



T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SİNİRBİLİM ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

DİKKAT EKSİKLİĞİ HİPERAKTİVİTE BOZUKLUĞU
OLAN SIÇANLARDA PREFRONTAL KORTEKSE
PROJEKTE OLAN MEZOKORTİKAL YOLAK
LİFLERİNİN DAĞILIMI VE YOĞUNLUĞUNUN
GÖSTERİLMESİ

Ayşegül GÜNGÖR AYDIN

Mayıs 2018
DENİZLİ

T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DİKKAT EKSİKLİĞİ HİPERAKTİVİTE BOZUKLUĞU
OLAN SIÇANLARDA PREFRONTAL KORTEKSE
PROJEKTE OLAN MEZOKORTİKAL YOLAK
LİFLERİNİN DAĞILIMI VE YOĞUNLUĞUNUN
GÖSTERİLMESİ

SİNİRBİLİM ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

Ayşegül GÜNGÖR AYDIN

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Esat ADIGÜZEL
2.Danışman: Prof. Dr. Alev ERİŞİR

Denizli, 2018

DOKTORA TEZİ ONAY FORMU

Ayşegül GÜNGÖR AYDIN tarafından Prof. Dr. Esat ADIGÜZEL yönetiminde hazırlanan "Dikkat eksikliği hiperaktivite bozukluğu olan sıçanlarda, prefrontal kortekse projekte Ptarafımızdan okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Emel ULUPINAR
Osmangazi Üniversitesi

Danışman: Prof. Dr. Esat ADIGÜZEL
Pamukkale Üniversitesi

Üye: Prof. Dr. Vural KÜÇÜKATAY
Pamukkale Üniversitesi

Üye: Prof. Dr. Turgay DALKARA
Hacettepe Üniversitesi

Üye: Prof. Dr. Levent Sinan BİR
Pamukkale Üniversitesi

Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
11.05.2018 tarih ve 13-11 sayılı kararıyla onaylanmıştır.


Prof. Dr. Hakan AKÇA
Müdür

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırılmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğini beyan ederim.

Öğrenci Adı Soyadı : Ayşegül GÜNGÖR-AYDIN

İmza :



**DİKKAT EKSİKLİĞİ HİPERAKTİVİTE BOZUKLUĞU OLAN SIÇANLARDA
PREFRONTAL KORTEKSE PROJEKTE OLAN MEZOKORTİKAL YOLAK
LİFLERİNİN DAĞILIMI VE YOĞUNLUĞUNUN GÖSTERİLMESİ**

Ayşegül GÜNGÖR AYDIN
Doktora tezi, Sinirbilim AD
Tez Yöneticisi: Prof Dr. Esat ADIGÜZEL

Mayıs 2018, 88 Sayfa

Dikkat eksikliği hiperaktivite bozukluğu (DEHB); dikkat eksikliği, lokomotor hiperaktivite ve dürtüsellik ile karakterize nörogelişimsel bir bozukluktur. DEHB etiolojisinde tek bir hipotez kabul görmemekle birlikte, son araştırmalar DEHB'deki semptomların prefrontal korteks'te yer alan farklı sinaptik devrelerdeki disfonksiyon sebebiyle olduğunu öne sürmektedir. Bu disfonksiyonun dopaminerjik nöron ve liflerin azalması sebebiyle olduğu hipotezinden hareketle bu çalışmada, dopaminerjik mezokortikal yolağa ait nöron ve lif yoğunluğunda azalma olup olmadığının incelenmesi amaçlanmıştır.

Bu çalışmada, kontrol grubu olarak üç adet Wistar Kyoto (WKY) ve DEHB hayvan modeli olarak beş adet Spontan Hipertansif (SHR) juvenil erkek sıçan kullanıldı. VTA'da bulunan dopaminerjik nöronların ve mPFK'de bulunan dopaminerjik liflerin belirlenmesinde tirozin hidroksilaz (TH), noradrenerjik liflerin belirlenmesinde ise dopamin beta hidroksilaz (DBH) immunohistokimyası kullanıldı. Medial prefrontal korteksin (mPFK) prelimbik (PrL) alanında, TH immünoboyanmış (TH-pozitif) dopaminerjik liflerinin yoğunluğunun niceliksel analizi gerçekleştirildi ve TH (+) dopaminerjik liflerin yüzdesi değerlendirildi. Ayrıca ventral tegmental alanda (VTA) TH (+) dopaminerjik nöron yoğunluğunun da niceliksel analizi yapıldı. Elde edilen veriler bağımsız örneklem t testi ve Mann Whitney U testi ile analiz edildi.

SHR'lerde WKY sıçanlarına kıyasla, VTA'daki TH (+) dopaminerjik nöronlarda ($p=0,04$) ve mPFK'deki TH (+) dopaminerjik liflerde ($p=0,02$) anlamlı azalma olduğu tespit edildi. WKY ve SHR grupları arasında mPFK'de TH (+) dopaminerjik liflerin yüzdesinde anlamlı bir farklılık saptanmadı ($p = 0,7$).

DEHB hayvan modeli olarak kullanılan juvenil SHR'lerde, mezokortikal dopaminerjik nöron ve liflerde azalma bulundu. mPFK'deki TH (+) dopaminerjik liflerin yüzdesinin değişmediği görüldü. Bu bulgular, DEHB'de mezokortikal dopaminerjik liflerin yanısıra noradrenerjik liflerin de azaldığına işaret etmektedir.

Anahtar Kelimeler: Dikkat Eksikliği Hiperaktivite Bozukluğu, Mezokortikal yolak, Dopamin, Prefrontal korteks, Ventral Tegmental Alan

Bu çalışma, PAÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (Proje No: 2016SBE004) ve TÜBİTAK 2214/A Yurt Dışı Doktora Sırası Araştırma Burs Programı tarafından desteklenmiştir.

ABSTRACT**DISTRIBUTION AND DENSITY OF THE MESOCORTICAL PATHWAY
FIBERS PROJECTING TO THE PREFRONTAL CORTEX IN A RAT MODEL
OF ATTENTION DEFICIT HYPERACTIVITY DISORDER**

GÜNGÖR-AYDIN, Ayşegül
PhD. Thesis in Neuroscience
Supervisor: Prof. ESAT ADIGÜZEL (MD)

May 2018, 88 Pages

Attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) is a neurodevelopmental disorder characterized with attention deficit, locomotor hyperactivity and impulsivity. Although no single hypothesis is accepted in the etiology of ADHD, research suggests that symptoms in ADHD are resulted from the dysfunction of different synaptic circuits in the prefrontal cortex. Based on the hypothesis that this dysfunction is due to the reduction of dopaminergic neurons and fibers, this study aims to investigate whether there is a decrease in neuron and fiber density of the dopaminergic mesocortical pathway.

Five SHR juvenile male rats as animal models of ADHD and three WKY juvenile male rats as control were used in this study. TH immunohistochemistry was used to identify dopaminergic neurons in VTA and dopaminergic fibers in mPFC, dopamine beta hydroxylase (DBH) immunohistochemistry was used to identify noradrenergic fibers. Quantification of density of TH-immunolabeled (TH-positive) DAergic fibers was performed and percentage of TH (+) DAergic fibers in the prelimbic subregion of mPFC was evaluated. We also quantified the TH (+) DAergic neuron density in the VTA. Data were analyzed with independent sample t test and Mann Whitney U test.

We observed significant decrease in TH (+) neurons of the VTA of rats ($p=0,04$) and TH (+) fibers in the mPFC ($p=0,02$) of the SHRs compared to the WKY. There was no significant difference in the percentage of TH (+) dopaminergic fibers in mPFC of WKY and SHR rats ($p=0,7$).

There was a decrease in mesocortical dopaminergic neurons and fibers in juvenile SHRs used as an animal model of ADHD. We observed that the percentage of TH (+) dopaminergic fibers in the mPFC did not change. These findings indicate that noradrenergic fibers as well as mesocortical dopaminergic fibers decrease in ADHD.

Keywords : Attention Deficit/Hyperactivity Disorder, mesocortical pathway, dopamine, prefrontal cortex, ventral tegmental area

**This study was supported by Pamukkale University Scientific Research Projects
Coordination Unit (Project number 2016SBE004) and TUBITAK (2214/A)
International Doctoral Research Fellowship Programme**

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimime ilk başladığım andan itibaren, özveriyle bilgisini, sabrını ve insani ilgisini esirgemeyen, eğitimim boyunca ilminden faydalandığım, insani ve ahlaki değerleri ile örnek edindiğim, birlikte yaptığımız çalışmaktan onur duyduğum, tecrübelerinden yararlanırken göstermiş olduğu hoşgörü ve sabırdan dolayı değerli tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Esat ADIGÜZEL'e,

Doktora tezimin yapılabilirliğini sağlayan, bana yılmadan ilerlemeyi öğreten, bilgisi ile yoluma ışık tutan çok değerli danışmanım Dr. Alev Erişir'e,

Doktora eğitimimin başlangıcından, aramızdan ayrıldığı sürece dek, bilgisi ve tecrübeleriyle vizyonumu genişleten, Nöroloji Anabilim Dalı merhum öğretim üyesi Prof.Dr. Attila Oğuzhanoğlu'na, doktora eğitimim esnasındaki eşsiz katkılarından dolayı Farmakoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. İzzettin Hatip ve Nöroloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Levent Sinan Bir başta olmak üzere, tüm Sinirbilim ve Anatomi Anabilim Dalı öğretim üyeleri hocalarıma,

Tezimin istatistiksel analizleri sırasındaki yardımlarından ötürü Öğr. Grv. Hande Senol'a, tez çalışmamdaki finansal desteklerinden ötürü TÜRKİYE BİLİMSEL ve TEKNOLOJİK ARAŞTIRMA KURUMU ve Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne,

Sonsuz sabır ve destekleri için dostlarıma, bu günlere gelmemde büyük pay sahibi olan aileme, hayatta olsaydı benimle gurur duyacak olan babama ve hayatımın her anında manevi desteklerini hep yanımda hissettiğim bana olan desteği kelimelerle anlatılamayacak kadar çok olan değerli ablam Araş. Gör. Özlem GÜNGÖR'e, hayatımın her aşamasında kolaylık, rahatlık ve huzur sağlayan, çalışmalarım süresince beni yalnız bırakmayan ve bana rehberlik yapan, akademik hayatımdaki en büyük desteğim eşim Uzm. Dr.Üstün Aydın'a sonsuz saygı ve şükranlarımı sunar, yeni çıkacağım bu yolda sonsuz destekleri için teşekkür ederim.

