ise nöronal özelleşme olarak bilinmektedir. Olgun nöronların elektrofizyolojik olarak aktif hale dönüşerek CA bölgeleriyle ve entorhinal korteksle bağlantı kurarak hafıza ve öğrenme yollarında fonksiyonellik kazanma sürecini içermektedir (55, 56, 57, 72).



Şekil 2.4. Erişkin hipokampal nörogenez basamakları

## 2.6. Hipokampal Bağımlı Öğrenme ve Hafıza

Erişkin hipokampal nörogenez'deki hücresel ve moleküler düzeydeki değişimler çeşitli histolojik ve moleküler işaretleme teknikleriyle başarıyla belirlenebilmektedir (50, 62, 65, 66, 69, 70, 61). Bunun yanı sıra rodentlerde hipokampal bağımlı öğrenme ve hafıza, bilişsel ve motor yetilerin değerlendirilmesi amacıyla pek çok farklı davranış deney düzenekleri kullanılmaktadır. Bu amaçlarla kullanılan en yaygın yöntemler; T labirent (73, 74), açık alan testi (AAT) (64) ve Morris su tankı testi (MSTT) olarak



bilinmektedir (75, 76, 77, 78). Morris su tankı, Morris (76) tarafından tanımlandığından bu yana rodentlerde HBÖ ve hafızayı test edebilmek amaçlı yaygın olarak kullanılmaktadır.

Morris su tankı testi uygulayıcı tarafından amaca uygun şekilde modifiye edilebilmekle birlikte, genellikle dairesel veya silindirik şeklinde, içi 21- 26°C sıcaklıkta su ile dolu bir tank kullanılarak, tank içerisine yerleştirilen yükseltinin fare tarafından bulunabilmesinin test edilmesi temeline dayanmaktadır (76, 79, 80). Hafıza yetisi ise bu deney düzeneğinde yükseltinin olmadığı ve bırakılan farenin en uzak yönden atılarak önceden yükseltinin bulunduğu yerde ne kadar süre geçirdiği ölçülerek belirlenmektedir (78, 79, 81, 82). Söz konusu öğrenme ve hafıza deneyleri 5 ile 13 gün arasında sürdürülebilmektedir.

Radoslaw Rola ve ark. (81) yaptıkları çalışmada KR'un EHN'de hasara yol açtığını ve buna paralel olarak Morris su tankı testiyle de radyasyon grubu farelerin kontrol grubundakilere kıyasla öğrenme ve hafızayla ilgili parametrelerinde önemli düşüş olduğunu rapor etmiştir. Daha yakın dönem çalışmalarda da MSTT'nin, KR'a bağlı oluşan EHN hasarlarının öğrenme ve hafıza üzerindeki yansımalarını teyit etmek amacıyla ana belirteç olarak yer aldığı görülmektedir (29, 81, 82).

Açık alan testleri ise rodentlerin duygusal durumunu, anksiyete benzeri davranışlarını, otonom işlevlerini ve lokomotor aktivitelerini de içeren çeşitli durumları değerlendirmek amacıyla farklı deney kurguları tasarlanarak yaygın olarak kullanılmaktadır (83). Çalışmamızda da kullanıldığı üzere AAT'inde lokomotor aktivite ölçmek amacıyla temel prensip olarak, üstü açık kare veya dairesel bir platforma kısıtlı bir süreyle bırakılan farelerin kat ettikleri yol ve hız değerlendirmeye alınmaktadır (29, 77, 83, 84).

## **2.7. DNA Metilasyonu**

Bilindik genetik değişimlerden farklı olarak, DNA diziliminde herhangi bir değişime neden olamayan fakat hücrelerin kalıtsal materyali olan kromatinde üç boyutlu yapısal değişimlere yol açabilen ve kalıtsal olan tüm biyolojik olaylar için Epigenetik terimi kullanılmaktadır. Yukarıdaki tarife uyan birçok biyolojik olay bulunmakla birlikte DNA metilasyonu normal biyolojik işleyiş üzerinde olmazsa olmaz

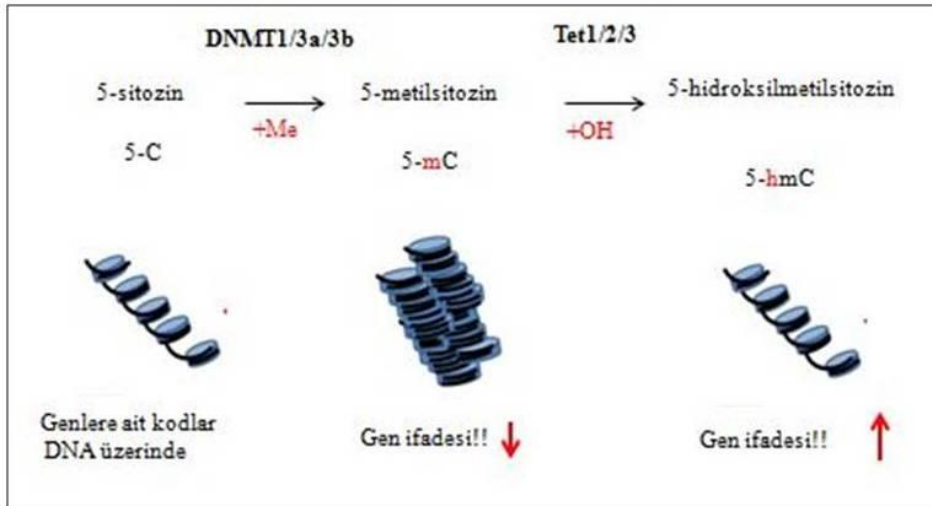
etkiye sahip olduğu bilinen ve işlevi en çok anlaşılabilmiş epigenetik mekanizmaların başında gelmektedir.

Basit bir tanımla, DNA metilasyonu, DNA metil transferaz enzimlerinin (DNMT) DNA'nın 5 ucundaki karbon grubuna bir metil grubu eklenmesi (5 metilsitozin-5mC) işleminin katalizlendiği basit bir kovalent modifikasyon olarak bilinmektedir. DNA metilasyonu'nun varlığı kromatinin kondensasyonu (heterokromatin) ve ilgili kromatin bölgesindeki transkripsiyonel aktivitenin baskılanması (Transcriptional Repression) ile karakterize olduğu gösterilmiştir (85, 86, 87). Yakın geçmişe kadar 5mC'nin stabil bir modifikasyon olduğu ve metile olmuş DNA'nın zamanla seri hücrel bölünmeler yoluyla pasif şekilde seyreterek demetile olduğu düşünölmekteydi. Yakın zaman önce keşfedilen Ten Eleven Translocation (Tet1/2/3) ailesi enzimlerinin 5mC'ni oksidatif yolla 5 hidroksimetilsitozine (5hmC) çevirdiğinin gösterilmesiyle metile olmuş DNA'nın aktif bir şekilde demetile olabildiği anlaşölmüştür (Şekil 2.6) (88).

Bu yakın keşiften çıkan bilgi, yani metile olmuş DNA'nın aktif şekilde demetile olabilmemesinin gen ekspresyonu kontrolünde ne gibi bir önemi vardır sorusunu akla getirmektedir. Buna göre aktif demetilasyon işlemi, kısalmış ve kondense (heterokromatik) halde bulunan kromatin bölgesinin tekrar açılarak ökromatik yapıya dönüşmesi ve heterokromatik bölgelerdeki baskılanmış durumdaki gen ekspresyonlarının tekrar aktifleşmesi anlamına gelmektedir. Özetlemek gerekirse, DNA metillendiği zaman (5mC) metile olmuş DNA bölgesindeki gen ekspresyonları global olarak baskılanmakta, demetile olduğunda ise (5hmC) tekrar aktif duruma geçmektedir. DNA'nın üç boyutlu yapısını büyük dinamiklerle değiştirerek DNA'da global düzeyde gen ekspresyonunu kontrol eden bu epigenetik modifikasyonların hücrel farklılaşma sürecinde postmitotik yolla bir sonraki hücreye aktarıldığı (DNA diziliminde bir değişikliğe neden olmadan) ve hücrelerin yeni kimlikler kazanmasını yani farklılaşmasını kontrol ettiği anlaşölmüştür (89). Son yıllarda, DNA metilasyonunun beyin gelişimi sırasında nöral farklılaşma ve olgunlaşma gibi kritik nörobiyolojik olaylara paralel olarak değişen, rastgele olmayan, aksine zamansal ve uzaysal (Spatio-Temporal) olarak dinamik şekilde değişen bir program olduğu gösterilmiştir (90, 91, 92, 93). Ayrıca, DNA metilasyon mekanizmalarının sinaptik plastisite, öğrenme, hafıza ve yaşlanmaya paralel beyindeki kognitif değişikliklerin yönlendirilmesi gibi birçok

sinirsel olayın altında yatan nörobiyolojik işlemlerde önemli rol oynadığı gösterilmiştir (94, 95).

Tüm bu bilgi birikimi EHN işleyişi hakkında yapılacak çalışmalara yön göstermekle birlikte bu nörobiyolojik olayların rastgele gerçekleşmediğini işaret etmektedir. Aksine yaşam boyu döngüsel olarak tekrarlanan bu işlemler sırasında hücrelerin farklı kimlikler kazanarak bir başka nöronal fenotipe dönüşümünün hücre içinde transkripsiyonel olarak çok sıkı bir şekilde kontrol edilmesi gerektiği sorusunu akla getirmektedir. Mevcut literatür, farklılaşma basamaklarında çeşitli hücre içi ve dışı belirleyici faktörlerin varlığını sunmakta, fakat bu faktörlerin aktifleşmesinden sorumlu genlerin ekspresyonlarının hücre içinde nasıl programlandığının yanıtını vermekte yetersiz kalmaktadır.



**Şekil 2.5.** DNA metilasyon ve demetilasyonu. (5C: DNA'nın 5' ucundaki sitozin, DNMT1/3a/3b: DNA metiltransferaz enzimleri, +Me: metil grubu eklenmesi, 5mC: 5 Metilsitozin, Tet1/2/3: Ten Eleven Translocation enzimleri, +OH: hidroksil grubu eklenmesi, 5hmC: 5 Hidroksimetilsitozin).

## GEREÇ VE YÖNTEM

Bu tez çalışması, Mersin Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı'nın onay raporu ile yürürlüğe girmiştir. Çalışmamızda deney hayvanı modeli oluşturulması, gerekli dokuların elde edilmesi ve dokuların kullanım aşamasına kadar muhafaza edilmesi işlemleri, Mersin Üniversitesi (MEÜ) Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarı ile Anatomi Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir. Çalışmamızın esas deney tasarımını oluşturan radyasyon maruziyeti deneyleri Mersin İli Kamu Hastaneleri Birliği Genel Sekreterliği'nin 5451 numaralı onayıyla Mersin Devlet Hastanesi Radyo-Onkoloji Ünitesi'nde gerçekleştirilmiştir.

Çalışmamızda, insanlardaki postnatal gelişim süresinde radyasyon maruziyetinin uzun dönemde hafıza ve öğrenme temelli hasarların, X ışını cihazı kullanılarak C57 BL6/J fareler üzerinde taklit edilmesi planlanmıştır. Bu amaçla MEÜ Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarı'ndan elde edilmiş 14 günlük dişi C57BL/6J soy fare kullanılmıştır. Deney tasarımı radyasyon, anestezi ya da sham ve normal kontrol olmak üzere üç ana grubu (her bir grup için n=7-9) içermektedir.

Çalışmamızda aşağıda detaylı şekilde tarif edilen deney protokollerinin gerektirdiği işlemler uygulanmıştır.

### 3.1. Çalışmanın Aşamaları ve Deney Gruplarının Oluşturulması

Çalışmada oluşturduğumuz deney modeline ait bilgiler Şekil 3.1'de ayrıntılı bir şekilde gösterilmiştir. Radyasyon grubu (Rad) iki alt gruba ayrılmıştır. Anestezi etkisindeki postnatal 14. gün (P14) farelerin baş bölgesi tek bir seferlik 8 Gy dozunda KR'a (X ışını) maruz bırakılmıştır. Bu grup tek doz radyasyon grubu (Rad+) olarak adlandırılmıştır. Aynı sayıda diğer bir grup fare ise hem P14'de 8 Gy hem de P21'de 8 Gy dozunda KR'a maruz bırakılarak bu grup Çift Doz Radyasyon (Rad++) olarak adlandırılmıştır. Söz konusu radyasyon deneyleri Mersin Devlet Hastanesi Radyo-Onkoloji Ünitesinde Lunac-Siemens marka Premium 3D Plus model X ışını cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.2). Rad+ ve Rad++ grubu fareler daha sonra P231'e kadar standart laboratuvar kafeslerinde barındırılmıştır.

Anestezi Kontrol (Sham): Tek ve çift radyasyon grubu farelere uygulanacak anestezi işleminin sham kontrollerini sağlamak amacıyla, Rad+ ve Rad++ grubu

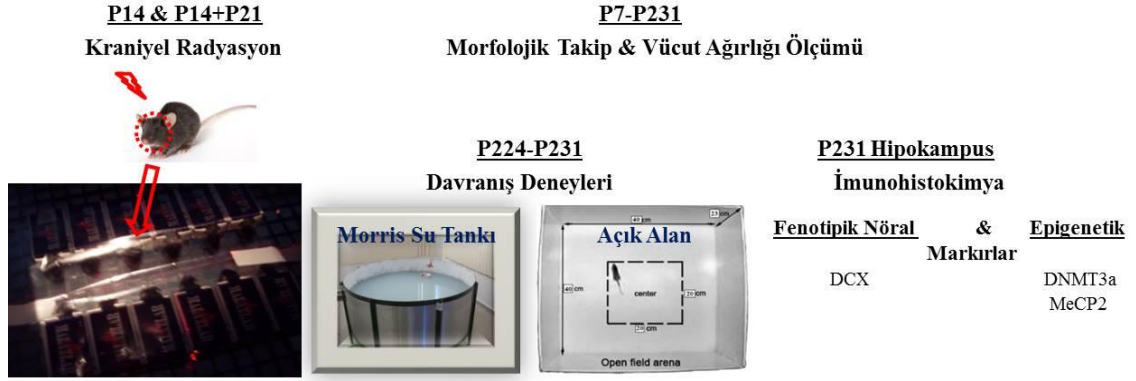
farelere denk ağırlık ve yaşta birer grup fare radyasyon grubundaki farelere ile aynı anestezi işlemine maruz bırakılarak P231'e kadar standart laboratuvar kafeslerinde barındırılmıştır. Söz konusu Anestezik gruplar tek (Sham+) ve çift doz anestezi (Sham++) grupları olarak adlandırılmıştır.

Normal Kontrol (K): çalışmamızın bu grubunda diğer gruplara denk yaş, ağırlık ve cinsiyetteki fareler P231'e dek standart laboratuvar kafeslerinde barındırılmıştır.

Çalışmamızda Rad+ (P14) ve Rad++ (P14+P21) grubu ve bu grupların anestezik kontrolü olan Sham+ (P14) ve Sham++ (P14+P21) grubu farelere radyasyon uygulamasından hemen önce geçici anestezi uygulanmıştır. Yalnızca Rad ve Sham gruplarına ait laktasyon dönemindeki yavru fareler ilgili uygulama günlerinde ME. Ü. Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarı'ndaki annelerinin kafeslerinden alınarak binek bir araçla Mersin Devlet Hastanesi Radyo-Onkoloji Ünitesi'ne taşınmışlardır. Bu uygulamalara başlamadan önce her bir seferde farklı kafeslerden alınan değişik sayılardaki hayvanın taşınması işleminin yavru farelerin birbirine karışması riskini taşıdığı öngörülmüştür. Bu sebeple oluşabilmesi kuvvetle muhtemel karışıklıklar, her bir yavru farenin kulağı işaretlenerek ve her bir anneden alınan yavrular ayrı ayrı, üzerinde grup ve anne kimliği olan kutular içerisinde taşınarak önlenmiştir.

Radyasyon uygulamasından hemen önce her iki ana grup fareler de 50 mg/kg Ketamin ve 8 mg/kg dozda Ksilazin kullanılarak intraperitoneal enjeksiyon yoluyla derin anestezi altına alınmıştır. Kuyruk kıstırma yöntemiyle anestezi altında olduğu teyit edilen Radyasyon gruplarına ait fareler radyasyona maruz bırakılırken, Sham gruplarına ait fareler radyasyona maruz bırakılmamıştır. Radyasyon uygulamasından hemen sonra hiç vakit kaybetmeden tüm fareler Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarı'na geri götürülerek her bir fare kendi annesinin kafesine dikkatlice geri yerleştirilmiştir. Laktasyon sürecinde bulunan annelerin, söz konusu fiziksel işlemlere bağlı olarak strese girip süttten kesilmesi veya kendi yavrularına kanibalizm davranışlarında bulunmasını önlemek amacıyla kafeslerin içine gerek yavru fareler kafeslerden alınmadan, gerekse tekrar geri yerleştirilmeden en az 15 dakika önce ılık suda yumuşatılmış haldeki standart fare peletleri bırakılmıştır. Ilık suda yumuşatılmış pelet takviyesi Rad gruplarında olduğu gibi Sham gruplarına da verilmiştir. Kontrol grubu farelere hiçbir zaman bu uygulama yapılmamıştır. Bu çalışma öncesinde elde ettiğimiz ampirik

tecrübeler ıslak pelet uygulamasının, C5BL6/J fareler üzerinde çeşitli şekillerde oluşabilen stresi azalttığını göstermiştir. Yukarıda tarif edilen şekilde gerçekleştirilen uygulamalar sonucunda çalışmamızda anestezi dozundan dolayı ölüm ya da süttten kesilme veya maternal kannibalizm vakası görülmemiştir.



Şekil 3.1. Deney modeli şeması

### 3.2. Kraniyel İyonize Radyasyon Modelinin Oluşturulması

Çalışmamızda ALL vakalarındaki KR maruziyetinin etkilerini modellemek amacıyla aynı anda 12 adet fareye radyasyon uygulayabileceğimiz kendi tasarladığımız bir sistem kullanılmıştır (Şekil 3.3). Uygun anestezi altındaki fareler söz konusu sistem içerisine yüzükoyun pozisyonunda yatırılmış ve bu da polistren bir platform üzerine yerleştirilmiştir (Şekil 3.3). Bu düzenekte 12 adet farenin baş bölgesi X ve Y düzlemlerinde 6,5 cm ve 22,5 cm<sup>2</sup>'lik üç boyutlu bir alanın merkezine denk gelecek şekilde yerleştirilmiştir. Hedeflenen bölgeye homojen bir radyasyon maruziyeti oluşturabilmek amacıyla 1 cm'lik dokuya denk Bolus adı verilen materyal farelerin baş bölgesine yerleştirilmiştir.

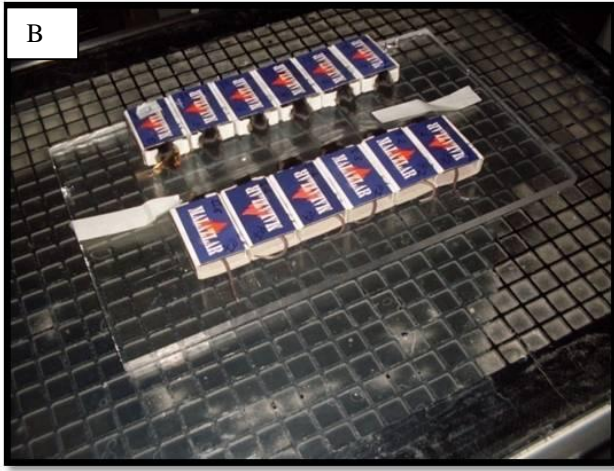
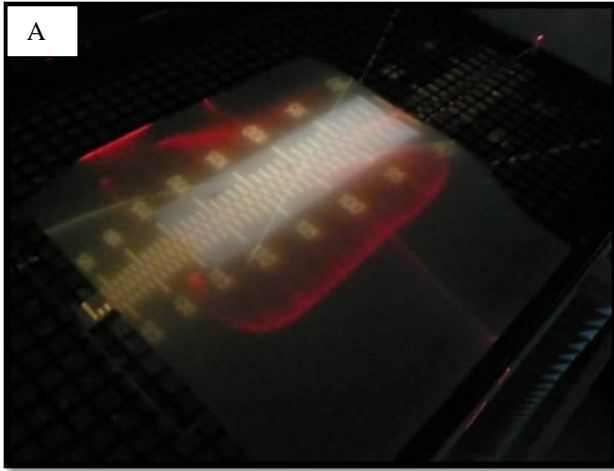
Dizayn ettiğimiz düzenek; bahsedilen X: 6,5 cm ve Y: 22,5 cm<sup>2</sup>'lik radyasyon alanına farelerin sadece baş bölgeleri denk gelecek şekilde yerleştirilmiştir. Bu alanla 1 cm'lik Bolus materyali ya da farelerin derisi ve radyasyon kaynağının arasındaki mesafe " Source to Skin Distance (SSD)" 100 cm olarak tasarlanmıştır. Bu düzenekte her bir farenin tüm beyninin ortasına denk gelen SSD değeri 101,5 cm olup bu noktadaki dozun maksimum derinlik değeri " Depth of Dose Maximum (dmax)" değeri ya da %100'lük

ön doz noktası 1,5 cm olarak hesaplanmıştır. Her bir uygulamada tek bir seferde 8-Gray (Gy) dozunda (2,0 Gy/dakika) iyonize X ışını radyasyonu (Siemens, Primus 3D Plus model Linear Accelerator, 6 MV Photon Beam) (Şekil 3.2) marka ve model radyasyon kaynağı kullanılarak uygulanmıştır. X: 6,5 cm ve Y: 22,5 cm<sup>2</sup>'lik alana yukarıda tarif edilen doz ve düzenekte, yüzükoyun pozisyonundaki fare başlarının en üst noktasına %97,35, merkezine % 100 ve taban kısmına % 98, 6 oranında radyasyon uygulanmıştır. Buna göre dokudaki doz varyasyonu  $\pm$  %2,7 olarak hesaplanmıştır.

Uygulamasını yaptığımız 8 Gy'lik doz LQ modelinde (Fowler, 1989) tekrarlı 2 Gy dozluk fraksiyonlar şeklinde toplamda 18 Gy doza denk gelmekte olup normal beyin dokusundaki uzun dönem etkisi  $\alpha$  bölü  $\beta$  oranı 3 olarak hesaplanmıştır (29). Uygulamasını yaptığımız bu doz, klinikte pediyatrik ALL vakalarında uygulanan doza denk gelmektedir (29). Çalışmamızda her bir radyasyon uygulamasının toplam süresi 4 dakika sürmüştür olup bu uygulamalar sırasında ilgili işlemlere bağlı hiçbir fare kaybı yaşanmamıştır. Her bir uygulamadan sonra laktasyon sürecinde bulunan fare yavruları annelerinin kafesine geri bırakılmıştır.



**Şekil 3.2.** Radyasyon kaynağı: Mersin Devlet Hastanesi Radyo-Onkoloji Ünitesi'nde bulunan Siemens, Primus 3D Plus model Linear Accelerator, 6 MV Photon Beam marka ve model cihaz



**Şekil 3.3.** Radyasyon paradigmasının oluşturulması (resminde özetle; uygulama öncesince radyasyon alanının belirlenmesi (A), anestezi altındaki farelerin yüzükoyun pozisyonda yerleştirildiği (uygulama/12 adet fare) düzenek (B) ve son olarak radyasyon uygulaması sırasındaki (C) fareler görülmektedir)



### 3.3. DeneY Gruplarının Fenotipik Olarak Takip Edilmesi

Yaklaşık 8 ay süren hayvan deneylerimiz süresince, kullandığımız fareler; vücut ağırlığı değişimleri, radyasyon ve aneztezi uygulamasına bağlı biyolojik manipülasyon ya da farelere gerçekleştirilen fiziksel müdahalelerden kaynaklanabilecek strese bağlı tüy değişimleri ve sadece radyasyon maruziyeti sonucunda ortaya çıkabilecek sorunları tespit edebilmek üzere yakın takip altına alınmıştır. Tüm fare gruplarının kiloları P7'den itibaren 2 gün arayla ardışık olarak P231'ne kadar kadar düzenli olarak ölçülerek kayıt altına alındı. Kilo ölçümlerinin yapıldığı sırada her fare fotoğraflanarak kayıt altına alındı.

### 3.4. Morris Su Tankı Testi

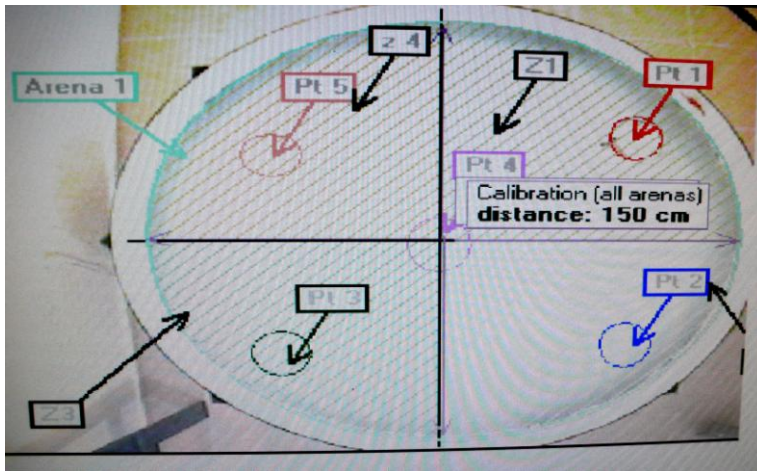
Çalışmamızda Kontrol, Sham+/Sham++ ve Rad+/ Rad++ gruplarına ait P224'e gelen farelerin öğrenme ve hafıza performansının MSTT ile ölçümü amacıyla 150 cm çaplı, 60 cm derinliğinde, sıcaklık kontrollü, paslanmaz çelikten yapılmış Fizyoloji Anabilim Dalı araştırma laboratuvarında bulunan deneysel kullanıma özel bir su tankı kullanılmıştır (Şekil 3.4). Tankın çevresine görülebilir ve yerleri sabit görsel ipuçları yerleştirilmiştir. Tüm deneyler her gün saat 09:00-13:00 arasında gerçekleştirilmiştir. Söz konusu tank 50 cm derinlikte ve  $22 \pm 1$  C° sıcaklığında süt tozu ile karıştırılmış suyla doldurulmuştur (Şekil 3.4). Bilgisayar ekranındaki görüntü üzerinden su tankı batı, kuzey, doğu ve güney olmak üzere dört eşit kadrana bölünmüştür (Sekil 3.5).

DeneY paradigmamızın 5 günlük işleyişi, ilk gün görünür platform, 2-5. günler arası gizli platform ve 6. gün ise platformun olmadığı tek denemeden oluşmaktadır (Şekil 3.6) (77). DeneYin ilk gününde 15 cm çaplı platform su seviyesinde yani 50 cm yüksekliğe ayarlanarak hem 4 kadrana ve hem de merkeze yerleştirilmiştir. DeneYin ilk günü tüm fareler platformun olduğu kadrana olan uzaklıklarına göre toplam 5 kez, başları su tankı duvarına dönük olacak şekilde suya bırakılmıştır. DeneYin 2 ve 5. günleri arasında günde 5 kere yapılmak üzere güneybatı kadrana platform su seviyesinin 1 cm altına gelecek şekilde yerleştirilerek farelerin platformu bulmaları gözlenmiştir. Fareler her bırakılıştta 60 sn süre ile yüzdürülerek, bu süre zarfında platform üzerinde 5 sn kalan farelerin deneYin bu aşamasını tamamlamış olduğu kabul edilmiştir. Platformu bulamayan farelerin ise plastik bir çubuk yardımı ile yönlendirilerek yükseltiyi bulmaları ve 20 sn süreyle platform üzerinde kalmaları

sağlanmıştır. Deney farelerinin 5 gün boyunca her atışta platformu bulma süreleri (sn), kat ettikleri toplam mesafe (cm) ve hızları (cm/sn) kaydedilmiştir. Deneyin son günü olan 6. günde ise platform çıkarılarak kuzey yönünden tek atış yapıp 60 sn boyunca kayıt yapılmıştır. Bu süre sonunda farelerin önceden platformun bulunduğu hedef kadran olan güneybatı kadranında ortalama geçirdikleri sürenin toplam süreye oranı hesaplanmıştır.



Şekil 3.4. Morris su tankı



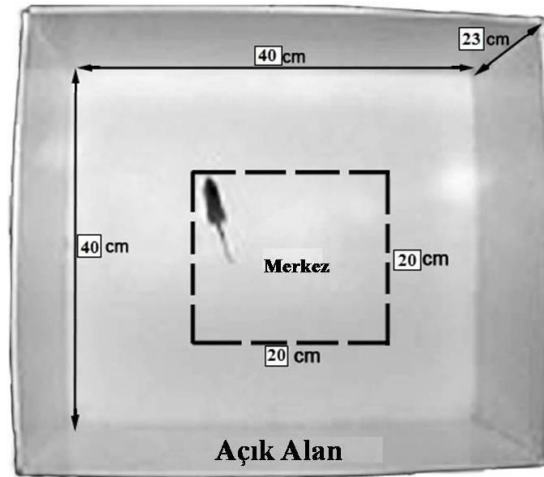
Şekil 3.5. Morris su tankı testi kalibrasyonunun uygulanması

| Görünür Platform |                   | Sabit Platform (Platform: Güneybatı) |                   |                   |                   | Platform Yok<br>(tek deneme) |
|------------------|-------------------|--------------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------------------------|
| 1.Gün            |                   | 2.Gün                                | 3.Gün             | 4.Gün             | 5.Gün             | 6.Gün                        |
| Platform         | Başlangıç<br>Yönü | Başlangıç<br>Yönü                    | Başlangıç<br>Yönü | Başlangıç<br>Yönü | Başlangıç<br>Yönü | Başlangıç Yönü               |
| Güneybatı        | Güney             | Batı                                 | Kuzey             | Kuzey             | Doğu              | Kuzey                        |
| Kuzeybatı        | Kuzey             | Güney                                | Batı              | Doğu              | Güney             |                              |
| Kuzeydoğu        | Güney             | Kuzey                                | Doğu              | Batı              | Batı              |                              |
| Merkez           | Doğu              | Doğu                                 | Batı              | Güney             | Doğu              |                              |
| Güneydoğu        | Batı              | Güney                                | Güney             | Kuzey             | Kuzey             |                              |

Şekil 3.6. Morris su tankı testi deney tasarısı

### 3.5. Açık Alan Deneyi

Çalışmamızda AAT, Rad+/Rad++ ve Sham+/Sham++ grubu farelerin hem kendi arasında hem de K grubu farelere kıyasla lokomotor aktivitelerinde farklılık olup olmadığını belirlemek için gerçekleştirilmiştir (75). Düzenegin zemin ve merkez kadranı bilgisayar programı yardımı ile Şekil 3.7'deki gibi kalibre edilmiştir. Çalışmaya alınan her bir farenin bu düzeneğe 10 dakika süreyle bırakılarak lokomotor aktivite değerlendirilmesi amacıyla kat ettiği toplam mesafe ve hızı ölçülmüştür.



Şekil 3.7. Açık alan test paradigması

### **3.6. İnrakardiyak Perfüzyon**

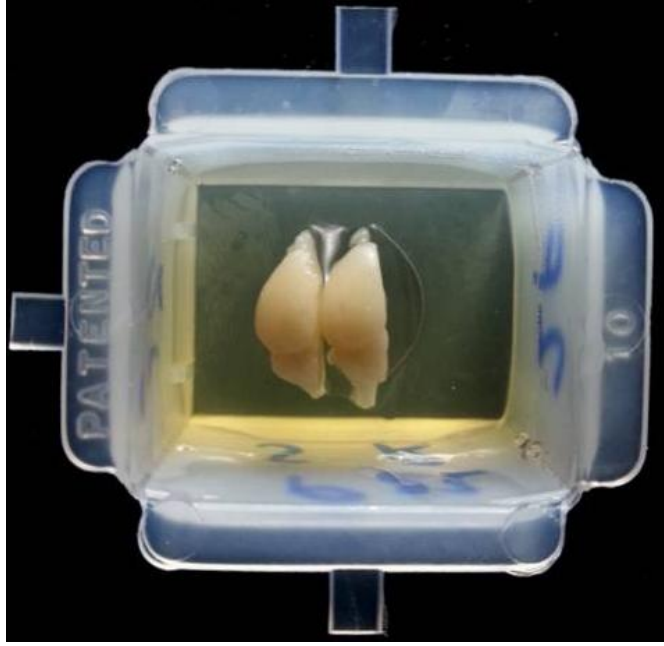
231. güne gelen fareler vücut ağırlıklarına göre 10 mg/kg Ksilazin ve 100 mg/kg dozda Ketamin kullanılarak intraperitoneal enjeksiyon yoluyla derin anestezi altına alınmıştır. Daha sonra göğüs kafesleri uygun cerrahi yöntem ile açılarak ve kalp kontraksiyona devam ederken, bir kanül ile kalbin apeksinden sol ventrikül içine girilerek oda sıcaklığındaki serum fizyolojik sıvısı dolaşıma vermeye başlanmıştır. Sonra sağ atriuma makasla bir kesi yapılarak, kanın dışarı akışı gözlenmiştir. Ardından aynı şekilde, +4°C sıcaklıkta 0.1M'lık sodyum fosfat ile tamponlanan % 4'lük paraformaldehit tespit solüsyonu sol ventrikülden dolaşıma verilmiştir. Bu işlem sonrasında uygun cerrahi aletler yardımıyla ilk önce deri ve ardından da kafatası açılıp beyin dokusunun dikkatli bir şekilde izole edilerek +4°C sıcaklıkta yeni hazırlanmış paraformaldehit solüsyonu içerisinde en az 48 saat boyunca tespit edilmesi sağlanmıştır. Uzun dönem saklanması gereken beyin dokuları 48saatlik %4'lük paraformaldehit fiksasyonundan sonra %0,1'lik paraformaldehit solüsyonu içerisine alınarak her iki haftada bir tazelenerek immunohistokimyasal işlemlerde kullanılabilecek kadar +4°C sıcaklıkta muhafaza edilmiştir.