Bu tez TÜBİTAK 2214/A Yurt Dışı Doktora Sırası Araştırma Burs Programı ve PAÜ BAP projesi (2016SBE004) ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
TABLolar DİZİNİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1 Amaç.....	2
2. KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI	3
2.1. Dikkat Eksikliği Hiperkativite Bozukluğu	3
2.1.1. Dikkat Eksikliği Hiperkativite Bozukluğu Tanımı.....	3
2.1.2. Dikkat Eksikliği Hiperkativite Bozukluğu Tarihçesi.....	3
2.1.3. Dikkat Eksikliği Hiperkativite Bozukluğu Epidemiyolojisi.....	6
2.1.4. Dikkat Eksikliği Hiperkativite Bozukluğu Etiyolojisi.....	6
2.1.4.1. Genetik Çalışmalar	7
2.1.4.2. Yapısal Görüntüleme Çalışmaları.....	7
2.1.4.3. Fonksiyonel Görüntüleme Çalışmaları.....	8
2.1.4.4. Nörokimyasal Çalışmalar.....	9
2.1.5. Dikkat Eksikliği Hiperkativite Bozukluğu Hayvan Modelleri.....	10
2.1.5.1. Spontan Hipertansif Sıçan	11
2.1.6. Dikkat Eksikliği Hiperkativite Bozukluğu ile İlişkili Anatomik Yapılar ve Nöral Devreler.....	13
2.1.6.1. DA Sisteminin İnsan Beynindeki Organizasyonu.....	15
2.1.6.1.1. DA Sentezi ve Dopaminerjik Nöronlar.....	15
2.1.6.1.1.1. Mezensefalik Dopaminerjik (mDA) Nöronlar.....	16
2.1.6.1.1.2. Dopaminerjik Yolaklar.....	19
2.1.6.1.1.3. Ventral Tegmental Alan Nöroanatomisi.....	21

2.2. Clarity Tekniği.....	25
2.3. Hipotez.....	26
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	27
3.1. Deney Hayvanlarının Seçimi ve Gruplandırılması	27
3.2. Stereotaksik İntraserebral Enjeksiyon	28
3.3. İmmunohistokimyasal Analizler için Dokuların Hazırlanması.....	30
3.3.1. Transkardiyak Perfüzyon ve Kesitlerin Alınması	30
3.3.2. İmmünohistokimyasal Boyamalar.....	31
3.4. Görüntüleme	32
3.4.1. Işık Mikroskopisi Analizleri	34
3.4.1.1. VTA Analizi (Hacimsel Nöron Yoğunluk Ölçümü).....	34
3.4.1.2. . Medial Prefrontal Korteks Analizi (Lif Yoğunluk Analizi).....	35
3.4.2 Konfokal Mikroskopi Analizi	37
3.5. Clarity Tekniğinin Uygulanması.....	38
3.6. İstatistiksel Analiz.....	40
4. BULGULAR.....	41
4.1. Ventral Tegmental Alan'ın Stereotaksik Koordinatlarının Belirlenmesi.....	41
4.2. Ventral Tegmental Alanda TH Pozitif Dopaminerjik Nöron Yoğunluğu	43
4.3.. Medial Prefrontal Kortekste TH (+) Dopaminerjik Lif Yoğunluk Analizi.....	45
4.4. Medial Prefrontal Kortekste TH Pozitif Dopaminerjik Lif Yüzdesi Analizi.....	46
4.5. Clarity Tekniği Kullanılarak VTA'daki Dopaminerjik Nöronların Görüntülenmesi.....	48
5. TARTIŞMA.....	51
6. SONUÇLAR.....	63
7. KAYNAKLAR.....	64
8. ÖZGEÇMİŞ.....	88

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1 DA nöron gruplarının gelişmekte (a) ve yetişkin (b) kemirgen beyinde dağılımı	16
Şekil 2.2 İnsan ve fare beyinde mDA nöronlarının lokalizasyonu.....	19
Şekil 2.3 Beyindeki dopaminerjik yolların nöroanatomi.....	20
Şekil 2.4 Primatlarda striatal, limbik ve kortikal alanlara projekte olan mDA nöronlarının dağılımı.....	21
Şekil 2.5 VTA'da tanımlanan medial ve lateral hücre grupları.....	23
Şekil 3.1 Stereotaksik enjeksiyon cerrahisi gerçekleştirmek üzere kurulan düzenek.....	28
Şekil 3.2 Stereotaksik cerrahi işlem uygulanması.....	29
Şekil 3.3 Kesit toplama stratejisi.....	31
Şekil 3.4 PFK'de ilgilenilen alanın sınırlarının belirlenmesi için Nissl boyalı koronal kesit mikrofisi (sol) ve kesite karşılık gelen atlas görüntüsü (sağ).....	33
Şekil 3.5 mPFK'nin PrL alanının I. tabakasının ve TH pozitif dopaminerjik projeksiyon alanlarının belirlenmesi.....	33
Şekil 3.6 VTA'da nöron yoğunluk analizi.....	35
Şekil 3.7 mPFK'de lif yoğunluk analizi.....	36
Şekil 3.8 mPFK'nin PrL alanının I. tabakasındaki TH (+) dopaminerjik liflerin NeuroLucida yazılımı kullanılarak çizilmesi.....	36
Şekil 3.9 mPFK'nin PrL alt alanının I. tabakasında TH ve DBH immünohistokimyasından elde edilen örnek konfokal görüntüleri.....	37
Şekil 3.10 mPFK'deki TH (+) dopaminerjik liflerin Image-Pro Plus yazılımı kullanılarak toplam uzunluklarının hesaplanmasını gösteren fotomikrografi.....	38

Şekil 4.1	Ventral tegmental alana stereotaksik enjeksiyon ile koordinat belirleme denemeleri sonucu elde edilen koronal kesit görüntüleri.....	42
Şekil 4.2	VTA'da TH immunohistokimyası ile boyanmış nöronların 5x (sol) ve 40x (sağ) büyütmedeki fotomikrografileri görülmektedir.....	43
Şekil 4.3	WKY ve SHR gruplarında VTA'daki TH (+) dopaminerjik nöronların hacimsel yoğunluklarının kutu grafiği.....	44
Şekil 4.4	mPFK'deki TH immunohistokimyası ile boyanmış aksonların 1.6X (sol) ve 40X (sağ) büyütmedeki örnek fotomikrografisi.....	45
Şekil 4.5	WKY ve SHR gruplarında mPFK'deki TH (+) dopaminerjik liflerin yoğunluklarının kutu grafiği.....	46
Şekil 4.6	mPFK'nin PrL alanının I. tabakasındaki TH-DBH immunohistokimyası uygulanmış kesitlerin örnek fotomikrografileri (büyütme 60x).....	47
Şekil 4.7	WKY ve SHR gruplarında mPFK'deki TH (+) dopaminerjik liflerin yüzdelerini gösteren kutu grafiği.....	48
Şekil 4.8	Kırk sekiz saat boyunca yapılan elektroforez işlemi sonrası polimerize edilmiş sıçan beyninde elde edilen şeffaflaşmayı gösteren örnek fotoğraflar.....	48
Şekil 4.9	VTA'da TH (+) dopaminerjik nöron gövdesinin (siyah ok) ve uzantısının (beyaz ok) konvansiyonel floresan mikroskobu ile elde edilen örnek görüntü.....	49
Şekil 4.10	VTA'da TH (+) dopaminerjik nöronların konfokal mikroskobu ile elde edilen örnek görüntü.....	50
Şekil 4.11	VTA'daki dopaminerjik nöronların TH ve DAPI boyaması sonrası konfokal mikroskobu ile elde edilen örnek görüntü.....	50

TABLULAR DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 4.1 Denemeler için hesaplanan VTA stereotaksik koordinatları	41
Tablo 4.2 VTA'daki TH(+) dopaminerjik nöronların yoğunluğu	44
Tablo 4.3 mPFK'deki TH(+) dopaminerjik liflerin yoğunluğu	46
Tablo 4.4 mPFK'deki TH (+) dopaminerjik liflerin toplam lif uzunluğuna oranı (%)...	47