### **3.7. Dokuların İmmunohistokimyasal İşlemler İçin Hazırlanması**

Çalışmamızdaki tüm immunohistokimyasal işlemler serbest yüzdürme (Free Floating) tekniğiyle gerçekleştirilmiştir. Serbest yüzdürme tekniğiyle işaretleme işlemine sokulacak beyinlerden vibratom aleti ile kesitler alınmıştır. Çalışmamızda belirlenen proteinlerin immunohistokimyasal ekspresyonlarının koronal kesitler üzerinde tespit edilmesi gerekmektedir. Bu nedenle her beyin uygun fiksasyon işleminden sonra sagittal hatta ortadan ikiye ayrılarak her bir beyin yarı küresinden amaca yönelik olarak koronal planda kesitler alınması amaçlanmıştır. Serbest yüzdürme tekniğiyle işaretleme yapacağımız beyin kesitlerinden vibratom kesitler almak için beyinler %10'luk jelatin bloklara gömülmüştür. Bu çalışmada laboratuvarımızda rutin olarak kullanmakta olduğumuz protokole göre aynı jelatin bloğuna 2 veya 3 beyin yarımını bir arada gömme işlemi gerçekleştirilmiştir. Böylece gerçekleştirilecek immunohistokimya işleminde birden fazla grubun aynı jelatin kesitler içerisinde eş zamanlı olarak tüm işlemlere maruz kalması sağlanmıştır (90, 96).

### **3.8. Jelatin Blok Hazırlanması**

Bu işlem için en başta distile su kullanılarak %10'luk jelatin solüsyonu hazırlanmıştır. İlk aşamada jelatin solüsyonu plastik kalıbın yarısına kadar doldurulup +4°C'de yarım saat süreyle bekletilerek jelatinin polimerize olması sağlanmıştır. Beyin yarımları cam bir petri kabının içerisindeki sıvı haldeki jelatin solüsyonuna batırılıp çıkarılarak hızlı bir şekilde katılaşmış olan yarısı dolu halde bulunan jelatin bloğunun üzerine rostrokaudal ve dorsoventral düzlemde dikkatli biçimde pozisyona sokulmuştur (Şekil 3.8). Beyin yarımları yerleştirilmiş olan bloğun geri kalan kısmı dikkatli bir şekilde jelatin solüsyonu ile tamamlanarak bloğun +4°C'de yarım saat süreyle katılaşması beklenmiştir. Katılaşığı anlaşılan jelatin bloğun plastik kalıp içerisinden çıkarılarak en az 24 en çok 48 saat süreyle +4°C sıcaklıkta % 4'lük paraformaldehit solüsyonu içerisinde immersiyon tespiti sağlanmıştır. Yeterli derecede fikse olmuş jelatin bloklar titreşimli vibratom aletine yerleştirilerek blok içerisindeki beyin dokularından 40µm kalınlığında koronal kesitler alınarak ve +4°C'de PBS içerisinde immünohistokimyasal işlemler gerçekleştirilene kadar muhafaza edilmiştir (90, 96). Elde edilen beyin kesitleri 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) yöntemiyle amaca yönelik hücre tiplerine özgü primer antikorlarla immünohistokimyasal olarak işaretlenmiştir. İmmünohistokimyasal olarak boyanan kesitler ışık mikroskobu altında değerlendirilmiştir.



Şekil 3.8. Jelatin blok görüntüsü

### 3.9 Serbest Yüzdürme İmmunohistokimya İşlemi

Bu yöntemde antikor inkübasyonu dahil kesitlerin işleme alınması gereken tüm basamaklar, 6'lı kuyucuklu hücre kültürü tabakları ve 4 ml'lik cam tüpler kullanılarak kesitlerin serbest olarak ilgili solüsyonlarda yüzdürülmesi prensibine dayanmaktadır. Tüm bu işlemler orbital çalkalayıcı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Serbest yüzdürme tekniği kullanarak daha önce gerçekleştirdiğimiz çalışmalara ait bilgilere ilgili referanslardan ulaşılabilir (90, 96).

Yeteri kadar özelleşmiş olmayan bir antikorun kullanılması, zaten oldukça pahalı olan bu sarf malzemelerinin, değeri tartışmasız olan hayvan dokularının ve de araştırma için harcanan zamanın boşa gitmesi ile sonuçlanabilmektedir. Çalışmamızda planladığımız ticari olarak elde edilecek primer veya sekonder antikorların ya da peroksidaz enzimi gibi önemli kimyasalların çoğunluğu bugüne dek kullandığımız ve güvenilirliğini birçok defa sınıadığımız sarf malzemeleridir. Bu çalışmada ilk defa kullanılmış kimyasallar ise literatür tarafından kabul görmüş yüksek kalitedeki araştırmalarda birçok kere kullanılmış olanlar arasından seçilmiştir. Buna rağmen ticari olarak elde edilen her bir kimyasalın yüksek kalitede çalışıp çalışmadığı ve özgünlük derecesi farklı konsantrasyonlar kullanılarak ve mutlaka negatif kontroller oluşturularak optimum boyanma koşullarıyla en az iki farklı pilot boyama protokolüyle birbirlerine eş

3 farklı doku üzerinde belirlenmiştir. Tüm bu işlemlere rağmen beklenen kaliteye ulaşmayan hiçbir antikor çalışmamızda kullanılmamıştır.

**Işık mikroskopik, DAB yöntemiyle immunohistokimya işlemi için kesitler sırasıyla aşağıdaki işlemlerden geçirilmiştir:**

- 0,1M PBS ile 3 kez 5`er dakika (3x5) yıkanır.
- %3`lük hidrojen peroksit solüsyonunda 10 dakika inkübe edilir.
- 0,1M PBS ile 3x5 yıkanır.
- PBS içinde hazırlanmış % 1`lik triton-X100 solüsyonunda bir gece muamele edilir.
- Ertesi sabah 0,1M PBS ile 3x5 yıkanır.
- % 0,1 Triton-X ve %1,5 normal serum içeren PBS solüsyonunda 90 dakika bloklanır.
- İlgili primer antikorun bloklama solüsyonu içerisinde uygun dilüsyonu sağlanır ve oda sıcaklığında en az 18 saat inkübasyona bırakılır.
- 0,1M PBS ile 6x5 yıkanır.
- Uygun sekonder antikorun bloklama solüsyonu içerisinde optimum dilüsyonuyla oda sıcaklığında en az 90 dakika inkübasyona bırakılır.
- 0,1M PBS ile 6x5 yıkanır.
- Peroksidaz konjuge streptavidin solüsyonu ile 90 dakika inkübe edilir.
- 0,1M PBS ile 3x5 yıkanır.
- 0,1M Tris-HCL tamponu (TBS) ile 3x5 yıkanır.
- 1mg/ml oranında (DAB) solüsyonunda 15 dakika inkübe edilir.
- DAB solüsyonuna 1ml/1µl oranında %3`lük hidrojen peroksit eklenerek renk reaksiyonu sağlanır.
- Genellikle 5-10 dakikalık süreç boyunca kesitler mikroskop altında uygun renk sağlanana kadar kontrol edilecektir. Not: Bu basamağın süresi her primer antikor için optimize edilmiştir.
- 0,1M TBS ile 3x5 yıkanır.
- 0,1M PBS ile 3x5 yıkanır.

- Lam üzerine zarar vermeden yapıştırılır (mounting) ve bir gece bekletilerek kurumaları sağlanır.
- Lamlar metil green (counterstaining) ile boyandıktan sonra lamel ile kapatılır.

### **3.10. İstatistiksel Analiz**

Çalışmamızda farklı grupların; vücut ağırlıklarının zamana bağlı değişimi, MSTT’nde kat edilen toplam mesafe, yüzme hızı, platformu bulma süresi ve hedef kadranda geçirilen sürenin toplam zamana oranı ve AAT’nde kat edilen toplam mesafe ve hız parametrelerinin karşılaştırılmasında ANOVA (Tek Yönlü Varyans Analizi), post-hoc olarak da LSD testi kullanılmıştır. İstatistik anlamlılık düzeyi  $p < 0.05$  olarak kabul edilmiştir. Elde edilen veriler grafiklerde, ortalama  $\pm$  standart hata biçiminde sunulmuştur.



## 4. BULGULAR

### 4.1. Radyasyon Bağımlı Fenotipik Değişimler

Yaklaşık 8 ay süren hayvan deneylerimiz süresince, kullandığımız fareler; vücut ağırlığı değişimleri, radyasyon ve anestezi uygulamasına bağlı biyolojik manipülasyon ya da farelere gerçekleştirilen fiziksel müdahalelerden kaynaklanabilecek strese bağlı tüy değişimleri ve sadece radyasyon maruziyeti sonucunda ortaya çıkabilecek sorunları tespit edebilmek üzere yakın takip altına alınmıştır.

#### 4.1.1. Vücut Ağırlıklarının Zamana Bağlı Değişimi

Radyasyon veya anestezi uygulamalarına bağlı ortaya çıkması muhtemel normal vücut ağırlık değişimlerinin normal kontrol grubuyla karşılaştırmak amacıyla her bir gruba ait farenin düzenli zaman aralıklarıyla sakrifiye edilecekleri P231'e kadar vücut ağırlıkları kayıt altına alınmıştır. Her bir ağırlık ölçüm gününde ilk önce kullanılan hassas terazinin kalibrasyonunun doğru olup olmadığı kontrol edilmiştir. Her bir ölçüm gününden önce kalibrasyon işlemi gerek cihazın su terazisi kompartmanı kontrol edilerek gerekse sabit bir nesnenin (çay kaşığı) ağırlığının ölçülmesiyle teyit edilmiştir. Bu nesne ayrıca birbirinden farklı 3 hassas terazide de ölçülerek kullandığımız terazinin doğruluğundan emin olunmuştur.

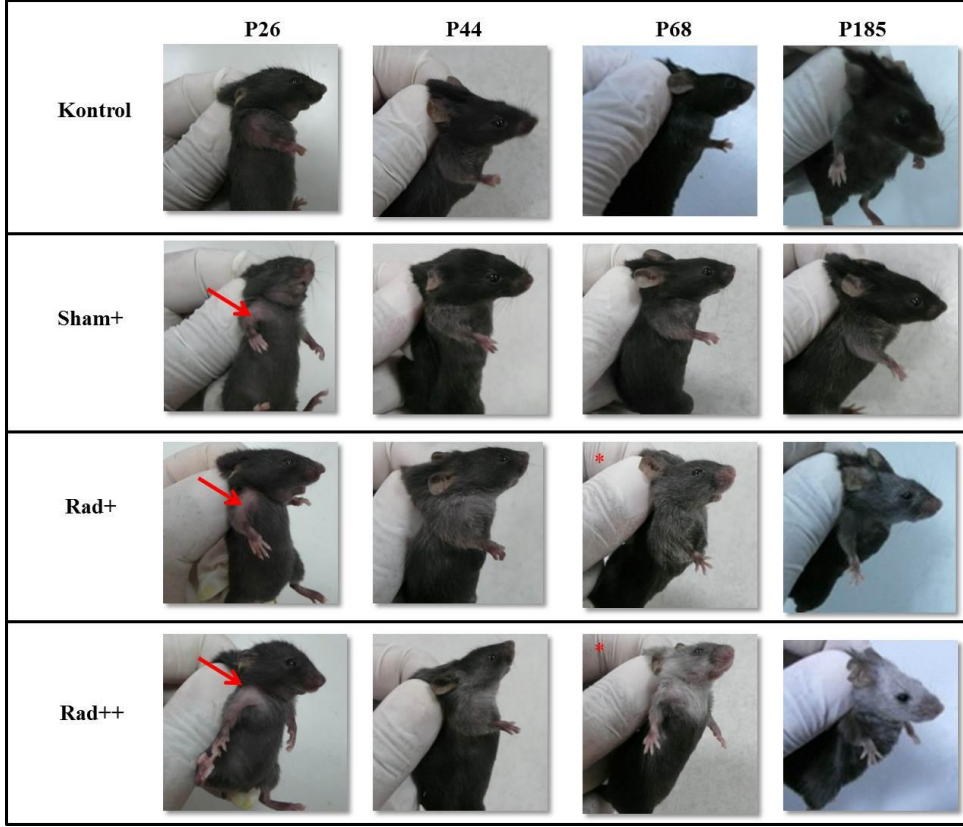
Bütün fare gruplarının vücut ağırlıkları P7 - P231'ler arasındaki periyotta düzenli aralıklarla ölçülmüştür (Çizelge 4.1). İstatistiksel anlamlılık  $p < 0,05$  olarak kabul edilmiştir.



son gün olan P36'den yaklaşık 4-10 gün sonraki bir süreçte tüy yenilenmesi sürecinin başladığı gözlenmiştir. Bu süreç ise gruplar arasında çeşitlilik göstermekle birlikte P40-P68'ler arasında gerçekleştiği tespit edilmiştir. Yenilenen tüy renginin her iki sham grubunda da bu fare soyunun orijinal rengi olan siyah renginde olduğu gözlenmiştir. Rad gruplarındaki bütün farelerde ise yeni çıkan tüylerin gri renkte olduğu tespit edilmiştir. Rad+ grubu farelerde yeniden çıkan gri renkteki tüy fenotipi P231'ne kadar değişmezken, Rad++ grubunda gri renk tüylerin P108'den itibaren hızlı bir şekilde beyaz renge dönüştüğü ve P231'ne dek aynı kaldığı gözlenmiştir. Bahsedilen tüy rengi fenotipik değişimlerini göstermek amacıyla bu değişim sürecinin kritik zamanları olan P26, P44, P68 ve P185 günlerinde her bir grubu temsilen birer farenin aynı pozisyonda fotoğrafları kullanılarak bir resim oluşturulmuştur (Şekil 4.1)

**Çizelge 4.2.** Fenotipik Tüy Değişimleri

| <b>Grup</b>   | <b>Tüy Dökme Süreci</b> | <b>Dökülen Tüylerin Yeniden Çıkma Süreci</b>  |
|---------------|-------------------------|---|
| <b>Sham+</b>  | P24-P35<br>(n=7)        | P44-P68<br>Yeniden çıkan tüyler koyu siyah renk   |
| <b>Rad+</b>   | P26-P36<br>(n=8)        | P46-P53<br>Yeniden çıkan tüyler gri renkte ve P230'e kadar aynı kalmıştır   |
| <b>Sham++</b> | P24-P35<br>(n=7)        | P40-P53<br>Yeniden çıkan tüyler koyu siyah renk   |
| <b>Rad++</b>  | P24-P36<br>(n=11)       | P40-P53<br>Yeniden çıkan tüyler gri renkte P69- P108<br>Gri renkteki tüyler beyaza dönüşmüştür ve P230'e kadar aynı kalmıştır |



**Şekil 4.1.** Fenotipik Tüy Değişimleri: Grupların P231'e kadar tüy değişimlerinin takibi. (Kırmızı oklar dökülmenin olduğu bölümü göstermektedir. Kırmızı asteriks yeni çıkan tüylerin farklı renke siyah olmadığını işaret etmektedir)

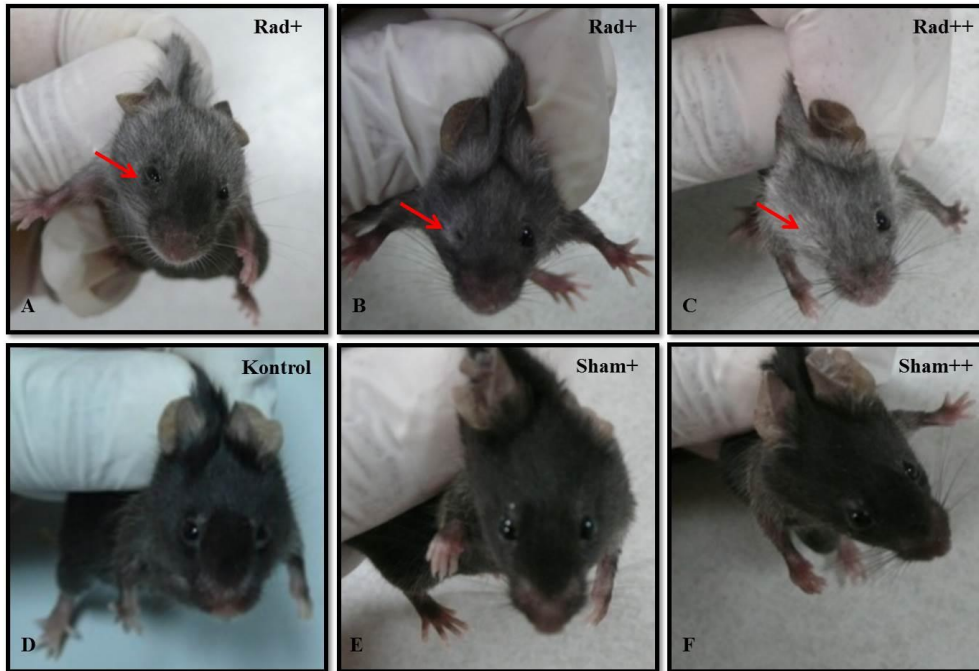
#### 4.1.3. Radyasyon Maruziyetine Bağlı Göz Kapağı Hasarları

Yukarıda bahsedildiği üzere vücut ağırlığı ve tüy değişimlerini tespit etmek amacıyla yaptığımız gözlemlerde radyasyonun ayrıca çeşitli derecelerde göz kapağı anormalliklere yol açtığı tespit edilmiştir. Uzun bir süreçte periyodik olarak her bir fare için yaptığımız gözlemler ve kayıt altına aldığımız fotoğraflar incelenerek söz konusu göz kapağı defektleri derecelendirilmiştir. Göz kapağı defektlerinin K ve Sham gruplarında gözlenmez iken yalnızca Rad gruplarında ortaya çıktığı tespit edilmiştir. Gözlenen defektlerin derecesi hafif, orta ve ileri şiddette sınıflandırılmıştır. Yaptığımız gözlemlerde Rad grubu farelerde kontrol gruplarıyla veya aynı hayvanın sağlam gözüyle karşılaştırıldığında; hafif, orta veya ileri derecede pitozis benzeri göz kapak düşüklüğü ya da orbita açıklığının daralmış olduğu gözlenmiştir. Hafif veya orta şiddette pitozisli fareler arasındaki fark çok net bir şekilde görülmektedir (Şekil 4.2). Hafif veya orta şiddetli orbita darlığının yanısıra bazı Rad grubu farelerde ise tek ve çift

tarafli tam göz kapakları tamamen kapanmış ileri derecede hasarlar olduğu gözlenmiştir. Her iki gruptaki çeşitli derecelerde göz kapağı hasarına sahip fare sayısı ile ilgili bir tablo oluşturulmuştur (Çizelge 4.3). Buna göre Rad+ grubundaki toplam 7 fare'nin 4'ünde göz kapağı hasarı (2'şer adet hafif ve orta şiddette), Rad++ grubunda ise toplam 11 farenin 7'sinde (2 adet hafif, 1 adet orta şiddetli ve 4 adet ileri derecede) göz kapağı hasarı tespit edilmiştir. Rad+ grubuna ait hiçbir farede ileri derecede göz hasarı gözlenmemiştir.

**Çizelge 4.3.** Radyasyon grubu farelerde ortaya çıkan göz kapağı hasarlarının sınıflandırılması

| Grup  | Toplam Göz Kapağı Hasarlı Fare Sayısı / n | Hafif Şiddetli Göz Kapağı Hasarlı Fare Sayısı / n | Orta Şiddetli Göz Kapağı Hasarlı Fare Sayısı / n | İleri Derece Göz Kapağı Hasarlı Olan Fare Sayısı / n |
|-------|---|---|--|--|
| Rad+  | 4/7                                       | 2/7   | 2/7  | 0  |
| Rad++ | 7/11                                      | 2/11  | 1/11   | 4/11   |

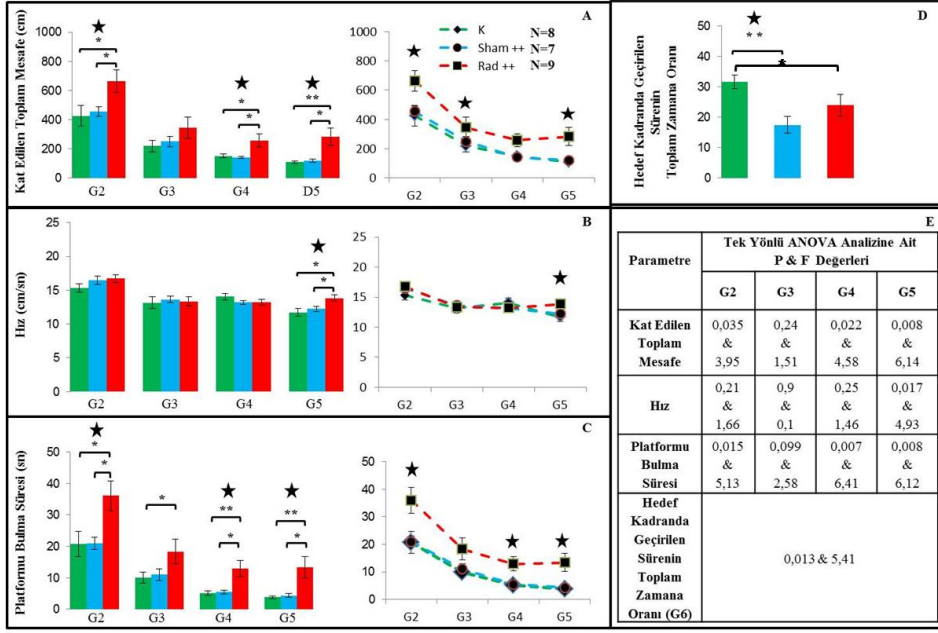


**Şekil 4.2.** Gruplarda gözlenen göz kapağı hasarları (Kırmızı oklar göz kapağı hasarlarını göstermektedir. Kontrol ve Sham gruplarında göz kapağı hasarına rastlanmadı).

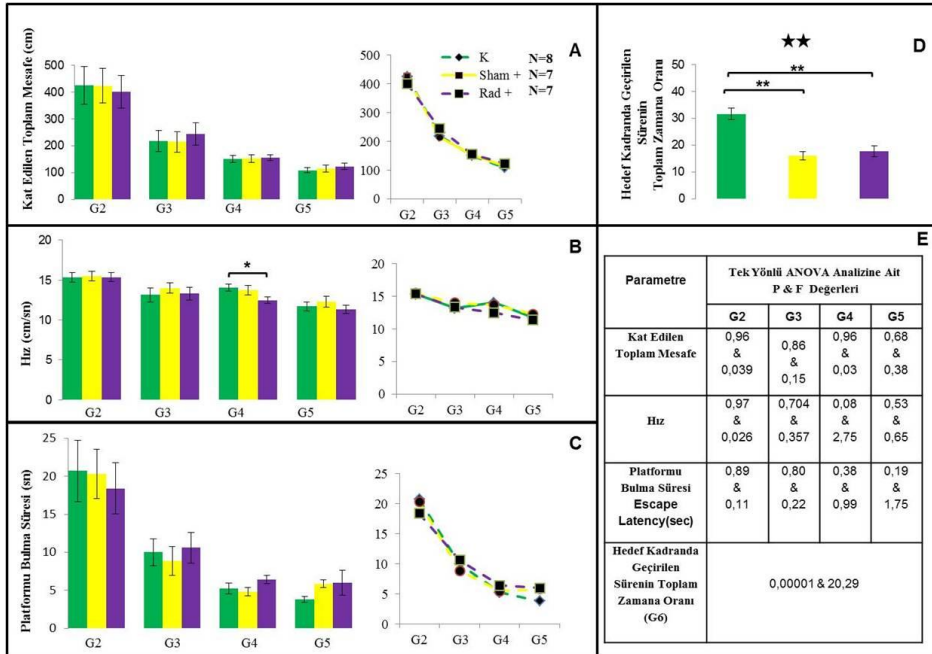
## 4.2. Öğrenme ve hafızanın değerlendirilmesi

Gizli platform deneyinde, Rad++ grubunun; yüzme mesafesi ve platformu bulma süreleri değerlerinin 2, 4 ve 5. günlerde ve yüzme hızı değerinin ise sadece 5. günde K ve Sham++ gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Hafızanın test edildiği deney gününde (6. gün), platformun bulunmadığı ve deneyin 2-5. günlerinden itibaren seçilen sabit kadran etrafında K grup farelerin Sham++ ve Rad++ gruplarına kıyasla anlamlı düzeyde daha uzun süre yüzdüğü kaydedilmiştir (Şekil 4.3). Tekli doz ve K gruplarının üçlü karşılaştırmalarında ise gizli platform deneyinde, 2-5 günler arasında üç grup arasında yüzme mesafesi, platformu bulma süreleri ve yüzme hızı değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı tespit edilmiştir. Fakat prop denemelerinde K grubu farelerin seçilen sabit kadran etrafında Sham+ ve Rad+ gruplarına kıyasla anlamlı düzeyde daha uzun süre yüzdüğü kaydedilmiştir (Şekil 4.4).

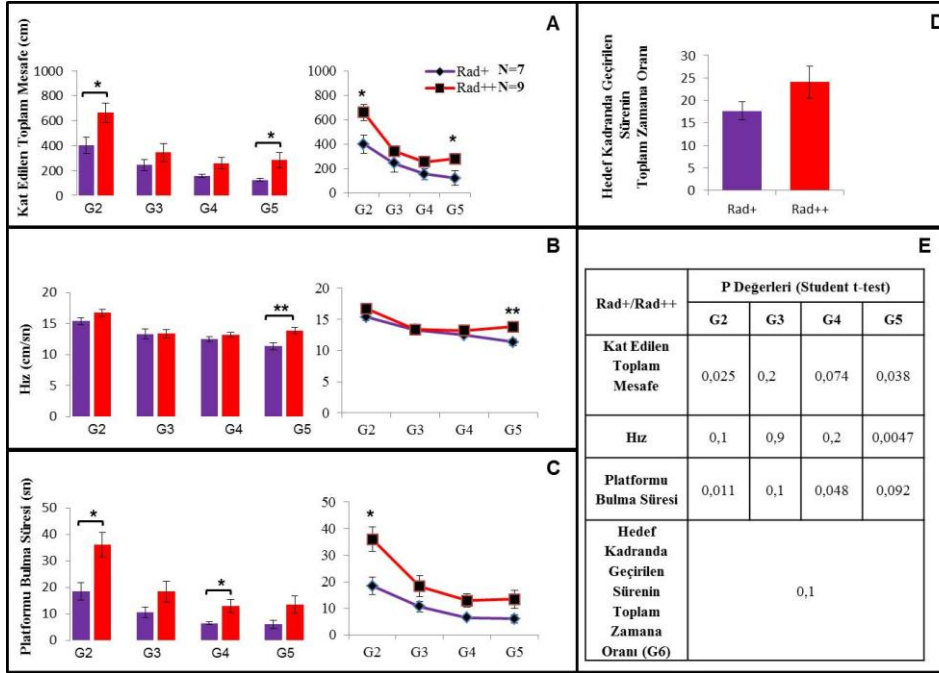
Söz konusu tüm parametreler açısından Sham+ ve Sham++ grupları arasında hiçbir anlamlı farklılık gözlenmezken Rad+ ve Rad++ gruplarının arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar bulunmuştur. Gizli platform deneylerinde Rad++ grubu farelerin yüzme mesafesi (2 ve 5. günler), platformu bulma süreleri (2 ve 4. günler) ve yüzme hızının ise sadece 5. günde Rad+ grubuna kıyasla anlamlı düzeyde daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Prop denemelerinin yapıldığı 6. günde ise seçilen sabit kadran gizli platform etrafında geçirilen yüzme süresi açısından iki grup fare arasında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir (Şekil 4.5).



**Şekil 4.3.** Kontrol, Sham ++ ve Rad ++ gruplarının MSTT performansının istatistiksel değerlendirilmesi (\*: LSD testi açısından gruplar arası istatistiksel fark  $p < 0,05$ , \*\*: LSD testi açısından gruplar arası istatistiksel fark  $p < 0,005$ , Siyah tek yıldız: ANOVA analizinde 3'lü gruplar arasında istatistiksel fark  $p < 0,05$ , G: gün)



**Şekil 4.4.** Kontrol, Sham + ve Rad + gruplarının MSTT performansının istatistiksel değerlendirilmesi (\*: LSD testi açısından gruplar arası istatistiksel fark  $p < 0,05$ , \*\*: LSD testi açısından gruplar arası istatistiksel fark  $p < 0,005$ , Siyah çift yıldız: ANOVA analizinde 3'lü gruplar arasında istatistiksel fark  $p < 0,005$ , G: gün)

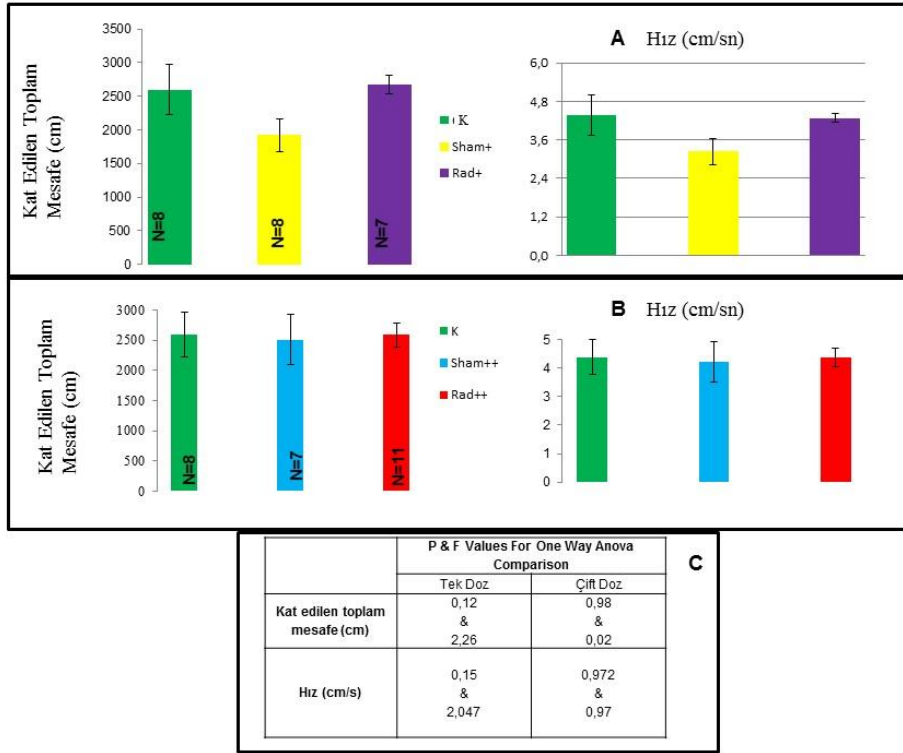


**Şekil 4.5.** Rad + ve Rad++ gruplarının MSTT performansının istatistiksel değerlendirilmesi.  
(\*: LSD testi açısından gruplar arası istatistiksel fark  $p < 0,05$ , \*\*: LSD testi açısından gruplar arası istatistiksel fark  $p < 0,005$ , G: gün)

### 4.3. Açık Alan Test Paradigması ve Lokomotor Aktivitenin Değerlendirilmesi

Tüm grupların katettikleri toplam mesafe ve hız parametreleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edilmiştir (Şekil 4.6) ( $p < 0,05$ ).

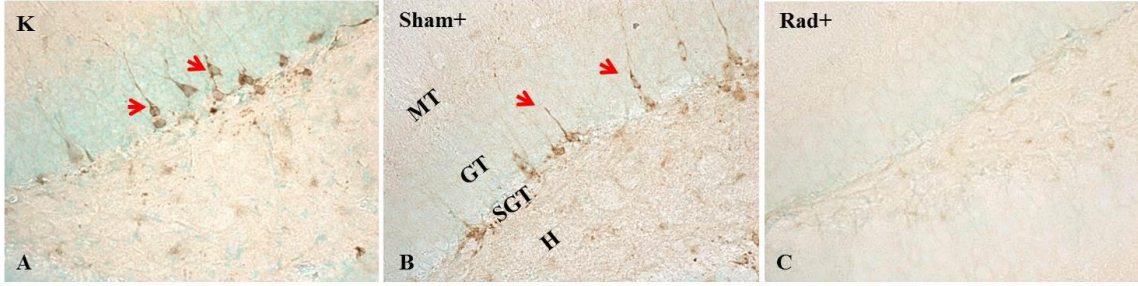




**Şekil 4.6.** Tüm grupların AAT performansının istatistiksel değerlendirilmesi. (A: Tek doz Sham ve Rad grupları ile kontrol grubunun karşılaştırılması, B: Çift doz Sham ve Rad grupları ile kontrol grubunun karşılaştırılması, C: İstatistiksel veriler).

#### 4.4. Gyrus Dentatus Tabakalarında Doublecortin Immunohistokimyasal Ekspresyonu

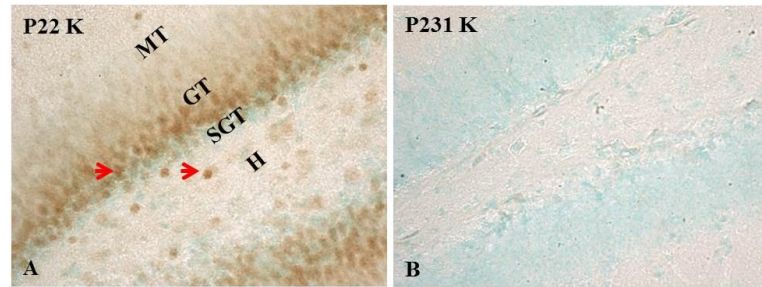
Gerçekleştirdiğimiz DCX immunohistokimyasal analizleri neticesinde, P231 K ve sham grupları GD tabakalarının belirgin bir DCX- immuno pozitif (im+) hücre popülasyonuna sahip olduğu gözlenirken (Şekil 4.7. A,B), Rad+ ve Rad++ grupları GD tabakalarında hiçbir DCX- immuno pozitif (im+) hücreye rastlanmamıştır (Şekil 4.7. C). Öte yandan K ve Sham grupları arasında belirgin bir farklılık gözlenmemiştir (Şekil 4.7 A,B).