SİMGELER VE KISALTMALAR

DA	Dopamin
DAB	3,3'diaminobenzidin
DBH	Dopamin Beta-Hidroksilaz
DEHB	Dikkat Eksikliği Hiperaktivite Bozukluğu
DSM-5	Diagnostic and Statistical Manuel of Mental Disorders 5th ed.
MBD	Minimal Beyin Disfonksiyonu
DSM-II	Diagnostic and Statistical Manuel of Mental Disorders 2nd ed.
PFK	Prefrontal korteks
DSM-III	Diagnostic and Statistical Manuel of Mental Disorders 3rd ed.
DSM-III-R	Diagnostic and Statistical Manuel of Mental Disorders 3rd ed., Revision
DSM-IV	Diagnostic and Statistical Manuel of Mental Disorders 4th ed.
DRD2	Dopamin Reseptör D2
DAT	Dopamin Taşıyıcısı
DAT-KO	DAT knock out
SPECT	Tekli foton emisyon bilgisayarlı tomografisi
PET	Pozitron emisyon tomografisi
DAT1	Dopamin Taşıyıcısı 1 geni
DRD5	Dopamin Reseptör D5
DRD4	Dopamin Reseptör D4
NE	Noradrenalin
NHE	Naples uyarılmışlığı yüksek sıçan
IMAGE	International Multisite ADHD Gene Project
Yİ	Yürütücü işlev
LTP	Uzun Dönem Potensiyalizasyonu
MAOA	Monoamin Oksidaz A
MDB	Major Depresif Bozukluk
miRNA, miR	mikroRNA
MPH	Metilfenidat
MRG	Manyetik Rezonans Görüntüleme
n	Örneklem Sayısı
NET	Norepinefrin taşıyıcı, SLC6A2
NR3C1	Nuclear Receptor Subfamily 3 Group C Member 1)
Ort	Ortalama
PBS	Fosfat tamponlu Salin
PC12	Feokromasitoma Hücreleri

PFK	Prefrontal Korteks
RGS4	Regulator Of G Protein Signaling 4
RISC	RNA ile İndüklenen Susturma Kompleksi
RNA	Ribonükleik Asit
ROI	İlgilenilen alan
RRF	Retrorubral alan
SHR	Spontan Hipertansif Sıçan
SN	Substantia Nigra
SLC6A3	Dopamin Taşıyıcısı 1, DAT1
SPSS	Statistical Package for Social Sciences
ss	Standart Sapma
TH	Tirozin Hidroksilaz
TRBP	Transaktive Eden Yanıt RNA Bağlama Proteini
TS	Tourette Sendromu
VTA	Ventral Tegmental Alan
VNTR	Variable Number Tandem Repeat
WKY	Wistar Kyoto sıçanların
µm	mikrometre
mm	milimetre

1.GİRİŞ

Dikkat Eksikliği Hiperaktivite Bozukluğu (DEHB), dikkat eksikliği, lokomotor hiperaktivite ve dürtüsellik ile karakterize olan çocukluk çağının en sık görülen nöropsikiyatrik bozukluklarından birisidir (DSM-5). DEHB'nin tüm dünyadaki ortalama prevalansı % 5,29, görülme sıklığı ise çocuklarda %5-10 ve yetişkinlerde %4 kadardır (Polanczyk 2008, Farone 2003, Kessler 2006). Bozukluk, erkeklerde kadınlara oranla daha siktir; erkek\kadın oranı örnekleme bağılı olarak değişmektedir. Epidemiyolojik çalışmalara göre erkek\kadın oranı 4:1; klinik çalışmalara göre ise 9:1'dir (DSM-5). DEHB'yi oluşturan temel unsurlar, hiperaktivite, dürtüsellik ve dikkat eksikliğidir.

DEHB etiyojisinde tek bir hipotez kabul görmemekle birlikte, hipotezlerin çoğunu destekleyen kanıtlar vardır. Konu ile ilgili araştırmalar genetik, beyin görüntüleme, nörokimyasal değişiklikler ve psikososyal nedenleri belirlemeye yönelik olarak sürdürülmektedir. Son araştırmalar DEHB'deki tüm semptomların prefrontal kortekste yer alan farklı sinaptik devrelerdeki disfonksiyon sebebiyle olduğunu öne sürmüştür. DEHB kliniğinde rol oynayan devrelerde yer alan nörotransmitterler dopamin ve noradrenalin olması sebebiyle yapılan çalışmalarda bu sistemlere yoğunlaşmıştır.

DEHB'de çeşitli katekolaminlerdeki bozuklukların rolü olduğu belirtilmiştir. Çalışmalar, özellikle, dopamin (DA), noradrenalin (NE) ve serotonin nörotransmitterlerine ilişkin bozuklukların, DEHB semptomları üzerindeki etkisine dikkat çekmektedir (Solanto vd 2002, Bymaster vd 2002, Davids vd 2003, Russel vd 2005; Sagvolden vd 2005a, Pliszka vd 2005).

Dopaminerjik sistem beyinde iki temel yolaktan oluşmaktadır. Nigrostriatal yolak, substantia nigra A9 bölgesinden başlayarak, kaudat ve putamen yapılarını kapsayan striatuma kadar uzanır. Mezokortikolimbik yolak ise ventral tegmental alanda yer alan A10 nöron grubundan çıkarak, nucleus accumbens, tuberculum olfactorium, lateral septal nukleuslar ve amigdala gibi limbik sistem yapılarına ve prefrontal kortekse kadar uzanır (Viggiano 2004). Mezokortikal yolaktaki DA bozukluklarının, yönetici işlev zayıflıkları ve dikkat bozuklukları ile ilişkili DEHB semptomlarına neden olduğu ileri sürülmektedir. Nigrostriatal yolaktaki DA bozukluklarının ise motor becerilerdeki zayıflık,

örtük bellek işlevlerindeki bozukluk ile ilişkili DEHB semptomlarından sorumlu tutulduğu görülmektedir (Sagvolden vd 2005b).

Spontan hipertansif sıçan (SHR), Wistar Kyoto sıçanların (WKY) yavrularından oluşturulan genetik bir DEHB modelidir (Okamoto vd 1963). SHR'ler, yaşamlarının ilerleyen dönemlerinde spontan olarak hipertansif olmalarının yanı sıra doğuştan DEHB semptomlarını göstermektedirler (Sagvolden vd 2005a).

Prensip olarak hayvan modelleri, semptomatiği, tedavi yanıtları, patofizyolojisi ve etiyojisi bakımından mümkün olduğunca klinik bozukluklara benzemelidir (McKinney vd 1969, Willner vd 1986). Hayvan modelinin insan hastalıklarının geçerli modeli olduğunun düşünülmesi için hayvanların, üç minimal kriteri karşılaması gerekmektedir: Hastalığın temel semptomlarını taklit edebilmeli (görünüş geçerliliği), hastalığın etiyojisi ve patofizyolojik mekanizması gibi teorik gerekçeyi doğrulamalı (yapısal geçerlilik), genetik, nörobiyolojik veya yeni tedaviler gibi hastalığın bilinmeyen yönlerini ve yeni tedavi stratejilerini tahmin edebilmelidir (yordama geçerliliği) (Sagvolden vd 2005a, Davids vd 2003, Russell vd 2005). Bu açıdan bakıldığında SHR, her üç kriteri karşılaması nedeniyle DEHB hayvan modelleri arasında en çok çalışılan deney hayvanıdır (Sagvolden vd 2000, Sagvolden vd 2005a).

1.1. Amaç

Bu çalışma aşağıdaki hipotezleri test etmek amacıyla planlanmıştır:

- 1- DEHB'li sıçanlarda mezensefalonun ventral tegmental alanındaki mezokortikal dopaminerjik yolağa ait nöronların sayısında azalma vardır.
- 2- DEHB'li sıçanlarda mezokortikal dopaminerjik yolağın ventral tegmental alan'dan prefrontal kortekse olan projeksiyonların aksonal dallanmasında azalma vardır.
- 3- DEHB'li sıçanlarda, mezokortikal yolağın prefrontal kortekse (PFK) projekte olan liflerinin dağılımında DEHB olmayanlara göre topografik farklılık vardır.

Bu hipotezler test edilirken aşağıdaki sorularının yanıtlanması amaçlanmıştır.

1. DEHB hayvan modeli olarak kullanılan SHS'lerde, mezensefalon ventral tegmental alanda bulunan mezokortikal dopaminerjik yolağa ait nöronlarda azalma var mıdır?
2. DEHB hayvan modeli olarak kullanılan SHS'lerde ventral tegmental alandan prefrontal kortekse projekte olan mezokortikal dopaminerjik yolak liflerinin aksonal dallanmasında azalma var mıdır?

2. KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI

2.1 Dikkat Eksikliği Hiperaktivite Bozukluğu

2.1.1 Dikkat eksikliği hiperaktivite bozukluğu tanımı

DEHB, dikkat eksikliği, lokomotor hiperaktivite ve dürtüsellik ile karakterize, çocukluk çağının sık görülen, çok faktörlü, kompleks nöropsikiyatrik bozukluklarından birisidir (DSM 5, NICE vd 2013, Leung vd 2016). DEHB'nin tüm dünyadaki ortalama prevalansı % 5,29, görülme sıklığı ise çocuklarda %5-10 ve yetişkinlerde %4-5 kadardır (Polanczyk vd 2007, 2008, Farone vd 2003, Kessler vd 2006). DEHB olan çocukları yetişkinliğe kadar takip eden prospektif araştırmalarda, olguların % 50'sinden fazlasının belirtileri yetişkinliğe kadar muhafaza ettiği gösterilmiştir (Davidson vd 2008).

2.1.2 Dikkat eksikliği hiperaktivite bozukluğu tarihçesi

DEHB tarihçesi, tıbbi ve bilimsel literatürde iki yüzyıl öncesine kadar uzanmaktadır. DEHB' nin tıbbi tarihinin, yakın geçmişe kadar ilk defa 1902'de Sir George Frederich Still tarafından çocuk vakalara ilişkin tanımlamalarına dayandığı düşünülürken, en erken atfın daha öncesine dayandığı günümüzde bilinmektedir. Alman hekim Melchior Adam Weikard'ın 1775 tarihli tıp kitabında bazı hekimler dikkat bozukluğu vakalarından söz etmektedir (Stubbe vd 2000, Barkley ve Peters 2012). Bu bilgi, tıbbi literatürdeki DEHB tarihini 127 yıl daha geriye taşımaktadır. Başlangıçta anonim olarak basılan, dolayısıyla ilk yayın yılının saptanmasında zorluk yaşanan Weikard'ın tıbbi ders kitabı, bugünün DEHB tanımına oldukça benzer olan dikkatsiz, dikkati sürdürmede zorlanma, aşırı aktif ve dürtüsel yetişkinleri ve çocukları tarif etmiştir. Weikard, bozukluğun çocuk yetiştirmedeki yetersizlikten kaynaklanabileceğini ima ederek, aynı zamanda bazı biyolojik yatkınlıklar olduğunu da önermiştir (Barkley 2015). Weikard'ın kitabını 1798'de DEHB benzeri semptomların çok daha detaylı tarif edildiği "An Inquiry Into the Nature and Origin of Mental Derangement: Comprehending a Concise System of the Physiology and Pathology of the Human Mind. And a History of

the Passions and Their Effects" adlı İskoç doktoru Sir Alexander Crichton'a ait tıbbi ders kitabı izlemiştir (Palmer ve Finger 2001; Tansey vd 1984, Crichton vd 1798). Üç kitaplık bu çalışmada, zihinsel hastalıkların klinik vakalarının gözlemlerini açıklamıştır (Palmer ve Finger 2001). Crichton'ın çalışmaları on sekizinci yüzyılın sonunda DEHB varlığı için bazı kanıtlar sağlamıştır.

1902 yılında Royal College doktorlarından George Still, klinik uygulamasında (clinical practise) dikkat sürdürmede ciddi problemi olan 20 çocuğu tanımlamıştır. Still, bu 43 çocuğun davranışları üzerinde büyük bir "ahlaki kontrol kusuru" sergilediklerine ve bazı vakalarda, çocukların bu kusuru akut beyin hastalığına bağlı ikincil olarak kazandıklarına inanmıştır. Bu birçok yazara göre, DEHB tarihinin bilimsel başlangıç noktası olarak kabul edilmektedir (Still vd 1902, Conners vd 2000, Barkley vd 2015).

1908 yılında İngiltere'de aralarında Alfred Tredgold'un da bulunduğu bazı yazarlar, erken dönem beyin hasarını takiben davranış sorunları ve öğrenme güçlükleri arasında bir ilişki olduğunu belirtmiştir (Tredgold vd 1908, cited by Rothenberger ve Neumarker 2005). Bu ilişki, 1917'den 1928'e kadar dünyaya yayılan ve yaklaşık 20 milyon kişiyi etkileyen 'Ensefalitis letargica' salgından sonra hayatta kalan çocuklarda gözlenen anormal davranışlar ile doğrulanmıştır. Salgın sonrası kalıntı etkiler "postensefalitik davranış bozukluğu" olarak tanımlanmıştır (Conners vd 2000; Rafalovich vd 2001, Barkley vd 2015). Bu bozukluğu olan çocukların birçok tanımlaması DEHB'nin bazı karakteristik semptomlarını içermekte ve postensefalitik vakaların bazı davranışları DEHB'ye atfedilebilmesine karşın etkilenen çocukların çoğu, mevcut DEHB ölçütlerini karşılamamaktadır. Bununla birlikte, postensefalitik davranış bozukluğu çocuklarda hiperaktiviteye geniş bir merak uyandırmış ve bulgular DEHB kavramının bilimsel gelişimi için etkili olmuştur (Kessler vd 1980, Rothenberger ve Neumarker 2005).

1932'de Alman doktorlar Franz Kramer ve Hans Pollnow, "Bebeklik döneminin hiperkinetik bozukluğu üzerine" adlı rapor yayınlamışlardır. Ana semptomları günümüzün DEHB kavramına çok benzeyen hastalık, ensefalitis letargica salgınının kalıcı etkileri gibi benzer semptomlara sahip diğer hastalıklardan ayırt edilememiştir (Kramer ve Pollnow 1932).

1937-1941 yılları arasında hiperaktif çocukların tedavisi ile ilgili önemli bir dizi makale ortaya çıkmıştır. Davranış bozukluğu olan çocuklarda stimulan ilaçların (benzedrin) olumlu etkileri bildirilmiştir (Bradley vd 1937, Bradley ve Bowen 1940, Molitch ve Eccles 1937). Günümüz DEHB tedavisinin ilk seçeneklerinden Metilfenidat ilk defa Leandro Panizzon tarafından 1944 yılında sentezlenmiş ve 1954 yılında 'Ciba-Geigy Pharmaceutical Company' tarafından "Ritalin" ismi ile pazarlanmıştır (Panizzon vd 1944, Morton vd 2000).

1930 ve 1940'larda yapılan araştırmalar, doğum travması (Shirley vd 1939), ensefalitisin yanısıra diğer enfeksiyonlar (Meyer ve Byers, 1952), kurşun toksisitesi (Byers ve Lord 1943), epilepsi (Levin vd 1938), kafa yaralanması (Blau vd 1936, Werner ve Strauss 1941) sonucu oluşan beyin hasarı ile anormal davranışlar arasında bir ilişki olduğu fikrini desteklemiştir (Ross 1976). Bu dönemde "beyin hasarlı çocuk" kavramı ortaya atılmış ve çocuklarda hiperaktivitenin beyin hasarından kaynaklanabileceği fikri öne sürölmüştür (Strauss ve Lehtinen 1947, Kessler vd 1980, Barkley vd 2015).

1950 ve 1960 yıllarına kadar beyin hasarına dair bir kanıt gösterilememesi ile birlikte bu terim önce "minimal beyin hasarı" en sonunda ise "minimal beyin disfonksiyonu" (MBD) terimlerine dönuşmüştür (Bax vd 1963, Ross vd 1976).

1960 yıllarının başında, MBD'nin semptomları dikkatin kontrolünde bozulma, dürtüsellik ve motor fonksiyon olarak ayrılarak, bu üç semptom MBD için tanımlayıcı kriter haline gelmiştir. Dolayısıyla dikkat eksikliği, dürtüsellik ve hiperaktivitenin DEHB'yi karakterize eden üç ana semptom konsepti MBD tanımıyla oluşturulmuştur (Clements vd 1966, Conners vd 2000). İlk çıkışından beri eleştirilere uğrayan bu konsept 1980'li yıllara kadar devam etmiştir (Barkley vd 2015). Nörogelişimsel anormalliklerin varlığının spesifik olmadığı ve diğer psikiyatrik bozukluklarda da yaygın olduğu savunulmuştur (Conners vd 2000). Beyin hasarı veya disfonksiyonu olduğu bilinen çoğu vakada, hiperaktivite veya MBD konseptince kabul edilen diğer semptomların bulunmadığı gösterilmiştir (Birch 1964). MBD terimi sonunda "disleksi", "dil bozuklukları", "öğrenme güçlükleri" ve "hiperaktivite" gibi daha homojen bilişsel, öğrenme ve davranışsal bozukluklara uygulanan daha spesifik etiketlerle değiştirilmiştir (Barkley vd 2015). 1968 yılında hiperaktivite kavramı 'Çocukluktaki Hiperkinetik Reaksiyon' olarak Diagnostic and Statistical Manual (DSM)-II'ye girerek resmi tanı terminolojisine dâhil edilmiştir (DSM-II 1968, Volkmar vd 2003).

1970'lerin başında, dikkat eksikliği ve dürtü kontrolü, hiperaktiviteye göre bozukluğun daha belirgin özellikleri olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Douglas 1972). Bozukluk 1980 yılında DSM-III'te "Dikkat Eksikliği Bozukluğu (DEB) (hiperaktiviteli veya hiperaktivitesiz)" olarak yeniden isimlendirilmiştir (DSM-III 1980). 1987'de yayınlanan DSM-III-R'de, iki alt tip kaldırılarak, bozukluk "Dikkat Eksikliği Hiperaktivite Bozukluğu" olarak yeniden adlandırılmıştır (DSM-III-R 1987). 1994 yılında DSM-IV'de DEHB "dikkat eksikliği baskın tip", "hiperaktivite baskın tip" ve "bileşik tip" olmak üzere üç alt tip halinde sınıflandırılmıştır (DSM-IV 1994). DSM-V'te ise DEHB "Nörogelişimsel Bozukluklar" başlığı altında sınıflandırılmış, DSM-IV'te tanımlanan üç alt tipte değişiklik yapılmamıştır (DSM-5 2013).

2.1.3 Dikkat eksikliği hiperaktivite bozukluğu epidemiyolojisi

DEHB'nin dünyadaki prevalansı üzerine yayınlanan ilk kapsamlı sistematik derleme ve metaregresyon analizi Polanczyk ve arkadaşları tarafından 2007 yılında yayınlanmıştır. DEHB'nin tüm dünyadaki yaygınlığı % 5.29 (% 95 GA = 5.01-5.56) olarak bulunmuştur. Bu analiz, çalışmalar arasında önemli heterojenite olduğunu ortaya koymuştur ($p < 0.001$) Çalışmaların coğrafi konumu DEHB prevalans oranlarının değişkenliği ile de anlamlı şekilde ilişkili olarak bulunmuştur (Polanczyk vd 2007). Literatürün ikinci kapsamlı metaanalizine, 86 çalışma (N = 163,688 birey) dâhil edilmiş ve çocuk ve ergenlerde DEHB prevalansı 5.9% - 7.1% olarak saptamıştır (Willcutt vd 2012). 2014 yılında yapılan 135 çalışmanın dâhil edildiği çok değişkenli analizde, DEHB prevalans tahminlerindeki değişkenliğin çoğunlukla çalışmaların metodolojik karakteristikleri ile ilgili olduğu gösterilmiştir (Polanczyk vd 2014).

2.1.4 Dikkat eksikliği hiperaktivite bozukluğu etiyolojisi

Günümüzde sayısız teknik ve metodolojik gelişmeler mevcut olmasına karşın, DEHB etiyolojisi ve patofizyolojisi tam olarak bilinmemektedir (Tripp ve Wickens 2009). DEHB etiyolojisine katkı sağlayan çok sayıda faktör mevcut olsa da kanıtlar, genetik, biyolojik ve çevresel faktörleri ve bunların iç içe geçmiş etkilerinin bozukluğun oluşumuna en büyük katkıda bulunan unsur olduğunu göstermektedir (Rutter vd 2006). Bireyler arasındaki ilaç tedavilerindeki etkiğin farklı olması ve bozukluğun kalıtsal doğası araştırmacıları altta yatan nörobiyolojik etiyolojiyi incelemeye itmektedir (Tripp ve Wickens 2009). Konu ile ilgili araştırmalar genetik, beyin görüntüleme, nörokimyasal değişiklikler ve psikososyal nedenleri belirlemeye yönelik olarak sürdürülmektedir (McCraeken vd 2000).

DEHB'nin nörogelişimsel fenotipine ilişkin çalışmalar, genellikle nöral organizasyonun gelişiminde bozulma üzerinde durmaktadır. Bu bozulmanın nöronların miyelizasyonunda, budanmasında (pruning) ve özelleşmesinde (specialization) gerçekleştiği belirtilmektedir (Nigg vd 2005, Sonuga-Barke vd 2002). Bununla birlikte aile, ikiz, evlat edinme, segregasyon analizi ve moleküler genetik çalışmaları bozukluğun önemli bir genetik bileşeni olduğunu da göstermektedir (Jensen vd 1997, Farone vd 1997, Bailey vd 1999). Yapılan moleküler genetik çalışmalar, dopamin reseptörü D4 (DRD4) (LaHoste vd 1996, Benjamin vd 1996), dopamin reseptörü D2 (DRD2) (Pliszka vd 1996) ve dopamin taşıyıcı (DAT) genlerinin (Giros vd 1996) DEHB'ye duyarlılığı artırabileceğini göstermektedir. Maternal obezite, gebelik ve doğum komplikasyonları, evlilik sıkıntısı, aile işlev bozukluğu ve düşük sosyal statü ile ilişkili bulunmuştur (Offord

vd 1992, Biederman vd 1995, van der Burg vd 2017). DEHB'li çocuklarda görülen nöropsikolojik bozukluk örüntülerinin, frontal lob hasarlı yetişkinlerle benzerlik göstermesi, DEHB'li çocuklarda frontal korteks veya frontal kortekse projekte olan bölgelerde işlev kaybı olduğunu düşündürmektedir (Satterfield ve Dawson 1971, Barkley 1997). DEHB'de frontosubkortikal yollara işaret eden nörogörüntüleme çalışmaları da mevcuttur (Epstein vd 2007, Cubillo vd 2010).

DEHB'nin genetik ve çevresel nedenleri, gelişmekte olan beyni modifiye ederek, nöropsikolojik, yapısal ve fonksiyonel anormalliklerin heterojen bir profiline yol açmaktadır. DEHB'nin tek bir patofizyolojik profili olmasa da çok sayıda veri dikkat ve motor davranışları kontrol eden fronto-subkortikal-serebellar yollardaki disfonksiyona işaret etmektedir. Dahası, stimulanların etkinliği, hiperaktivitenin hayvan modelleriyle birlikte, DEHB beyin disfonksiyonunun en az bir kaynağı olarak katekolamin disregülasyonuna işaret etmektedir. Herhangi bir patogenez modeli için etiyolojik heterojenite ve çok faktörlü nedensellik göz önünde bulundurulmalıdır (Farone ve Biederman 2013).

2.1.4.1 Genetik çalışmalar

Yapılan yirmi ikiz çalışmadan ortalama kalıtsallık oranı 0.76 olarak hesaplanan DEHB, en kalıtsal psikiyatrik bozukluklardan biri olarak kabul edilmektedir (Farone vd 2005). Bununla birlikte, DEHB'nin tek bir genetik risk faktörünün tespit edilmemesi, DEHB'nin çoklu genetik risk değişkenleri arasındaki etkileşimin bir sonucu olarak ortaya çıktığını düşündürmektedir (Thapar vd 2013). Genetik araştırmalar, nörobiyolojik çalışmaların temelindeki DAT1, DRD4, dopamin reseptörü D5 (DRD5) gibi dopaminerjik yollarla ilgili genlere odaklanmıştır (Spencer vd 2005, Stanley vd 2017).

Yaygın olarak çalışılan genler seçilerek yapılan bir meta analizde, aralarında DAT1, DRD4, DRD5 de bulunduğu en az sekiz gen varyantının DEHB ile orta derecede ilişkili olduğunu göstermiştir (Gizer vd 2009).

2.1.4.2 Yapısal görüntüleme çalışmaları

Görüntüleme çalışmaları, DEHB ile ilişkili beyin boyutundaki büyük anatomik değişiklikleri ortaya koymuştur. Çalışmalardan elde edilen en tutarlı bulgu, ergenlik döneminde devam eden toplam beyin boyutunda ve nucleus caudatus, prefrontal korteks (PFK) beyaz cevheri, corpus callosum gibi bazı beyin bölgelerinin boyutlarında azalma olmasıdır (Castellanos vd 2002, Hynd vd 1993). DEHB'nin beyin total boyutta azalmanın yanı sıra frontostriatal devreleri oluşturan bölgelerde gri cevherde azalma gibi

spesifik bölgesel anormallikler ile de ilişkili olduğu gösterilmiştir (Nakao vd 2011). Saptanan diğer anormallikler ise kortikal incelmeyi içermektedir (Batty 2010). DEHB'li çocuklarda frontal lob, bazal çekirdekler, cerebellum ve parietotemporal bölgelerde yapısal defisitler ve özellikle prefrontal bölgede görülmekle birlikte kortikal maturasyonda yaklaşık üç yıl gecikme olduğu gösterilmiştir (Krain vd 2006, Shaw vd 2007).

DEHB'li bireyler ile yapılan yirmi bir yapısal görüntüleme çalışmasının meta analizinde, en fazla farklılık cerebellar vermisin posterior inferior kısmında, splenium, sağ nucleus caudatus'ta olmak üzere toplam beyin boyutunda azalma olduğu gösterilmiştir (Valera vd 2007). Tüm bu yapısal değişiklikler göz önünde bulundurulduğunda, DEHB patogenezi, bir takım beyin bölgeleri ve bağlantı devreleriyle ilgili karmaşık yapısal anormalliklerin sonucu olduğu düşünülmektedir (Cortese vd 2012).

2.1.4.3 Fonksiyonel görüntüleme çalışmaları

DEHB'nin fonksiyonel görüntüleme çalışmaları, bozukluğun patofizyolojisinde fronto-subkortikal sistemleri işaret eden yapısal çalışmalarla uyumluluk göstermektedir (Cubillo vd 2010). Fonksiyonel çalışmalardan elde edilen en tutarlı bulgu, dikkat ve inhibitör kontrolün gerekli olduğu görevler sırasında inferior frontostriatal, temporoparietal, ve cerebellar beyin bölgelerinde azalmış aktivitenin DEHB ile ilişkili olduğudur (Farone ve Biederman 2013). DEHB'nin anterior singulat, dorsolateral prefrontal, inferior prefrontal ve orbitofrontal korteksi etkileyen yaygın frontal hipoaktivite ile ilişkili olduğunu gösteren meta analiz çalışmasında bazal çekirdeklerde ve parietal kortekste de hipoaktivite bulunmuştur (Dickstein vd 2006).