**Şekil 4.7.** DCX İmmunohistokimyasal Ekspresyonu: **GT** (Granüler Tabaka), **H** (Hilus), **MT** (Moleküler Tabaka), **SGT** (Subgranüler Tabaka)

#### 4.5. Gyrus Dentatus Tabakalarında DNMT3a İmmunohistokimyasal Ekspresyonu

P231 beyinler üzerinde gerçekleştirdiğimiz iki DNMT3a immunohistokimya işlemi neticesinde hiçbir grup fare beyininde DNMT-3a-(im+) hücreye rastlanmamıştır. Üçüncü denememizde ise erken dönem normal kontrol beyin kesitleri (her yaş gurubu için 3'er beyin) ve P231 kesitleri bir arada kullanılarak aynı immunohistokimya protokolü tekrar edilmiştir. Bunun neticesinde P22 beyin kesitlerinde GD'unda gayet kaliteli bir şekilde DNMT-3a-(im+) hücreler gözlenirken P231 beyin kesitlerinde yine hiçbir pozitif hücreye rastlanmamıştır (Şekil 4.8. A,B).

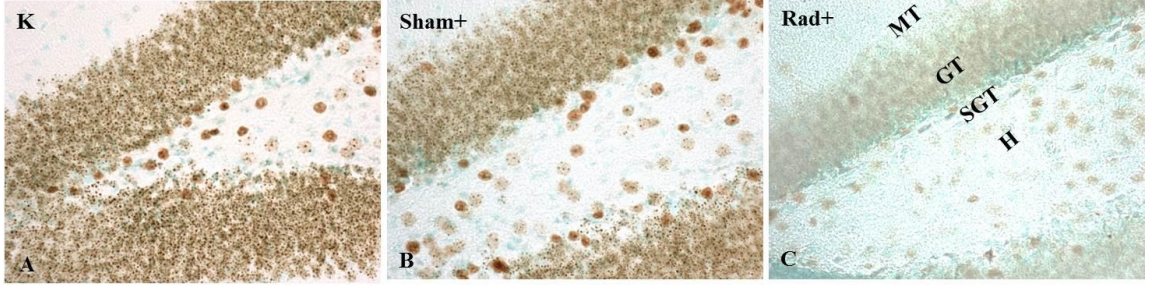


**Şekil 4.8.** DNMT3a İmmunohistokimyasal Ekspresyonu: **GT** (Granüler Tabaka), **H** (Hilus), **MT** (Moleküler Tabaka), **SGT** (Subgranüler Tabaka)

#### 4.6. Gyrus Dentatus Tabakalarında MeCP2 İmmunohistokimyasal Ekspresyonu

Gerçekleştirdiğimiz Methyl CpG binding protein 2 (MeCP2) immunohistokimyasal analizleri neticesinde, P231 K ve Sham grupları GD tabakalarının karakteristik bir MeCP2- immuno pozitif (im+) hücre paternine sahip

olduğu gözlenirken (Şekil 4.9 A,B), Rad+ ve Rad++ grupları GD tabakalarında MeCP2-immuno reaktivitesinin nerdeyse kaybolmuş olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.9 C). Öte yandan K ve Sham grupları arasında belirgin bir farklılık gözlenmemiştir (Şekil 4.9 A,B).



**Şekil 4.9.** MeCP2 İmmunohistokimyasal Ekspresyonu: GT (Granüler Tabaka), H (Hilus), MT (Moleküler Tabaka), SGT (Subgranüler Tabaka)

## 5. TARTIŞMA

Tedavisi sırasında kraniyal RT görmüş, beyin tümörü ve diğer tip malignitelerden kurtulan pediyatrik hastalarda uzun dönemde çeşitli kognitif bozuklukların sıkça ikincil hasar olarak ortaya çıktığı bilinmektedir (16, 18, 97, 98). Bu hastalarda uzun dönemde öğrenme güçlükleri, hafıza ve dikkat bozuklukları, depresyona ve madde bağımlılığına eğilim başta olmak üzere çeşitli sağlık problemleri görülmüştür. Uzun dönem hayatta kalan pediyatrik hastaların akranlarına kıyasla daha düşük ZK değerlerine sahip olmaları; öğrenme ve entelektüel fonksiyon bozukluklarının altına yatan esas yapısal unsurlardan biri olarak kabul edilmektedir (20). Ayrıca bu hastalardaki ZK seviyelerindeki düşüklük ile RT görme yaşı arasında ters bir ilişki olduğu saptanmıştır (21, 22, 23). Buna göre daha erken yaşta RT gören çocukların ZK'nın daha geç görenlere kıyasla düşük olduğu görülmüştür. Bu hastaların bir kısmının önceden öğrenilen bilgilerin hatırlanmasında sorunlar yaşadıkları gözlenmiştir. Diğer bir kısmının ise eski bilgileri hatırladıkları fakat yeni bilgilerin öğrenilmesinde zorluk yaşadıkları bildirilmiştir (24). Gelişmiş ülkelerde büyük bir sağlık problemi olarak kabul edilen pediyatrik RT sonrası uzun dönemde özellikle öğrenme ve hafızaya bağlı bozukluklar gözlenmesi, iyonize radyasyonunun beynin bu fonksiyonlarının oluşmasını sağlayan esas organ olan hipokampusun çalışmasında bozukluklara yol açtığını işaret etmektedir. Bu nedenle geçtiğimiz birkaç onyıllık süreçte fare ve sıçanlar başta olmak üzere deney hayvanları kullanılarak, KR maruziyetinin hipokampus çalışması üzerindeki etkileri hem nörobiyolojik hem de davranışsal düzeylerde araştırılmaktadır (25, 26). Bu araştırmalarda KR maruziyeti sonrası HBÖ ve HBH'yı test etmek amacıyla bu tez çalışmasında da aynı amaçla uygulanan MSTT ve benzer davranışsal deney modelleri kullanılmıştır. Bu çalışmada P14 ve P14+P21'lerde 8Gy dozunda uyguladığımız KR'nun uzun dönem sonra HBÖ ve HBH kabiliyetlerinde bir değişime neden olup olmadığını test edebilmek amacıyla MSTT paradigması kullanılmıştır. Fakat bu test farelerin lokomotor yeteneklerini kullanmaları temeline bağlı gerçekleşmesi sebebiyle, uygulama öncesi gruplar arasında motor aktivite açısından bir farklılık olup olmadığını anlayabilmek için tüm fareler ilk önce AAT'ne tabi tutulmuştur.

Morris su tankı testi'ne başlamadan önce gerçekleştirilen AAT'nde gruplar arasında lokomotor aktivite açısından bir fark gözlenmemiştir. Ayrıca AAT'nden hemen sonra MSTT'nin 1. gününde gerçekleştirilen görülebilir platform denemelerinde gruplar arasında kat edilen toplam mesafe, hız ve platform bulma süresi parametreleri bakımından da hiçbir farklılık gözlenmemiştir. Görülebilir platform testinde gruplar arasında farklılık olmaması ATT'nde de gösterilmiş olan grupların lokomotor aktivite açısından birbirine denk olduğu bulgusunu desteklemiştir. Daha önce yapılan benzer bir araştırmada 6 Gy dozunda KR verilen P9'lük C57BL6/J farelerin motor aktivitelerinin yaklaşık 5 ay sonra AAT'inde kontrol grubu farelere kıyasla anlamlı düzeyde bozulduğu gösterilmiştir (99). Aynı araştırma grubu bir başka çalışmada, P14'lük farelere uyguladıkları 8 Gy dozunda KR maruziyetinin uzun dönem sonra motor aktivite yeteneğinin kontrol grubuna kıyasla değişmediğini rapor etmişlerdir (24). Bahsedilen ikinci çalışmada KR dozunu arttırmalarına rağmen motor aktivitede değişim olmamasını, P9 ve P14'lük beyinlerin gelişimsel açıdan farklılıklar taşımasıyla ilişkilendirmiştir (96). Buna göre P9'de fare beyninin halen hızla gelişmekte olduğu P14'e gelindiğinde ise temel gelişimin P9'deki beyine kıyasla büyük ölçüde tamamlandığı ve bu nedenle P14 fare beyninin daha yüksek dozda bile olsa KR'na daha dirençli olduğu şeklinde yorumlanmıştır (24). Ayrıca klinik bulgular göz önünde bulundurulduğunda, daha erken çocukluk yaşlarında tedavi amaçlı uygulanan KR'nun geç yaşlara kıyasla daha geniş çapta kusurlara yol açtığı görülmektedir (19). Bu nedenle klinikte 4 yaşında daha genç olan çocuklara çok nadiren KR uygulandığı bilinmektedir (91). Gruplarımızın motor aktivite yeteneklerinin denk olması benzer literatürle örtüşmekle birlikte MSTT'nde HBÖ ve HBH'nin test edilebilirliği açısından ön şart olarak kabul edilmiştir. Eğer ATT ve MSTT'nin ilk gününde gruplar arasında motor aktivite açısından bir farklılık gözlenmiş olsaydı farelerin motor aktivitelerinin kullanılmasına bağlı olarak gerçekleştirilen MSTT'nin 2-5 ve 6. günlerinde HBÖ ve HBH yeteneklerinin karşılaştırılmasının güvenilirliğinin azalacağı düşünülmektedir.

Morris su tankı testi'nin 2-5. günleri arasında ise ilk günde farelerin maruz bırakıldığı görülebilir platformun gizlenmesi ile farelerin göremedikleri fakat su seviyesinin altına konumlandırılmış haldeki platformunu bulabilmelerine bağlı olarak öğrenme kabiliyetlerinin ölçülmesi temeline dayandırılmıştır. Gizli platform deneylerinde Rad+, Sham+ ve K grup fareler arasında yapılan üçlü karşılaştırmalarda

kat edilen toplam mesafe, hız ve platform bulma süresi parametreleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. Söz konusu parametreler HBÖ ya da mekansal öğrenme kabiliyetini işaret etmektedir. Daha öncede bahsedildiği üzere KR'nun kısa veya uzun dönemdeki etkisi maruziyetin hangi gelişimsel yaşta uygulandığı ve dozu değişkenlerine bağlı olarak dinamiklik göstermektedir. Literatürde farklı gelişimsel dönemlerde ve dozlarda KR denemesi yapan çalışmalar mevcut olmakla birlikte çalışmamıza denk olarak gösterilebilecek birkaç araştırma bulunmaktadır. Örneğin: Karlsson ve ark. (24) 8 Gy dozda KR'a maruz bıraktıkları P14'lük C57BL6/J farelerde uygulamadan yaklaşık 5 ay sonra Trace Fear Conditioning (TFC) testini kullanarak uzaysal öğrenme yeteneğinde sham kontrollere kıyasla bir farklılık olmadığını göstermişlerdir. Fakat aynı çalışmada mekansal öğrenme ve ek olarak tekrar öğrenme kabiliyetleri ticari olarak elde edilen IntelliCage paradigmasında test edildiğinde bu iki kognitif yetinin de KR'ndan olumsuz şekilde etkilendiği gösterilmiştir (96). Yabancı literatürde "Reversal Learning" olarak bilinen tekrar öğrenme kabiliyeti özetle rodentlerin daha önceden öğrendikleri bilgileri kullanarak sunulan farklı durumlara gösterdikleri adaptasyon olarak tanımlanmaktadır (79, 100). IntelliCage veya Morris gibi paradigmalarda, rodentlere testte ilk başta öğretilen ödevin yerinin değiştirilerek oluşan yeni duruma gösterdikleri hızlı öğrenme yetisi değerlendirilebilmektedir (24, 100, 101) Bir başka araştırma ise aynı doz ve yaşta uygulanan KR maruziyetinden 1 yıl sonra IntelliCage sisteminde mekansal öğrenme kabiliyeti bakımından radyasyon ve sham grupları arasında bir farklılık olmadığı bildirilmiştir (102). Fakat bu çalışmada mekansal öğrenmenin yanı sıra tekrar öğrenme kabiliyetinde radyasyon grubu farelerde sham grubuna kıyasla gerileme olduğu göstermişlerdir (102). Diğer bir çalışmada ise P9'lük C57BL6 farelere 6 Gy dozunda KR uyguladıktan iki ay sonra IntelliCage sistemi kullanılarak mekansal öğrenmenin kontrol grubuna kıyasla gerilediği gösterilmiştir (99). Çalışmamızda P14 farelere uygulanan 8 Gy dozda KR maruziyetinden 7 ay sonra MSTT ile mekansal öğrenmenin kontrol gruplarına kıyasla değişmediği gösterilmiştir. Yukarıdaki söz edilen çalışmalarda ise mekansal öğrenme parametrelerinin aynı hayvanlar üzerinde değişik davranışsal testlerle farklı sonuçlar verebileceğini göstermektedir. Çalışmamızın deneysel tasarımı sürecinde literatürde son yıllarda MSTT gibi klasik davranış testlerine alternatif olarak kullanılmaya başlanan IntelliCage paradigmasının kullanılması

düşünülmüş, fakat ticari olarak elde edilebilen bu sistemin çok pahalı olması sebebiyle laboratuvarımıza dahil edilememiştir. Buna rağmen, bu çalışmalarda KR maruziyetinin mekansal öğrenme üzerindeki uzun dönem sonraki etkileri araştırmamızın bulgularıyla kısmen örtüşmektedir.

Literatürde çalışmamızda KR modeli için tasarladığımız aynı gelişimsel yaş ve doza uygun radyasyon uyguladıktan sonra MSTT'nin 2-5. günleri arasında test edilen mekansal öğrenmeyi değerlendiren başka bir çalışma görülmemiştir. Fakat bizimkinden farklı zaman ve dozda KR uygulaması ve ertesinde aynı paradigma ile öğrenme kabiliyetini test eden çalışmalar mevcuttur. Örneğin, Zhang ve ark. (103) bir aylık Sprague Dawley sıçanlara 20 Gy dozunda KR uyguladıktan iki ay sonra MSTT ile radyasyon grubu farelerin kontrollere kıyasla mekansal öğrenme ve hafıza kabiliyetlerinin gerilemiş olduğunu bildirmişlerdir. Dong ve ark. (104) ise çalışmalarında P21'lük farelere 10Gy dozunda KR uygulamış ve 6 hafta sonra MSTT ile kontrol grubuna kıyasla mekansal öğrenmede bir farklılık gözlememişlerdir. Bu çalışmada KR maruziyetinden sonra mekansal öğrenmenin etkilenmemiş olması bizim sonuçlarımızla örtüşürken, maruziyet yaşının daha geç ve dozun daha yüksek olması sebebiyle direkt olarak sonuçlarımızla karşılaştırılabilir özellikte görülmemiştir.

Mekansal hafızanın test edildiği 6. günündeki prop denemelerin de ise, daha önce gizli platformun olduğu kadran etrafında yüzme süresinin geçirilen tüm süreye oranı açısından Sham+ ve Rad+ fareler arasında bir farklılık gözlenmezken, Sham++ ve Rad++ farelerin K grubuna kıyasla anlamlı düzeyde daha az süre geçirdikleri gözlenmiştir. Bu sonuç, kontrol grubu farelerle kıyaslandığında daha önce öğrenilen bilgilerin hatırlanmasını yansıtan HBH kabiliyetinin sham+ ve rad+ gruplarında benzer düzeyde azaldığını işaret etmektedir. Sonuç olarak, P14'de 8 Gy dozundaki KR maruziyeti uzun dönem sonra Sham+ ve K grubuyla kıyaslandığında mekansal öğrenmenin değişmediği, fakat hafızanın bu erken gelişimsel dönemde uygulanan hem anestezi hem de anestezi+KR maruziyetinden olumsuz etkilendiği görülmektedir.

Çalışmamızda ayrıca P14 ve devamında P21'de 8 Gy dozunda iki kez radyasyon verdiğimiz Rad++ ve onlara denk anestezik kontrol grubu olan Sham++ grupları da K grubuyla beraber yukarıdaki söz edilen tüm testlere tabi tutulmuştur. AAT'ndeki tek doz grupların sonuçlarıyla örtüşür nitelikte; Rad++, Sham++ ve K grupları arasında da hiçbir farklılık gözlenmemiştir. Ayrıca Sham+/Sham++ ya da Rad+/Rad++ grupları

arasında aynı parametreler açısından yapılan iki karşılaştırmalarda da anlamlı hiçbir farklılık gözlenmemiştir. Literatür incelendiğinde çalışmamızla karşılaştırabilecek erken gelişimsel dönemde tekrarlayan dozlar şeklinde KR maruziyeti çalışması bulunmamaktadır. AAT'nin hemen ardında MSTT'ine tabi tutulan çift doz grupları mekansal öğrenme ve hafıza açısından tek doz gruplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar içerdiği gözlenmiştir. Yukarıda bahsedildiği üzere MSTT'nin 2-5. günleri arasında rad+, sham+ ve K+ grupları arasında yüzme mesafesi, kaçış latansı ve yüzme hızı parametreleri açısından anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. Rad++ grubu farelerin ise ilgili parametreler açısından deney günlerinin yarısı kadarında diğer tüm gruplara kıyasla (K, Sham+, Sham++, Rad++) istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha zayıf performans gösterdiği görülmüştür. Literatürde henüz süttten kesilmemiş rodentlere yani P28'den önceki gelişimsel dönemde birden fazla kez KR uygulayan ve uzun dönem sonra kognitif fonksiyonları davranışsal olarak test eden başka bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışma literatürde gelişimsel dönemdeki tekrarlayan KR maruziyetinin uzun dönemdeki doza bağımlı öğrenme ve hafıza üzerindeki etkisini gösteren ilk çalışma özelliği taşımaktadır. Diğer yandan, hafızanın test edildiği MSTT'nin 6. gününde, Rad++ ve Sham++ grupları arasında anlamlı bir farklılık gözlenmezken her iki grubunun kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde daha düşük performans gösterdiği gözlenmiştir. Bu bulgu sham+ ve rad+ gruplarındaki bulgularla örtüşmekle birlikte bu test açısından Sham+, Rad+, Sham++ ve Rad++ grupları arasında da herhangi bir anlamlı farklılık gözlenmemiştir. Tüm bu sonuçlar erken dönemdeki gerek tek gerekse çift doz anestezi ya da anestezi + KR maruziyetinin mekansal hafızayı, hiçbir uygulamaya sokulmayan normal kontrol farelerle (K) kıyaslandığında geriletebildiğine işaret etmektedir. Deney modelimizin diğer bir özgün yanı ise radyasyon gruplarıyla kıyaslamak üzere yalnızca anestezik kontrollerin değil ek olarak hiçbir uygulamaya alınmayan normal kontrol grubunun da kullanılmasıdır. Literatür incelendiğinde hiçbir çalışmada anestezik kontrol dışında normal kontrol gruplarının deney modellerine dahil edilmediği görülmektedir. Deney modelimizi tasarlarken K grubu oluşturmamızın çeşitli nedenleri olmuştur. Esas nedenimiz ilk uygulama yaşımlar olan P14'de fare beyninin halen gelişmekte olduğu ve yalnızca KR'nun değil anestezi içeriğindeki ketamin ve ksilazin maddelerinin de gelişmekte olan beyindeki nörobiyolojik işleyişi üzerinde nörotoksik etki oluşturabileceği ihtimali olmuştur. Yakın



geçmiş literatürde, deneysel çalışmalarda genel anestezi olarak kullanılan kimyasal ajanların EHN'in nörobiyolojik işleyişi üzerindeki etkilerini in-vivo ve in-vitro olarak inceleyen çalışmaların varlığı gözlenmektedir (105, 106, 107, 108, 109). Fakat bu çalışmalarda kullanılan anestezi madde, dozu ve uygulanan zaman aralığı geniş bir spektrumda değişkenlik gösterdiğinden elde edilen sonuçlar da oldukça farklılık göstermektedir. Bu nedenle tam olarak hangi anestezi maddelerin hangi yaşta, dozda ve ne kadar sonra hipokampal nörogenez üzerine etki ettiği tam olarak açıklık kazanmamıştır. Erasso ve ark. (110) isofluran ve propofol gibi deneysel çalışmalarda anestezi ajan olarak kullanılan maddelerin genç rodentlerde postnatal hipokampal nörogenezin hücrel farklılaşma basamaklarında bozukluklara yol açtığını göstermişlerdir. İkincil neden ise, her iki uygulama yaşında da farelerin halen anneleriyle birlikte laktasyon sürecinde olmasıdır. C57BL6 farelerde elde ettiğimiz deneysel tecrübeler laktasyon sürecindeki annelerin fiziki çevresel uyarılara karşı oldukça hassas olduklarını göstermiştir. Deney modelimizde her bir KR maruziyeti gününde, hem radyasyon hem de Sham gruplarına ait fareler annelerinin kafesinden alınarak ME.Ü. Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarı'ndan Mersin Devlet Hastanesi'ne kadar binek bir araçla transfer edilmiş ve işlemler bittikten aynı şekilde annelerinin kafeslerine bırakılmıştır. Bu işlemler sonrasında gözle görülür bir süttün kesilme veya kanibalizm benzeri bir vakaya rastlanmamasına rağmen annelerin strese girmiş oldukları kafes içerisindeki motor aktivitelerinin artışıyla gözlenmiştir. Fakat anneler üzerinde gözlenen bu stresin çalışmamıza ne derece yansıdığı bilinmemektedir.

Yukarıda parçalar halinde verilen MSTT'ne ait bulgular, kraniyel x-ışını radyasyonu maruziyetinin P14'de 8 Gy dozunda uygulanmasının uzun dönem sonra erişkin farelerde HBÖ'de bir değişiklik oluşturmazken hafızayı etkilediği, P14 ve P21'de 8Gy'lik iki parça şeklinde uygulandığında ise her iki kognitif kabiliyette de geriliğe yol açtığını göstermektedir. Erken dönem anestezi maruziyetinin ise erişkin beyindeki HBÖ kabiliyetini değiştirmezken, HBH kabiliyetini istatistiksel olarak anlamlı düzeyde etkilemesi çalışmamızın tasarısında beklenmeyen bir sonuç olarak karşımıza çıkmıştır. Benzer literatür incelendiğinde; radyasyon gruplarıyla karşılaştırmak üzere sadece anestezi kontroller kullanılmıştır. Bunun yanında anestezi kontrollerle karşılaştırmak amacıyla deney paradigmalarında normal kontrol gruplarının tasarlanmadığı görülmektedir. Bu nedenle kendi çalışmamızın bulgularıyla kıyaslamak

için normal ve anestezi kontrollerin radyasyon gruplarıyla karşılaştırıldığı bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Yukarıda etraflıca açıklandığı üzere davranışsal testler sonucunda elde ettiğimiz öğrenme ve hafıza değişimlerinin altında yatan hüresel düzeydeki EHN ve DNA metilasyon dinamiklerini anlayabilmek üzere P231'e ait beyinler nöral ve DNA metilasyon işaretleyicileri kullanılarak immunohistokimya işlemine alınmıştır. Farklı gruplar arasındaki hüresel düzeydeki fenotipik EHN durumunu karşılaştırmak üzere GD'un farklı tabakalarındaki DCX immuno pozitif (im+) hücreler karşılaştırılmıştır.

İmmatür nöron öncül hücrelerini ya da olgunlaşmakta olan nöroblastları gözlemek için kullanılan DCX işaretleyicisi EHN seviyesinin tespiti için en yaygın olarak kullanılan belirteçlerden biri olarak bilinmektedir. Gerçekleştirdiğimiz DCX immunohistokimyasal analizleri neticesinde, P231 normal ve anestezi kontrol grupları GD'larının belirgin bir paternde ve sayıda DCX - (im+) immatür nöron popülasyonuna sahip olduğu gözlenirken, Rad+ ve Rad++ gruplarında neredeyse hiç DCX - (im+) hücreye rastlanmamıştır. Öte yandan DCX - (im+) hücre paterni ve sayısı açısından normal ve anestezi kontrol grupları arasında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. P231 DG'larında DCX immunohistokimyasal analizine temel alındığında, DCX - (im+) hücrelerin kontrol gruplarına (K, Sham+ ve Sham++) kıyasla radyasyon gruplarında azalması ya da hiç rastlanmaması, erken postnatal dönemdeki KR maruziyetinin erişkin beyinde EHN'in nörobiyolojik değişim hızını belirgin düzeyde yavaşlatarak neredeyse durma noktasına geldiği göstermiştir. Radyasyon bağımlı EHN'in azalması ya da durması daha önceki benzer çalışmalarda da gösterilmiştir. Boström ve ark. (2013) P14'lük farelere 8 Gy dozda KR uyguladıktan 1 ve 7 hafta ve ayrıca 1 yıl sonra GD'daki DCX - (im+) hücreleri değerlendirmişlerdir. GD'da kontrol grubuna kıyasla DCX-im (+) hücre sayısının 1 hafta sonra % 77, 7 hafta sonra % 86 ve 1 yıl sonra ise % 98 oranında azaldığı tespit edilmiştir (25). Kalm ve ark. (102) ise P14'lük farelere 8Gy dozda uyguladıkları KR'dan 1 yıl sonra GD'da DCX - (im+) hücre sayısının % 99 oranında azaldığını göstermişlerdir. Bu çalışmada ayrıca KR maruziyetinden 1 yıl sonra IntelliCage sistemi kullanılarak mekansal öğrenmenin kontrol grubuna kıyasla değişmediği fakat tekrar öğrenmenin bozulduğu da gösterilmiştir. Söz konusu çalışma P14'de 8Gy KR uygulamasından sonra mekansal öğrenme değişmezken GD'da DCX işaretlemesiyle EHN'in nörobiyolojik olarak neredeyse durma noktasına gelmesi

çalışmamızın sonuçlarıyla oldukça örtüşmektedir. Bir başka çalışmada ise 8 haftalık C57BL6 farelere 1Gy ve 10Gy dozda KR verildikten 1, 2, 8, 30 ve 90 günler sonra DCX - (im+) hücre sayısı kontrol grubuna kıyasla değerlendirilmiştir (111). DCX - (im+) hücre sayısının 10Gy doz KR verilen hayvanlarda kontrollere kıyasla söz konusu zamanlarda artan bir hızda azaldığını göstermişlerdir. DCX - (im+) hücre sayısı 1Gy doz uygulamasından sonra ise 1, 2 ve 8. günlerde kontrollere kıyasla anlamlı düzeyde azalmış olduğu tespit edilirken 30 ve 90. gün radyasyon grubu ve kontrol grupları arasında anlamlı bir farklılık gözlemlenmemişlerdir (111).

Oluşturduğumuz deney modeli sonucunda bu noktaya kadar özetle; erken postnatal dönemden erişkinliğe kadar taşınan KR maruziyetine bağlı bozulmuş durumdaki HBÖ ve HBH ve buna paralel hücresel düzeyde nörobiyolojik işleyişin sekteye uğramış olduğu gösterilen bir hipokampus fenotipi bulunmaktadır. Davranışsal testlerle HBÖ ve HBH kabiliyetlerinde bozuklukların yansıması olarak hücresel düzeyde EHN'in DCX - (im+) hücre sayısı göz önünde bulundurularak yavaşlamış olması çalışmamız açısından şaşırtıcı ve literatür açısından da yeni bir bulgu değildir. Aksine, yukarıda tartışıldığı üzere bu sonuçlar literatürdeki benzer çalışmalarla örtüşmektedir. DCX işaretlemesi, KR maruziyetinin EHN üzerindeki olumsuz etkisini göstermemizi sağlayarak çalışmanın bir sonraki aşaması olan epigenetiksel değerlendirme için temel oluşturmuştur. Bu sonuçları elde ettikten sonra GD'da gerçekleşen EHN döngüsündeki hücrelerin immunohistokimyasal DNA metilasyon karakterleri incelenmeye çalışılmıştır. İlk etapta bir DNMT enzimi olan DNMT-3a işaretleyicisi kullanılmıştır. P231 beyinler üzerinde gerçekleştirdiğimiz ilk DNMT-3a immunohistokimya işlemi neticesinde hipokampusda hiçbir DNMT-3a-(im+) hücreye rastlanmamıştır. Literatürde de en sık kullanılan ve performansından emin olduğumuz ticari olarak elde ettiğimiz DNMT-3a primer antikoruyla ikinci denememizde de aynı sonucu aldıktan sonra; acaba elde ettiğimiz sonuçlar teknik bir aksaklıktan mı yoksa gerçekten DNMT-3a proteininin P231 beyinde eksprese olmamasından mı kaynaklandığı ikilemi ortaya çıkmıştır. Bu soruyu cevaplamak için elimizdeki diğer çalışmalardan elde edilmiş farklı postnatal yaşlardaki (P15 ve P22) beyin kesitleri (her yaş grubu için 3'er beyin) ve P231 kesitleri bir arada kullanılarak aynı immunohistokimya protokolü tekrar edilmiştir. Bunun neticesinde şaşırtıcı olarak P15 ve P22 beyin kesitlerinde GD'da dahil olmak üzere birçok beyin bölgesinde gayet

kaliteli bir şekilde DNMT-3a-(im+) hücreler gözlenirken P231 beyin kesitlerinde yine hiçbir pozitif hücreye rastlanmamıştır. Üçüncü deneme neticesinde P231 beyinlerinde hiçbir DNMT-3a-(im+) hücrenin gözlenmemesi teknik bir hatadan dolayı değil, DNMT-3a proteininin ekspresyonunun gerçekleşmediğinden dolayı olduğu tespit edilmiştir. Literatür incelendiğinde DNMT-3a ekspresyonunun P231 beyinlere denk gelen yaklaşık 7,7 aylık fare beyinlerinde incelenmemiş olduğu gözlenmiştir. Fakat DNA metilasyonu ile karakterize çeşitli gen ya da protein ekspresyonlarının fetal, erken postnatal ve geriye kalan tüm yaşam sürecinde sabit olmadığı, aksine zamansal ve dokuya hatta aynı doku içerisindeki hücre gruplarının içinde bulunduğu biyolojik duruma özel olarak dinamik bir biçimde değiştiği görülmektedir. Bu sonuçların üzerine bir başka temel DNA metilasyon işaretleyici olan Methyl CpG binding protein 2 (MeCP2) proteininin ekspresyonu immunohistokimyasal olarak incelenmiştir. Her iki radyasyon grubu GD'unda da sham ve kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında MeCP2 immunohistokimyasal ekspresyonunun belirgin bir biçimde azaldığı gözlenirken böyle bir fark K ve sham grupları arasında gözlenmemiştir. Literatürde şuana kadar iyonize radyasyona maruz kalmış beyin dokusunda DNA metilasyon faktörlerinin incelendiği başka bir çalışma bulunmamaktadır. Bu sebeple çalışmamız iyonize radyasyon maruziyetinin beyinde hücresele DNA metilasyon dinamikleri üzerine etkisini inceleyen ilk araştırma özelliğini taşımaktadır. Yalnızca bir araştırmada, 50 günlük C57BL6 farelere kafatası hariç tüm vücut kurşundan bir koruyucuyla örtülerek 0,5Gy dozunda KR verilmiş ve daha sonra deri ve dalak dokularında 6, 96 saat ve 14 gün sonra global DNA metilasyonunda ve MeCP2 protein ekspresyonunda değişimler gözlenmiştir. Fakat bu çalışmada KR maruziyetinin beyin dokusu üzerindeki etkileri incelenmemiştir (112).