Proton manyetik rezonans spektroskopisi kullanılarak, anterior cingulat cortex, PFK, bazal çekirdekler ve fronto-striato-thalamo-frontal devrelerin incelendiği çalışmaların meta analizinde, DEHB'li bireylerde kolin bileşiklerinin anormal olduğu saptanmıştır. Bu sonuçlar DEHB'li çocuk ve yetişkinlerde farklılık göstermektedir. Kolin sinyalleri çocuklarla yapılan çalışmalarda, sol striatum ve sağ frontal lobda artmış bulunurken, yetişkinlerde sağ ve sol anterior cingulat cortex'te artmış olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar hücre membranlarının anormal devrini, enerji metabolizmasının etkilerini veya kolinerjik sinir iletim anormallikleri ile ilişkili olabileceğini düşündürmüştür (Perlov vd 2009).

Tekli foton emisyon bilgisayarlı tomografisi "single photon emission computed tomography" (SPECT) veya pozitron emisyon tomografisi (PET) ile striatumdaki DAT yoğunluğunu ölçülmüştür. SPECT ve PET araştırmalarının bir meta-analizinde DAT yoğunluğunun DEHB'li hastalarda kontrollerden %14 daha yüksek olduğu sonucuna

varılmıştır. Bu bulgu, DAT'ı bloke eden stimulanların etki mekanizması ile tutarlılık göstermektedir (Fusar-Poli vd 2012).

Araştırmacılar DEHB'nin anormal nöronal bağlantısallıkla ilişkili olup olmadığını bulmak için beyin bölgeleri arasında fonksiyonel bölgelerarası bağlantıyı incelemiştir. Herhangi bir görev ile meşgul değilken dinlenme durumundaki beynin incelendiği çalışmalarda, DEHB'nin frontostriatal, frontoparietal ve frontoserebellar bölgelerde azalmış fonksiyonel bağlantısallık ile ilişkili olduğunu bulmuştur (Cubillo vd 2010).

Fonksiyonel görüntüleme çalışmalarının sonuçların, frontal-striatal-serebellar bölgelerin gelişimi ve fonksiyonundaki anormalliklerin DEHB'nin altında yattığı sonucuna ulaşan daha eski çalışmalar ile tutarlı olduğu kanıtlanmıştır (Benton vd 1991, Arnsten vd 1996, Fassbender ve Schweitzer 2006).

2.1.4.4 Nörokimyasal çalışmalar

Uzun yıllardır DEHB'li çocukların, DA ve NE geri alım inhibitörleri ve agonistleri aracılığıyla hareket ettiği bilinen ilaçlara verilen cevaplara dayanılarak, olası nörotransmitter fonksiyon bozuklukları veya dengesizlikleri üzerinde durulmaktadır (Pliszka vd 1996, Arnsten vd 2009, Tripp ve Wickens 2008). Yapılan çalışmalar sonucu günümüzde üç tip ilacın DEHB belirtilerini yönetmek için etkili olduğunu göstermektedir. Bunlardan ilki striatumda DA bloklayarak (Spencer vd 2006) DA bulunabilirliğini arttırdığı nörogörüntüleme teknikleri ile gösterilmiş olan (Swanson vd 2011) metilfenidat (Volkow vd 2012) ve amfetamindir (Riccardi vd 2008). Her iki stimulanda hippokampus ve PFK'da DA ve NE bulunabilirliğini arttırmaktadır. DEHB tedavisi için bir diğer etkin madde bir geri alım inhibitörü olan NE taşıyıcısını (NET) bloke eden atomoksetindir (Takano vd 2009). Son olarak başlangıçta bir antihipertansif ilaç olan guanfasin'in uzun salınımlı formu, $\alpha 2$ reseptör agonisti olarak nöral sinyal iletimini ince bir şekilde ayarlayarak DEHB tedavisinde seçenek oluşturmaktadır (Arnsten vd 2009).

Nörotransmitterlerin kan ve idrar metabolitleri kullanılarak yapılan erken dönem çalışmalardan tutarsız sonuçlar elde edilmiştir (Shaywitz vd 1983, 1986, Zametkin vd 1986). Bu erken çalışmalarda, DA ve NE'nin bulunabilirliğinde yetersizlik olduğu düşünülmüş ancak kesin olarak kanıtlanamamıştır. İlerleyen yıllarda katekolamin sistemlerinin periferik metabolitleri kullanılarak yapılan çalışmalarda DEHB'de bu nörotransmitterlerde disfonksiyon olduğu gösterilmiştir (Halperin vd 1997). 71 çalışmanın dâhil edildiği meta analizde DEHB'de NE artışı, 3-metoksi-4-hidroksi fenil etilen glikol azalması, feniletilenamin azalması ve monoamin oksidaz azalması olduğu sonucuna ulaşılmıştır (Scassellati vd 2012).

İnsan ve hayvan çalışmalarından elde edilen sonuçlar DA ve NE'nin DEHB patofizyolojisinde rol oynayabileceğini, DEHB semptomlarına kortikostriatoallidal sistemin aracılık edebileceğini (Papa vd 1998) ve beyinde DA taşıyıcı yoğunluğunun artışının bozukluğun hücrel mekanizmalarından biri olabileceğini göstermektedir (Roessner vd 2011). Bu ve benzer diğer bulgular araştırmacıların beyinde tanımlanan üç DA yolağından (mezolimbik, mezokortikal ve nigrostriatal) birindeki hipofonksiyonun yol açtığı, değişmiş DA fonksiyonuna dayanan DEHB'nin dinamik nörogelişimsel teori önermelerine yol açmıştır (Sagvolden vd 2005b).

İleriki bölümlerde DEHB'nin beyin yapısı ve kimyası ile ilişkisine daha detaylı değinilecektir.

2.1.5 Dikkat eksikliği hiperaktivite bozukluğu hayvan modelleri

Hayvanlar, kompleks insan davranışlarını incelemek için çoğu zaman tercih edilmese de insanlarla benzer temel davranışlara sahiptir. Hayvan modeli oluşturulabilen hastalıkların patofizyolojilerinin aydınlatılması, modeli olmayan hastalıklara kıyasla daha kolaydır (Russell vd 2005). Hayvan modelleri bozukluğu veya hastalığı anlamak ve yeni tedavi stratejilerinin keşfedilmesine yardımcı olmak için kullanılmaktadır. Hayvan modelleri klinik araştırmalara göre bazı avantajlar sağlamaktadır. Daha basit sinir sistemi, kolay yorumlanabilen davranışlar, genetik homojenlik, kolay kontrol edilebilen çevre ve daha fazla müdahale şansı ile hastalıkların altında yatan nörobiyolojik değişikliklerin belirlenmesini kolaylaştırmaktadır (Sagvolden vd 2005a, Kooija vd 2007). Örneğin DEHB'nin hayvan modelleri kullanılarak yapılan çalışmaları, insan çalışmalarında kafa karıştırıcı olan sosyo-ekonomik statü, ebeveyn davranışları ve okul çevresi gibi etkenleri ortadan kaldırmaktadır (Paule vd 2000, Davids vd 2003).

Hayvan modelleri, semptomatiği, tedavi yanıtları, patofizyolojisi ve etiyolojisi gibi mümkün olduğunca çoğu detayı ile klinik bozukluklara benzemelidir (McKinney vd 1969). Hayvan modelinin insan hastalıklarının geçerli modeli olduğunun düşünülmesi için hayvanların bazı kriterleri karşılaması gerekmektedir (Willner vd 1986, Sarter vd 1992). DEHB hayvan modeli üç geçerlilik kriterini (görünüş geçerliliği, yapısal geçerlilik ve yordama geçerliliği) sağlamalıdır. Model hastalığın temel semptomlarını taklit edebilmeli (görünüş geçerliliği), hastalığın etiyolojisini ve patofizyolojik mekanizması gibi teorik gerekçesini doğrulamalı (yapısal geçerlilik), genetik, nörobiyolojik veya yeni tedaviler gibi hastalığın bilinmeyen yönlerini ve yeni tedavi stratejilerini tahmin edebilmelidir (yordama geçerliliği) (Sagvolden 2 vd 005a).

DEHB hayvan modellerinde görünüş geçerliliği kriterleri arasında motor dürtüsellik, dikkati sürdürmede eksiklik ve hiperaktivite; yapısal geçerlilik kriterleri

arasında genetik, nöropatoloji, nörotransmitter disfonksiyonu, güçlendirme gradyanında gecikme, motor kontrol problemi, psikostimulan etkisi sayılmaktadır (Sagvolden 2005a).