DNA metilasyon ve demetilasyon döngüsünün hücresele gen ekspresyonu üzerindeki global kontrol edici etkileri bu tezin genel bilgiler kısmında ayrıntılı bir şekilde işlenmiştir (2.6. DNA Metilasyonu). Bu döngü DNMT'ler ile metile olmuş DNA bölgelerinin (5mC) heterokromatin haline dönüşerek gen ekspresyonunun baskılandığı, Tet enzimleriyle hidroksilenerek 5hmC'ye dönüştüğünde ise heterokromatin haldeki DNA bölgesinin tekrar açılarak ökromatine dönüştüğü ve ekspresyonu baskılanmış genlerin tekrar aktive olmaları durumuyla özetlenebilir (85, 86, 87). DNA'nın üç boyutlu yapısı sürekli olarak değiştirerek hücresele gen ekspresyon

sistemi üzerinde kontrol sağlayan bu döngüye ek olarak metile olmuş DNA'ya seçici olarak bağlanabilen ve ilgili DNA bölgesinin daha sıkı paketlenmesini sağlayan ve böylece gen ekspresyonunun baskılanmasına yardımcı olan DNA metil bağlayıcı bir protein ailesi bulunmaktadır. Bu protein ailesinin fonksiyonları en temel DNA metilasyon faktörlerinden biri olarak kabul edilmekle birlikte ailenin ilk keşfedilen üyesinin MeCP2 proteini olduğu bilinmektedir (113). Beyin dokusunda verimli şekilde bulunan MeCP2 proteininin Brain Derived Neurotrophic Factor gibi nöral farklılaşmada kilit öneme sahip genlerin ekspresyonunu spesifik olarak düzenlediği bilinmektedir. Bu proteinin gelişim sırasında dendritik morfolojinin gelişmesi ve sinaps oluşumu gibi önemli sinirsel olayların düzenlenmesinde kritik öneme sahip olduğu gösterilmiştir (114, 115). Ayrıca insanlarda gözlenen en ağır gelişimsel sendromlarından biri olarak kabul edilen Rett Sendromu'nun MeCP2 genindeki mutasyonlardan kaynaklandığı gösterilmiştir (116). İnsanlardaki Rett sendromunda gözlenen gelişimsel kusurlar ayrıca MeCP2 geninin manipüle edilmesiyle oluşturulan transgenik fare modelinde de teyit edilmiştir (116). Yukarıda özetlendiği üzere MeCP2 proteinin, kromatin materyalindeki gen ekspresyon sistemi üzerindeki düzenleyici etkisiyle nöral gelişim, farklılaşma ve olgunlaşma gibi birçok nörobiyolojik olayda kilit öneme sahip olduğu aşikârdır. Çalışmamızda postnatal beyin gelişimi için kritik bir yaş olan P14'de uygulanan KR maruziyetinden çok uzun dönem sonra mekansal öğrenme ve hafıza gibi kognitif fonksiyonların bozulduğu ve EHN'in hücresel düzeyde gerilemiş olduğu aynı GD tabakalarında MeCP2 protein ekspresyonunun kontrol gruplarına göre azalmış olması oldukça çarpıcı bir bulgu olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu çalışma pediatrik kraniyal tümörlerin tedavisi amacıyla kullanılan kraniyal RT'nin bu hastaların üzerinde yaşamlarının geç evrelerine kadar taşınabilen ve geri döndürülemeyecek derecede kognitif fonksiyonlarda oluşturduğu hasarın oluş mekanizmasını aydınlatılabilmek için gerçekleştirilmiştir. Söz konusu klinik olguya ait kognitif düzeydeki hasarı deney fareleri kullanarak hem davranışsal hem de hücresel boyutta literatürle de büyük ölçüde örtüşür nitelikte modellediğimizi düşünmekteyiz. Literatürdeki mevcut bilgilere ek olarak gösterdiğimiz beyin gelişimi sırasındaki KR maruziyetinin uzun dönem sonra söz konusu kognitif fonksiyonların altında yatan EHN dönüşümündeki hücrelerin epigenetik kodu değiştirdiği bilgisinin bu nörobiyolojik olgunun anlaşılabilmesine daha derin bir bakış açısı kazandırdığını düşünmekteyiz.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda radyasyona bağlı ortaya çıkan epigenetik etki tek bir epigenetik parametre kullanılarak gösterilmiştir. Fakat temel DNA metilasyon göstergelerinden biri olan MeCP2'daki değişim kendi başına EHN'nin DNA metilasyon karakterinin değişebileceğinin göstergesidir. Fakat KR maruziyetinin EHN üzerindeki etkileri hücrel DNA metilasyon ve demetilasyon döngüsünün; birincil DNA metilasyon için 5mC ve bunu katalizleyen DNMT-3a'nın yanı sıra DNMT-3b ve DNMT-1a, aktif demetilasyon için 5hmC ve ilgili katalizör Tet1/2/3 enzimleri gibi diğer temel epigenetik faktörler açısından da immunohistokimyasal olarak değerlendirilmesi gerekmektedir. Yukarıda bahsedildiği gibi birçok temel işaretleyici kullanılarak KR maruziyetinin EHN üzerindeki olumsuz etkisinin bir sinyal yolu haritası şeklinde çıkarılmasının konunun daha derin anlaşılması için bir alternatif araştırma konusu olabileceği düşünülmektedir. Örneğin aynı veya farklı dozlarda KR maruziyetinin BrdU gibi DNA boyalarının yardımıyla GD hücrelerindeki kısa akut periyottaki (örneğin; maruziyetten 6, 12, 24, 48 saat veya 1 hafta sonra vb.) zamana bağlı etkisi takip edilebilir. Böylece KR maruziyetinin erken safhada zamana bağlı etkisinin haritası çıkarılabilir. Diğer yandan çalışmamızda kognitif fonksiyonların değerlendirilmesi ve EHN durumu KR maruziyetinden 7 ay gibi oldukça uzun bir süre sonra fareler erişkinliğe ulaştığında değerlendirilmiştir. Kısa akut dönemdeki etkinin anlaşılmasına ek olarak benzer sorular; 7 aydan daha kısa süredeki, örneğin farelerin 3 ay gibi daha orta bir dönem sayılabilecek yaşamsal evrelerdeki (puberte veya ergenlik dönemi başlangıcı, ortası ve sonu vb.) durumu açısından cevaplanabilir.

İlerleyen zamanlarda bu konuyla ilgili bizim veya diğer araştırma gruplarınca birçok değerli ana hipotezler üretilip bu hipotezlerle ilgili bilimsel soruların test edileceği öngörülmektedir. Örneğin yukarıdaki araştırma alternatifleri KR bağımlı epigenetik dozun zamana bağlı değişimi ile ilgili soruları içermektedir. Öte yandan Şekil 2,1'de EHN'in dinamiklerini oluşturan yenidoğan kök hücrelerden elektrofizyolojik olarak aktif nöronlara doğru farklılaşan ve olgunlaşan ara basamak nöral hücre fenotipleri özetlenmiştir. Örneğin bu hücre alt gruplarından birisi seçilerek (nöral kök hücreler, nöral öncül hücreler, nöroblastlar vb.) ilgili hücre fenotipiyle karakterize ve epigenetik işaretleyicileriyle çoklu immünfloresan olarak incelenebilir.

Böyle belirli bir hücre fenotipinin KR maruziyetine tepki olarak değişime uğrarken DNA metilasyon karakterinin değişip değişmediği ve eğer değiştiyse ne dinamikte farklılaştığı anlaşılabilir. Bahsedilen alternatif çalışma stratejilerinin uygulanması durumunda ilk etapta EHN işleyişindeki DNA metilasyon karakterinin; KR maruziyetinin gelişimsel yaşa, uygulandığı doz veya dozların oranına, uygulama sonrası zamana bağlı değişimine bağlı olarak ya da spesifik bir nöral fenotip üzerindeki etkileri bağlamında birçok temel ve önemli soru işaretlerinin cevaplanması mümkün olabilir.

Bu konuyla ilgili birçok sorunun farklı araştırma gruplarınca da teyit edilerek cevaplanması gerektiği düşünülmektedir. Radyasyon bağımlı EHN fenotipindeki ayrıntılı DNA metilasyon davranışı haritasının çıkarılmasından sonra ise bir ileri aşama olan gen düzeyinde daha spesifik çalışmalar tasarlanabilir. Örneğin KR maruziyeti sonrası deney hayvanlarının hipokampus dokusundan flow sitometri gibi bir yöntemle hedef hücre fenotipiyle karakterize antikolar kullanılarak spesifik hücre tipleri ayrıştırılabilir (örneğin; GD'daki immatür nöronlar). Ayrıştırılan spesifik tip hücrelerde gen ve protein düzeyinde birçok analiz gerçekleştirilebilir. Mesela nöroblast hücrelerinin ayrıştırıldığı düşünüldüğünde, gen-spesifik metilasyon yöntemleri kullanılarak bu hücrelerin farklılaşması için kilit öneme sahip genlerin DNA metilasyon seviyelerini öğrenmek mümkün olabilir. Böylece yapılan ilk çalışmalarda KR maruziyetinden en çok hangi hücre tiplerinin ne düzeyde etkilendiği ortaya çıkarıldıktan sonra olumsuz etkilenen hedef hücrede metilasyon-spesifik gen analizleri yardımıyla bu olumsuz etkiden sorumlu genlerin haritası çıkarılabilir. Spesifik genler belirlendikten sonra ise gen manipülasyon yöntemleriyle transgenik fare modelleri oluşturulabilir ya da çeşitli gen tedavisi stratejileri geliştirilebilir.

Yukarıdaki önerilerden anlaşılabilceği üzere tez çalışmamızla primitif düzeyde giriş yapılan bu konunun birçok temel bilimsel sorunun cevaplanmasına bakir olduğu anlaşılmaktadır. Bu tez çalışmasının sonuçlarının bu konuda ileride yapılması muhtemel birçok araştırmaya temel oluşturacağı düşünülmektedir. Böylece büyük bir sağlık problemi oluşturan çocukluk dönemi kanserlerini tedavi etmek amacıyla uygulanan kraniyel radyoterapinin akut ve kronik dönemde oluşturduğu kognitif hasarların oluş mekanizmalarının aydınlatılabileceği ve bu olumsuz etkilerin önlenmesi için etkin tedavi yöntemleri geliştirilmesine ışık tutulacağı öngörülmektedir.

## 7. KAYNAKLAR

1. **Brenner DJ, Hall EJ.** Computed Tomography – An increasing source of radiation exposure. *New England Journal of Medicine*, **2007**; 357(22):1777-1784.
2. **Grasty RL, LaMarre JR.** The Annual effective dose from natural sources of ionizing radiation in Canada. *Radiation Protection Dosimetry*, **2004**; 108(3): 215-176.
3. **Hendee WR, Edwards FM.** Health Effects of exposure to low-level ionizing radiation. *Acta Radiol*, **1998**; 39(4):453-454.
4. **Walker MD, Strike TA, Sheline GE.** An analysis of dose-effect relationship in the radiotherapy of malignant gliomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, **1979**; 5(10): 1725–1731.
5. **Monje ML, Mizumatsu S, Fike JR, Palmer TD.** Irradiation induces neural precursor-cell dysfunction. *Nat Me*, **2002**; 8(9): 955–962.
6. **Meyers CA, Brown PD.** Role and relevance of neurocognitive assessment in clinical trials of patients with CNS tumors. *J Clin Oncol*, **2006**; 24(8): 1305–1309.
7. **Coleman CN, Stone HB, Moulder JE, Pellmar TC.** Medicine. Modulation of radiation injury. *Science*, **2004**; 304(5671): 693–694.
8. **Hopewell JW.** Late radiation damage to the central nervous system: a radiobiological interpretation. *Neuropathol Appl Neurobiol*, **1979**; 5(5): 329–343.
9. **Tofilon PJ, Fike JR.** The radioresponse of the central nervous system: a dynamic process. *Radiat Res*, **2000**; 153(4): 357–370.
10. **Dennis M, Spiegler BJ, Obonsawin MC, Maria BL, Cowell C, Hoffman HJ, Hendrick EB, Humphreys RP, Bailey JD, Ehrlich RM.** Brain tumors in children and adolescents. III. Effects of radiation and hormone status on intelligence and on working, associative and serial-order memory. *Neuropsychologia*, **1992**; 30(3): 257–275.
11. **Kramer JH, Crittenden MR, Halberg FE, Wara WM, Cowan MJ.** A prospective study of cognitive functioning following low-dose cranial radiation for bone marrow transplantation. *Pediatrics*, **1992**; 90(3): 447–450.
12. **Strother DR, Pollack IF, Fisher PG, Hunter JV, Woo SY, Pomeroy SL, Rorke LB.** Tumors of the central nervous system. In: Pizzo PA, Poplack DG. Principles and practice of pediatric oncology. *Exp Neurol*, **1999**; 160(1): 66–77.
13. **Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, Thun MJ.** Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin*, **2008**; 58(2):71-96.



14. **Dores GM, Devesa SS, Curtis RE, Linet MS, Morton LM.** Acute leukemia incidence and patient survival among children and adults in the United States, 2001-2007. *Blood*, **2012**; 119(1):34-43.
15. **Svendsen AL, Feychting M, Klaeboe L, Langmark F, Schüz J.** Time trends in the incidence of acute lymphoblastic leukemia among children 1976-2002: a population-based Nordic study. *J Pediatr*, **2007**; 151(5):548-550.
16. **Lannering B, Marky I, Lundberg A, Olsson E.** Long-term sequelae after pediatric brain tumors: their effect on disability and quality of life. *Med Pediatr. Oncol.* **1990**; 18(4): 304–310.
17. **Roman DD, Sperduto PW.** Neuropsychological effects of cranial radiation: current knowledge and future directions. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, **1995**; 31(4): 983–998.
18. **Dietrich J, Monje M, Wefel J, Meyers C.** Clinical patterns and biological correlates of cognitive dysfunction associated with cancer therapy. *Oncologist*, **2008**; 13(12): 1285–1295.
19. **Mulhern RK, Merchant TE, Gajjar A, Reddick WE, Kun LE.** Late neurocognitive sequelae in survivors of brain tumours in childhood. *Lancet Oncol*, **2004**; 5(7): 399–408.
20. **Fouladi M, Gilger E, Kocak M, Wallace D, Buchanan G, Reeves C, Robbins N, Merchant T, Kun LE, Khan R, Gajjar A, Mulhern R.** Intellectual and functional outcome of children 3 years old or younger who have CNS malignancies. *J Clin Oncol*, **2005**; 23(28): 7152–7160.
21. **Chin HW, Maruyama Y.** Age at treatment and long-term performance results in medulloblastoma. *Cancer*, **1984**; 53(9): 1952–1958.
22. **Duffner PK, Cohen ME, Thomas PR, Lansky SB.** The long-term effects of cranial irradiation on the central nervous system. *Cancer*, **1985**; 56(7): 1841–1846.
23. **Eichenbaum H.** A cortical-hippocampal system for declarative memory. *Nat Rev Neurosci*, **2000**; 1(1): 41–50.
24. **Karlsson N, Kalm M, Nilsson MK, Mallard C, Björk-Eriksson T, Blomgren K.** Learning and Activity after Irradiation of the Young Mouse Brain Analyzed in Adulthood Using Unbiased Monitoring in a Home Cage Environment. *Radiat Res*, **2011**; 175(3): 336-346.
25. **Boström M, Kalm M, Karlsson N, Hellström Erkenstam N, Blomgren K.** Irradiation to the young mouse brain caused long-term, progressive depletion of neurogenesis but did not disrupt the neurovascular niche. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, **2013**; 33(6): 935-943.
26. **Greene-Schloesser D, Robbins ME, Peiffer AM, Shaw EG, Wheeler KT, Chan MD.** Radiation-induced brain injury: A review. *Fron Oncology*, **2012**; 2: 73.
27. **Shors TJ, Miesegaes, G, Beylin A, Zhao M, Rydel T, Gould E.** Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories. *Nature*, **2001**; 410(6826): 372–376.

28. **Snyder JS, Kee N, Wojtowicz JM.** Effects of adult neurogenesis on synaptic plasticity in the rat dentate gyrus. *J Neurophysiol*, **2001**; 85(6): 2423– 2431.
29. **Roughton K, Kalm M, Blomgren K.** Sex dependent differences in behavior and hippocampal neurogenesis after irradiation to the young mouse brain. *Eur J Neurosci*, **2012**; 36(6): 2763-2772
30. **Kötter R, Stephan KE.** Useless or helpful? The "limbic system" concept. *Rev Neurosci*, **1997**; 8(2): 139-145.
31. **Standring S.** *Gray's Anatomy: The Anatomical Basis of Clinical Practice*, 39th edition, Elsevier Churchill Livingstone, Edinburgh: **2005**.
32. <http://en.wikipedia.org/wiki/Hippocampus> . Erişim Tarihi: 10.02.2015.
33. **Frank H. Netter.** İnsan Anatomi Atlası. Çevirmen Prof. Dr. Meserret Cumhur. 5. Baskı. Nobel Tıp Kitabevi. ISBN: 9789754208085. **2011**.
34. **Pothuizen HH, Zhang WN, Jongen-Rêlo AL, Feldon J, Yee BK.** Dissociation of function between the dorsal and the ventral hippocampus in spatial learning abilities of the rat: a within-subject, within-task comparison of reference and working spatial memory. *Eur J Neurosci*, **2004**;19(3): 705-712.
35. **Jung MW, Wiener SI, McNaughton BL.** Comparison of the spatial firing characteristics of units in dorsal and ventral hippocampus of the rat. *J Neurosci*, **1994**; 14(12): 7347-7356.
36. **Nolte J.** *The Human Brain: An Introduction to Its Functional Neuroanatomy*. 5<sup>nd</sup>. Ed. **2002**: 570–573.
37. **Treves A, Tashiro A, Witter M.P, Moser E.I.** What is the mammalian dentate gyrus good for? *Neuroscience*, **2008**; 154(4):1155-1172.
38. **Rakic P.** Neuron-glia relationship during granule cell migration in developing cerebellar cortex. A Golgi and electronmicroscopic study in Macacus Rhesus. *J Comp Neurol*, **1971**; 141(3): 283-312.
39. **Cajal SR.** Estudios sobre la degeneracion y regeneracion del sistema nerviso. Madrid: Moya. There is an English translation: Degeneration and regeneration of the nervous system (translated and edited by Raoul M. May), London: Oxford University Press, 1928). Reprinted and edited with additional translations by DeFelipe J. And Jones EG: Cajal's degeneration and translations regenerations of the nervous system. New York: Oxford Universty Press, **1991**.
40. **Goldman SA, Nottebohm F.** Neuronal production, migration, and differentiation in a vocal control nucleus of the adult female canary brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **1983**; 80(8): 2390-2394.
41. **Altman J, Das GD.** Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol*, **1965**; 124 (3): 319-335.