Bu kriterler göz önünde bulundurularak çok sayıda hayvan modeli geliştirilmiştir (Sagvolden 2005a). Bunlar genetik, toksin maruziyetli, seçici beyin hasarlı ve çok yönlü modeller olarak sınıflandırılabilir (Davids vd 2003). Genetik modeller içinde SHR (Sagvolden vd 2005b), DAT knock out (DAT-KO) fare (Giros vd 1996, Trinh vd 2003), Coloboma mutant fare (Heyser vd 1995), Acallosal I/LnJ fare (Magara vd 2000), Naples uyarılmışlığı yüksek sıçan (NHE) (Viggiano vd 2002), tiroid reseptör β mutant fare (Siesser vd 2006) bulunmaktadır. Toksin maruziyetli DEHB modelleri prenatal, postnatal veya neonatal olarak nikotin (Thapar vd 2003), etanol (Gibson vd 2000), 6-OHDA, kurşun (Taylor vd 1998), poliklorlu bifenil (Safe vd 1994), anoksi (Dell'Anna vd 1999), hippocampal X-ray (Highfield vd 1998) maruziyetiyle oluşturulmaktadır. Selektif beyin hasarlı modeller arasında ise nucleus accumbens, nucleus subthalamicus ve cerebellum lezyonlu sıçanlar bulunmaktadır (Sagvolden vd 2005a).

Progenitör WKY sıçanlarından yetiştirilen genetik bir model olan SHR, en iyi karakterize edilmiş, en sık kullanılan ve en uygun DEHB modelidir (Okamoto ve Aoki vd 1963, Sagvolden vd 2005a). SHR, DEHB'nin dikkat eksikliği, hiperaktivite ve dürtüsellik olan ana semptomlarını göstermektedir. Bu semptomlar, DEHB de olduğu gibi pekiştireçler seyrek olduğunda zamanla gelişmektedir (Johansen vd 2005, Li vd 2007). SHR, DEHB modeli olarak yukarıda listelenen geçerlilik kriterlerinin çoğunu yerine getirmekte ve DEHB'nin klinik olguları ile iyi karşılaştırılabilir (Sagvolden vd 2000).

2.1.5.1 Spontan hipertansif sıçan

SHR'ler Kyoto, Japonya'da, yüksek sistolik kan basıncına sahip WKY türünün doğal genetik varyantlardan yararlanılarak, seçici olarak çiftleştirilmesi ile elde edilmişlerdir. Doğumda normotansif olan SHR'lerde kan basıncı 5-6. haftalarda yükselmeye başlamaktadır. SHR'ler yaklaşık 13 haftalık olduklarında hipertansiyonlu (sistolik basınç 190 mmHg'nin üzerinde) olarak kabul edilmektedir (Conrad vd 1995, Amenta vd 2010). SHR'lerin çiftleştirilme süreci boyunca, açık alan testlerinde normotansif WKY'lerden daha aktif olduğu gösterilmiştir (Hendley vd 1985, Van Den Buuse ve De Jong 1989, Wultz vd 1990).

SHR'yi DEHB'nin bir modeli olarak inceleyen çalışmaların çoğu Oslo Üniversitesi'nde Sagvolden ve arkadaşları tarafından yapılmıştır. Çalışmalardan elde edilen birçok bulgu DEHB ile ilişkili davranışlarla paralellik göstermektedir. Örneğin, sıçanlar operan çemberin belirli bir alanında hareketsiz kalmaları için pekiştirildiğinde,

SHR'lerin gerekli hareketsizlik süresinin WKY'ye göre sekiz saniye daha kısa olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte, gerekli hareketsizlik süresi arttıkça, SHR'lerin hareketi artmakta ve SHR'ler hedef süre boyunca hareketsiz kalamamaktadır (Wultz ve Sagvolden 1992). SHR'lerin hareketsiz kalma süreleri uzatıldığında, hedef süre boyunca hareketsiz kalamamaları, DEHB'li çocuklardaki yerinde duramamaya, erken davranışsal pekiştireçlere gecikmiş pekiştireçlerden daha duyarlı olmaları DEHB'li çocukların küçük fakat yakın ödülleri, büyük fakat geciktirilmiş ödüllere tercih etmelerine benzediği düşünülmektedir (Wultz ve Sagvolden 1992, Johansen vd 2005, 2007). DEHB'li bireylerde mezolimbik dopaminerjik yolaktaki disfonksiyon sebebiyle gözlenen ertelemeyen kaçınma (delay aversion) davranışı SHR'ler tarafından da sergilenmektedir (Sonuga-Barke vd 2003). Bu benzerlikler, DEHB hayvan modeli olarak SHR'nin görünüş geçerliliğini kuvvetle desteklemektedir (Sagvolden vd 1992, 1998).

SHR'lerin öğrenme değerlendirmelerinden elde edilen sonuçlar da DEHB'li çocuklarınkı ile paralellik göstermektedir. Öğrenme görevi yanıtları çok değişkenlik gerektirdiğinde SHR'ler WKY'ler kadar doğru iken, ardışık yinelemeleri gerektiren görevlerde SHR'ler kötü performans göstermektedirler (Hunziker vd 1996). Benzer bulgular DEHB'li çocuklarda da gösterilmiştir (Hynd vd 1989).

SHR'lerin DEHB'li bireylerle paralel olarak daha küçük vermiş cerebelli, nucleus caudatus ve putamene sahip olduğu ve SHR'lerde PFK'da DRD4 gen ekspresyonunda ve protein sentezinde azalma olduğu gösterilmiştir.

DEHB'nin erkek çocuklarında kız çocuklarında daha yüksek prevelansta gözlenmesi karakteristiğini SHR karşılamamakla birlikte, dişi ve erkek sıçanların gösterdiği DEHB'nin davranışsal özellik türlerinde farklılıklar bulunmaktadır (Bucci vd 2008).

SHR modelinin yapısal geçerliliğinin değerlendirilmesinde SHR ve WKY'de üç aday dopaminerjik genlerin (DRD2, DRD4 ve DAT-1) sekanslanması sonucu DRD2 ve DRD4 genlerinde herhangi bir fark bulunmazken DAT-1 geninde birkaç varyasyon bulunmuştur (Mill vd 2005). DAT translasyonunun regülasyonunda olası bir bozulma, DAT geni ekspresyonunun postnatal ilk ay boyunca SHR'nin mezensefalonda geçici olarak azaldığı ve erişkin SHR'de kontrol deneklere kıyasla arttığı bulgularıyla uyumluluk göstermektedir (Watanabe vd 1997, Leo vd 2003). SHR'deki değişmiş DA fonksiyonu, bu hayvan modeli için yapısal geçerliliği sağlamakta ve DEHB'nin teorik gerekçesi ile uyumluluk göstermektedir (Sagvolden vd 2000, 2005a). SHR'lerde DEHB'nin öğrenme teorisi perspektifi ile ilişkili bir dizi Uluslararası Çok merkezli ADHD Gen projesi (International Multi-center ADHD Gene Project, IMAGE) kapsamında incelenen genlerde belirgin değişiklikler bulunmuştur (Sagvolden ve Archer 1989, Sagvolden vd 2005b, Johansen vd 2009, Johnson vd 2009).

DEHB'li çocuklara benzer olarak SHR'lerde de beyin hacminde azalma görülmektedir (Bendel ve Eilam 1992). Davranışsal ve yapısal benzerliklerinin yanı sıra, SHR DEHB'ye benzer bir beyin patolojisi sergilemektedir. Özellikle PFK, oksipital korteks, hippocampus olmak üzere SHR'lerde kontrollere kıyasla daha küçük beyin hacmi ve daha az sayıda nöron bulunmaktadır (Sabbatini vd 2000, Mignini vd 2004). SHR'lerde DA hipofonksiyonunun yanı sıra NE sisteminin de bozulduğu gösterilmiştir (Russell vd 1995, 1998, 2003). DEHB'li çocuklarla uyumlu olarak SHR'de de siklik adozin monofosfat oluşumu (Marcil vd 1997) ve kalsiyumun nöronlara akışı (Lehohla vd 2004) ikinci haberci sistemlerinin bozulduğu kanıtlanmıştır. DEHB modeli olarak SHR'nin görünüş ve yapısal geçerliliğine ek olarak, SHR'lerdeki davranışsal ve kognitif bozulmalar, d-amfetamin ve d,l-metilfenidat'ı içeren stimulan tedavisine yanıt vermektedir (Myers vd 1982).

Davranışsal, genetik ve nörobiyolojik verilere dayanılarak Charles River (Almanya) firmasından (SHR/NCrl) elde edilen SHR'lerin DEHB'nin en iyi geçerliliği olan hayvan modeli olduğu ve Harlan firmasından (Birleşik Krallık) elde edilen WKY'lerin ise en uygun kontrol olduğu gösterilmiştir (Sagvolden vd 2009, 2012).

SHR'nin DEHB modeli olarak kullanılmasının tek kısıtlılığı bu sıçanlardaki hipertansiyon olarak görülmektedir. Hipertansiyon, beyin fonksiyonları üzerinde olumsuz etkilere sahip olduğu için SHR'ler kullanılarak yapılan DEHB çalışmalarında hatalı sonuçlara neden olabilmektedir. Bu sebeple SHR'lerin kullanıldığı DEHB çalışmalarında hipertansiyonunun kafa karıştırıcı etkisini ortadan kaldırmak için prehipertansif, prepubertal 3-4 haftalık SHR'ler ile çalışılması önerilmektedir (De Jong vd 1995, Sagvolden vd 2005a,2012).