42. **Altman J.** Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *J Comp Neurol*, **1969**; 137(4): 433-457.
43. **Eriksson PS, Perfilieva E, Björk-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH.** Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med*, **1998**; 4(11): 1313-1317.
44. **Lois C, Alvarez-Buylla A.** Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science*, **1994**; 264(5162): 1145-1148.
45. **Lois C, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A.** Chain migration of neuronal precursors. *Science*, **1996**; 271(5251): 978-981.
46. **Pencea V, Bingaman KD, Freedman LJ, Luskin MB.** Neurogenesis in the subventricular zone and rostral migratory stream of the neonatal and adult primate forebrain, *Exp Neurol*, **2001**; 172(1): 1-16.
47. **Alvarez-Buylla A, Garcia-Verdugo JM.** Neurogenesis in adult subventricular zone, *J Neurosci*, **2002**; 22(3): 629-634.
48. **Lazarini F, Lledo PM.** Is adult neurogenesis essential for olfaction?, *Trends Neurosci*, **2011**; 34(1): 20-30.
49. **Merkle FT, Tramontin AD, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A.** Radial glia give rise to adult neural stem cells in the subventricular zone. *Proc Natl Acad Sci*, **2004**; 101(50): 17528–17532.
50. **Scheffler B, Walton NM, Lin DD, Goetz AK, Enikolopov G, Roper SN, Steindler DA.** Phenotypic and functional characterization of adult brain neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci*, **2005**; 102(26): 9353–9358.
51. **Brill MS, Ninkovic J, Winpenny E, Hodge RD, Ozen I, Yang R, Lepier A, Gascon S, Erdelyi F, Szabo G, Parras C, Guillemot F, Frotscher M, Berninger B, Hevner RF, Raineteau O, Götz M.** Adult generation of glutamatergic olfactory bulb interneurons. *Nat Neurosci*, **2009**; 12(12): 1524–1533.
52. **Lledo PM, Merkle FT, Alvarez-Buylla A.** Origin and function of olfactory bulb interneuron diversity. *Trends Neurosci*, **2008**; 31(8): 392–400.
53. **Cameron HA, Woolley CS, McEwen BS, Gould E.** Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat. *Neuroscience*, **1993**; 56(2): 337–344.
54. **Kempermann G, Jessberger S, Steiner B, Kronenberg G.** Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. *Trends Neurosci*, **2004**; 27(8): 447–452.
55. **Noonan MA, Bulin SE, Fuller DC, Eisch AJ.** Reduction of adult hippocampal neurogenesis confers vulnerability in an animal model of cocaine addiction. *J Neurosci*, **2010**; 30(1): 304–315.

56. **Aimone JB, Deng W, Gage FH.** Resolving new memories: A critical look at the dentate gyrus, adult neurogenesis, and pattern separation. *Neuron*, **2011**; 70(4): 589–596.
57. **Sahay A, Wilson DA, Hen R.** Pattern separation: A common function for new neurons in hippocampus and olfactory bulb. *Neuron*, **2011**; 70(4): 582–588.
58. **McDonald HY, Wojtowicz JM.** Dynamics of neurogenesis in the dentate gyrus of adult rats. *Neurosci Lett*, **2005**; 385(1): 70-75.
59. **Hsieh J.** Orchestrating transcriptional control of adult neurogenesis. *Genes Dev*, **2012**; 26(10): 1010-1021.
60. **Lazarov O, Mattson MP, Peterson DA, Pimplikar SW, van Praag H.** When neurogenesis encounters aging and disease. *Trends Neurosci*, **2010**; 33(12): 569-579.
61. **Ming GL, Song H.** Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Annu Rev Neurosci*, **2005**; 28: 223-250.
62. **Seri B, Garcia-Verdugo JM, McEwen BS, Alvarez-Buylla A.** Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. *J Neurosci*, **2001**; 21(18): 7153–7160.
63. **Ables JL, Decarolis NA, Johnson MA, Rivera PD, Gao Z, Cooper DC, Radtke F, Hsieh J, Eisch AJ.** Notch1 is required for maintenance of the reservoir of adult hippocampal stem cells. *J Neurosci*, **2010**; 30(31): 10484–10492.
64. **Mira H, Andreu Z, Suh H, Lie DC, Jessberger S, Consiglio A, San Emeterio J, Hortiguera R, Marques-Torrejon MA, Nakashima K, Colak D, Götz M, Fariñas I, Gage FH.** Signaling through BMPR-IA regulates quiescence and long-term activity of neural stem cells in the adult hippocampus. *Cell Stem Cell*, **2010**; 7(1): 78–89.
65. **Kronenberg G, Reuter K, Steiner B, Brandt MD, Jessberger S, Yamaguchi M, Kempermann G.** Subpopulations of proliferating cells of the adult hippocampus respond differently to physiologic neurogenic stimuli. *J Comp Neurol*, **2003**; 467(4): 455–463.
66. **Lugert S, Basak O, Knuckles P, Haussler U, Fabel K, Gotz M, Haas CA, Kempermann G, Taylor V, Giachino C.** Quiescent and active hippocampal neural stem cells with distinct morphologies respond selectively to physiological and pathological stimuli and aging. *Cell Stem Cell*, **2010**; 6(5): 445–456.
67. **Bonaguidi MA, Wheeler MA, Shapiro JS, Stadel RP, Sun GJ, Ming GL, Song H.** In vivo clonal analysis reveals self-renewing and multipotent adult neural stem cell characteristics. *Cell*, **2011**; 145(7): 1142–1155.

68. **Encinas JM, Michurina TV, Peunova N, Park JH, Tordo J, Peterson DA, Fishell G, Koulakov A, Enikolopov G.** Division-coupled astrocytic differentiation and age-related depletion of neural stem cells in the adult hippocampus. *Cell Stem Cell*, **2011**; 8(5): 566–579.
69. **Dhaliwal J, Lagace DC.** Visualization and genetic manipulation of adult neurogenesis using transgenic mice. *Eur J Neurosci*, **2011**; 33(6): 1025–1036.
70. **van Praag H, Schinder AF, Christie BR, Toni N, Palmer TD, Gage FH.** Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature*, **2002**; 415(6875): 1030–1034.
71. **Zhao C, Teng EM, Summers RG Jr, Ming GL, Gage FH.** Distinct morphological stages of dentate granule neuron maturation in the adult mouse hippocampus. *J Neurosci*, **2006**; 26(1): 3–11.
72. **Snyder JS, Soumier A, Brewer M, Pickel J, Cameron HA.** Adult hippocampal neurogenesis buffers stress responses and depressive behaviour. *Nature*, **2011**; 476: 458–461.
73. **Deacon RM, Rawlins JN.** T-maze alternation in the rodent. *Nat Protoc*, **2006**; 1(1): 7-12.
74. **Jang EH, Ahn SH, Lee YS, Lee HR, Kaang BK.** Effect of Food Deprivation on a Delayed Nonmatch-to-place T-maze Task. *Exp Neurobiol*, **2013**; 22(2): 124-127.
75. **Kim JS, Lee HJ, Kim JC, Kang SS, Bae CS, Shin T, Jin JK, Kim SH, Wang H, Moon C.** Transient impairment of hippocampus-dependent learning and memory in relatively low-dose of acute radiation syndrome is associated with inhibition of hippocampal neurogenesis. *J Radiat Res*, **2008**; 49(5): 517-526.
76. **Morris RGM.** Spatial localization does not require the presence of local cues. *Learn Motiv*, **1981**; 12: 239-260.
77. **Bromley-Brits K, Deng Y, Song W.** Morris water maze test for learning and memory deficits in Alzheimer's disease model mice. *J Vis Exp*, **2011**; 20: (53): 2920.
78. **Stover KR, Brown RE.** Age-related changes in visual acuity, learning and memory in the APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>dE9</sup> mouse model of Alzheimer's disease. *Behav Brain Res*. **2012**; 231(1): 75-85.
79. **Vorhees CV, Williams MT.** Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nat Protoc*, **2006**; 1(2): 848-858.
80. **George S, Petit GH, Gouras GK, Brundin P, Olsson R.** Nonsteroidal selective androgen receptor modulators and selective estrogen receptor agonists moderate cognitive deficits and amyloid- $\beta$  levels in a Mouse model of Alzheimer's disease. *ACS Chem Neurosci*, **2013**; 4(12): 1537-1548.
81. **Rola R, Raber J, Rizk A, Otsuka S, Vandenberg SR, Morhardt DR, Fike JR.** Radiation-induced impairment of hippocampal neurogenesis is associated with cognitive deficits in young mice. *Exp Neuro*. **2004**; 188(2): 316-330.

82. **Cimadevilla JM, Arias JL.** Different vulnerability in female's spatial behaviour after unilateral hippocampal inactivation. *Neurosci Lett*, **2008**; 439(1): 89-93.
83. **Carli M, Prontera C, Samanin R.** Effect of 5-HT1A agonists on stress-induced deficit in open field locomotor activity of rats: evidence that this model identifies anxiolytic-like activity. *Neuropharmacology*, **1989**; 28: 471-476.
84. **Ben Abdallah NM, Filipkowski RK, Pruschy M, Jaholkowski P, Winkler J, Kaczmarek L, Lipp HP.** Impaired long-term memory retention: common denominator for acutely or genetically reduced hippocampal neurogenesis in adult mice. *Behav Brain Res*, **2013**; 252(2): 275-286.
85. **Busslinger M, Hurst J, Flavell RA.** DNA methylation and regulation of globin gene expression. *Cell*, **1983**; 34(1): 197-206.
86. **Yisraeli J, Frank D, Razin A, Cedar H.** Effect of in vitro DNA methylation on beta-globin gene expression. *PNAS*, **1988**; 85(1): 4638-4642.
87. **Jones PA, Takai D.** The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. *Science*, **2001**; 293(5532): 1068-1070.
88. **Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, Pastor WA, Bandukwala H, Brudno Y, Agarwal S, Iyer LM, Liu DR, Aravind L, Rao A.** Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science*, **2009**; 324(5929): 930-935.
89. **Lister R, Mukamel EA, Nery JR, Urich M, Puddifoot CA, Johnson ND, Lucero J, Huang Y, Dwork AJ, Schultz MD, Yu M, Tonti-Flippini J, Heyn H, Hu S, Wu JC, Rao A, Esteller M, He C, Haghghi FG, Seinozski TJ, Behrens MM, Ecker JR.** Global epigenomic reconfiguration during mammalian brain development. *Science*, **2013**; 341(6146): [1237905](#).
90. **Chen Y, Ozturk NC, Zhou FC.** DNA methylation program in developing hippocampus and its alteration by alcohol. *Plos One*, **2013**; 8 (3): e60503.
91. **Resendiz M, Chen Y, Ozturk NC, Zhou FC.** Epigenetic medicine and fetal alcohol spectrum disorders. *Epigenomics*, **2013**; 5(1): 73-86.
92. **Zhou FC, Chen Y, Love A.** Cellular DNA methylation program during neurulation and its alteration by alcohol exposure. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*, **2011**; 91(8): 703-715.
93. **Zhou FC.** DNA methylation program during development. *Front Biol*, **2012**; 7(6): 485-494.
94. **Zovkic IB, Guzman-Karlsson MC, Sweatt JD.** Epigenetic regulation of memory formation and maintenance. *Learn Mem*, **2013**; 20(2): 61-74.

95. **Levenson JM, Roth TL, Lubin FD, Miller CA, Huang IC, Desai P, Malone LM, Swealt JD.** Evidence that DNA (cytosine-5) methyltransferase regulates synaptic plasticity in the hippocampus. *J Biol Chem*, **2006**; 281(23): 15763-15773.
96. **Chen Y, Ozturk NC, Ni L, Goodlett C, Zhou FC.** Strain differences in development vulnerability to alcohol exposure via embryo culture in mice. *Alcohol Clin Exp Res*, **2011**; 35(7): 1293-1304.
97. **Hoffman KE, Yock TI.** Radiation therapy for pediatric central nervous system tumors. *J Child Neurol*, **2009**; 24 (11): 1387–1396.
98. **Spiegler BJ, Bouffet E, Greenberg ML, Rutka JT, Mabbott DJ.** Change in neurocognitive functioning after treatment with cranial radiation in childhood. *J Clin. Oncol.* **2004**; 22(4): 706–713.
99. **Naylor AS, Bull C, Nilsson MK, Zhu C, Björk-Eriksson T, Eriksson PS, Blomgren K, Kuhn HG.** Voluntary running rescues adult hippocampal neurogenesis after irradiation of the young mouse brain. *Proc Natl Acad Sci USA*, **2008**; 105(38): 14632–14637.
100. **Izquierdo A, Jentsch JD.** Reversal learning as a measure of impulsive and compulsive behavior in addictions. *Psychopharmacology (Berl)*, **2012**; 219(2): 607-620.
101. **Peterson DA, Elliott C, Song DD, Makeig S, Sejnowski TJ, Poizner H.** Probabilistic reversal learning is impaired in parkinson's disease. *Neuroscience*, **2009**; 163(4):1092-101.
102. **Kalm M, Karlsson N, Nilsson MK, Blomgren K.** Loss of hippocampal neurogenesis, increased novelty-induced activity, decreased home cage activity, and impaired reversal learning one year after irradiation of the young mouse brain. *Exp Neurol*, **2013**; 247: 402-409
103. **Zhang L, Li K, Sun R, Zhang Y, Ji J, Huang P, Yang H, Tian Y.** Minocycline ameliorates cognitive impairment induced by whole-brain irradiation: an animal study. *Radiat Oncol*, **2014**; 9(1): 281.
104. **Dong X, Luo M, Huang G, Zhang J, Tong F, Cheng Y, Cai Q, Dong J, Wu G, Cheng J.** Relationship between irradiation-induced neuro-inflammatory environments and impaired cognitive function in the developing brain of mice. *Int J Radiat Biol.* **2014**; 26: 1-36.
105. **Stratmann G, Sall JW, May LD, Bell JS, Magnusson KR, Rau V, Visrodia KH, Alvi RS, Ku B, Lee MT, Dai R.** Isoflurane differentially affects neurogenesis and long-term neurocognitive function in 60-day-old and 7-day-old rats. *Anesthesiology*, **2009**; 110(4): 834–848.
106. **Stratmann G, Sall JW, Bell JS, Alvi RS, May Ld, Ku B, Dowlatshahi M, Dai R, Bickler PE, Russell I, Lee MT, Hrubos MW, Chiu C.** Isoflurane does not affect brain cell death, hippocampal neurogenesis, or long-term neurocognitive outcome in aged rats. *Anesthesiology*, **2010**; 112(2): 305–315.
107. **Zhu C, Gao J, Karlsson N, Li Q, Zhang Y, Huang Z, Li H, Kuhn HG, Blomgren K.** Isoflurane anesthesia induced persistent, progressive memory impairment, caused a loss of neural stem cells, and reduced neurogenesis in young, but not adult, rodents. *J Cereb Blood Flow Metab*, **2010**; 30(5): 1017–1030.

108. **Culley DJ, Boyd JD, Palanisamy A, Xie Z, Kojima K, Vacanti CA, Tanzi RE, Crosby G.** Isoflurane decreases self-renewal capacity of rat cultured neural stem cells. *Anesthesiology*, **2011**; 115(4): 754–763.
  
109. **Zhao X, Yang Z, Liang G, Wu Z, Peng Y, Joseph DJ, Inan S, Wei H.** Dual effects of isoflurane on proliferation, differentiation, and survival in human neuroprogenitor cells. *Anesthesiology*, **2013**; 118(3): 537–549.
  
110. **Erasso DM, Camporesi EM, Mangar D, Saporta S.** Effects of isoflurane or propofol on postnatal hippocampal neurogenesis in young and aged rats. *Brain Res*, **2013**; 1530: 1-12.
  
111. **Son Y, Yang M, Kim JS, Kim J, Kim SH, Kim JC, Shin T, Wang H, Jo SK, Jung U, Moon C.** Hippocampal dysfunction during the chronic phase following a single exposure to cranial irradiation. *Experimental Neurology*, **2014**; 254: 134–144.
  
112. **Ilnytsky Y, Koturbash I, Kovalchuk O.** Radiation-induced bystander effects in vivo are epigenetically regulated in a tissue-specific manner. *Environmental Mol Mutagen*, **2009**; 50(2): 105-113.
  
113. **Nan X, Ng HH, Johnson CA, Laherty CD, Turner BM, Eisenman RN, Bird A.** Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature*, **1998**; 393(6683): 386-389.
  
114. **Zhao X, Pak C, Smrt RD, Jin P.** Epigenetics and Neural developmental disorders: Washington DC, September 18 and 19, 2006. *Epigenetics*. **2007**; 2(2):126-134.
  
115. **Smrt RD, Pfeiffer RL, Zhao X.** Age-dependent expression of MeCP2 in a heterozygous mosaic mouse model. *Hum Mol Genet*, **2011**; 20(9):1834-1843.
  
116. **Amir RE, Van den Veyver IB, Wan M, Tran CQ, Francke U, Zoghbi HY.** Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2. *Nat Genet*, **1999**; 23(2): 185-188.



## **ÖZGEÇMİŞ**

1988 yılında İskenderun'da doğdu. İlköğretimini ve ortaöğretimini Hatay'da tamamladı. 2011 yılında Mersin Üniversitesi Biyoloji bölümünü bitirdi ve aynı yıl Mersin Üniversitesi Anatomi Ana Bilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı. 2013 yılından itibaren Araştırma Görevlisi olarak görev yapmaktadır. Yabancı dili İngilizce'dir. Bekârdır.