2.1.6. Dikkat eksikliği hiperaktivite bozukluğu ile ilişkili anatomik yapılar ve nöral devreler

DEHB'nin etiyolojisi tam olarak aydınlatılamamış olmasına rağmen, bozukluğun semptomlarının yürütücü işlev (Yİ) bozulmalarından kaynaklandığı düşünülmektedir. DEHB ile ilişkili anatomik yapıları ve nöronal bağlantıları tanımlayabilmek için semptomlara dayalı yaklaşımlar izlenmektedir (Schachar vd 2000, Castellanos ve Tannock 2002, Willcutt vd 2005). Yİ'ler ve DEHB belirtileri birbirine bağlı görüldüğünden, bilişsel süreçlere aracılık eden nöral mekanizmaların aydınlatılmasının, ilişkili klinik semptomların nasıl ortaya çıktıklarının anlaşılmasına yardımcı olacağı düşünülmektedir (Petrovic ve Castellanos 2016).

DEHB'nin Yİ bozulmalarından kaynaklandığı hipotezi, prefrontal lezyonların davranışsal hiperaktivite, dikkat dağınıklığı veya dürtüselliğin yanı sıra yürütücü işlev

görevlerinde bozulmalara neden olduğu gözlemlerine dayanmaktadır (Fuster vd 1997). Yürütücü işlevler kendini düzenleme, karar verme ve hedefe yönelik davranış gibi bilişsel işlevin çeşitli bileşenlerini gerektiren karmaşık koşullarda performansı optimize etmeye yardımcı olan nöro-bilişsel süreçler dizisi olarak tarif edilmektedir (Robbins vd 2009, Riggs vd 2012). Dikkatin sürdürülmesi, motor hiperaktivite ve dürtüsellüğün kontrolü gibi yüksek kognitif fonksiyonlar PFK tarafından gerçekleştirilmektedir (Arnsten vd 2009). Bu sebeple DEHB patofizyolojisi için çoğu nöral modelde PFK ve onun striatum ve diğer subkortikal yapılar ile bağlantıları öne çıkmaktadır (Halperin vd 2006). Yapılan bir meta analiz çalışması sonucunda, DEHB'nin Yİ alanlarının en az bir alt grubundaki spesifik zayıflamalarla ilişkili olduğu sonucuna varılmış ve bu sonuç yakın geçmişte yapılan bir başka meta analiz çalışmaları ile desteklenmiştir (Pennington ve Ozonoff 1996, Willcutt vd 2005)

PFK, temporal ve parietal assosiyasyon kortekslerine ve subkortikal yapılara (top-down) gönderdiği projeksiyonlar aracılığıyla dikkat ve düşünce gibi Yİ'lerin regülasyonunda rol oynamaktadır (Arnsten vd 2005). Top-down modülasyon, dikkat ve çalışma belleği gibi Yİ'ler için temel oluşturmaktadır (Gazzaley vd 2005). Top-down modülasyon ise nöral ağların iletişimi ile sağlanmaktadır. Bu hipotezi kanıtlayan bulgular maymunlarda yapılan parietal, frontal ve görsel assosiyasyon korteksleri arasındaki karşılıklı (resiprokal) kortiko-kortikal projeksiyonların anatomisini tanımlayan yolak izleme çalışmalarından elde edilmiştir (Webster vd 1994). DEHB çalışmalarından elde edilen en tutarlı bulgu, frontostriatal ve fronto-parietal devrelerdeki nöral aktivitede bozulma olduğudur. Frontal temelli nöral devrelerdeki (fronto-striato-talamo-kortikal) nöromodülatör etkileri sebebiyle, DEHB'de bozulan Yİ'lerde katekolaminlerin rol oynadığı düşünülmektedir (Dickstein vd 2006). Ayrıca DEHB'deki en etkin tedavi seçeneğinin katekolaminerjik sistem aracılığıyla olması da bu düşüncüyü desteklemektedir (Arnsten vd 2005).

Yapılan nörokimyasal çalışmalar, DEHB patofizyolojisinde nörotransmitter disregülasyonun rolü olduğunu desteklemektedir (Brozoski vd 1979, Granon vd 2000). Özellikle dopaminerjik yolakların DEHB patofizyolojisinde yer aldığı düşüncesi, DEHB tedavisinde katekolamin agonistleri olan psikostimülan ilaçların kullanılması gözlemlerinden kaynaklanmıştır (Wender vd 1975). Metilfenidat'ın DA taşıyıcısının aktivitesini inhibe ettiği, DA'nın ekstrasinaptik seviyelerini arttırdığı ve DEHB'li bireylerde etkili tedavi yöntemi olduğu gösterilmiştir (Volkow vd 2004). Bir başka psikostimülan ilaç olan amfetaminin, DA seviyelerini DA'nın salımını değiştirerek arttırdığı gösterilmiştir (Fan vd 2010). Amfetamin presinaptik nöronun sinaptik yarığın içine DA akışı sağlamak için DAT ile etkileşime girmektedir (Kuczenski vd 1975).

DEHB'de DA disregülasyonu hipotezini destekleyen diğer kanıtlar hayvan modelleri ve beyin görüntüleme çalışmalarından elde edilmiştir. DEHB hayvan modellerinde yapılan çalışmalarda DA fonksiyonunda disregülasyon olduğu gösterilmiştir (Leo vd 2003). En eski DEHB hayvan modeli neonatal sıçanlara 6-hidroksidopamin uygulaması sonucu DA deplesyonu ile oluşturulmuştur (Shaywitz vd 1976). Bunun yanı sıra genetik modeller de kanıt sağlamıştır. SHR'nin DEHB bulguları ile uyumlu özellikleri DA ajanları ile azalmaktadır (Boix vd 1998). Naples yüksek ve düşük uyarılabilirlikli sıçanlarda ön beyin kortikal ve limbik alanlarında DA fonksiyonunda değişiklikler tespit edilmiştir (Gonzalez-Lima vd 2000). Coloboma farede, bu değişiklikler DAerjik sinaptik veziküllerinin presinaptik plazma membrana yanaşması (docking) ve füzyonuna aracılık eden spesifik yüzey proteinlerindeki değişmiş aktivite ile ilişkili bulunmuştur (Hess vd 1996). Bu, fare kromozomunun SNAP-25 de dâhil olmak üzere birkaç geni içeren 2-cM bölgesinin silinmesinden kaynaklanmaktadır ve bu etkiler transgenik yerleştirme ya da stimulan tedavisi ile tersine çevrilebilmektedir (Steffensen vd 1999). Kanıtların ikinci grubunu oluşturan beyin görüntüleme çalışmalarından, striatal DAT seviyelerinin regülasyonunun değiştiği bulgusuna ulaşılmıştır. Araştırmalar arasında metodolojik farklılıklar sebebiyle tutarsızlıklar bulunmaktadır (Volkow vd 2009, Gonon vd 2009).

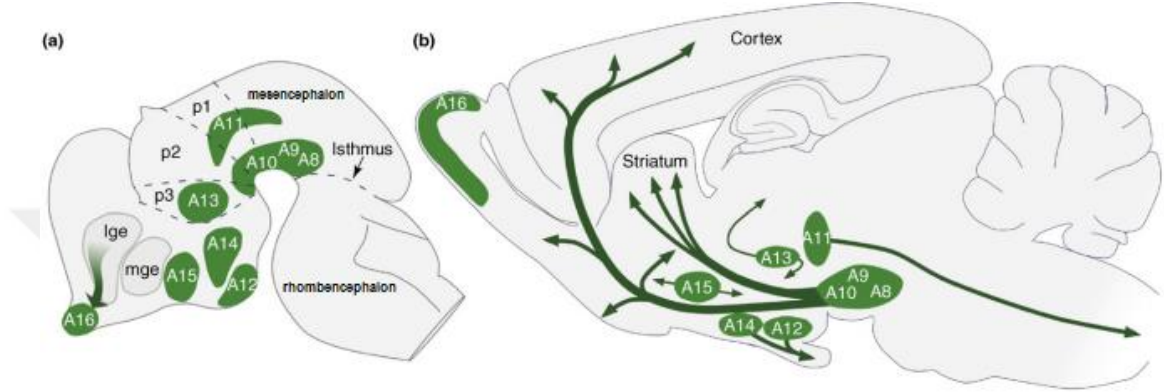
2.1.6.1 Dopamin sisteminin insan beynindeki anatomik organizasyonu

2.1.6.1.1 Dopamin sentezi ve dopaminerjik nöronlar

Beyinde katekolaminerjik nöronların keşfedilmesi 1960 yılında formaldehit histofloresan metodların kullanılmasıyla mümkün olmuştur (Falck vd 1962). İlk olarak beyinde katekolamin olarak iki ayrı (NE ve DA) nöronal sistem olduğu gösterilmiş (Carlsson vd 1962), iki yıl sonra ise sıçan beyinde katekolamin ve serotonin içeren nöronların dağılımları detaylı olarak gösterilmiştir (Dahlström ve Fuxe 1964). Medulla oblongata'dan hipotalamusa kadar dağılım gösteren oniki grup (A1-A12) katekolaminerjik nöron grubu tanımlanmıştır. Sonrasında adrenalın içeren üç hücre grubunun (C1-C3) yanı sıra, diencephalon, bulbus olfactorius ve retinada bulunan ek beş (A13-A17) hücre grubu daha eklenmiştir (Hökfelt vd 1984).

DA, dopaminerjik nöronlarda tirozin aminoasidinden tirozin hidroksilaz (TH), aromatik aminoasit dekarboksilaz (AADK) ve dopamin- β -hidroksilaz (DBH) enzimleriyle sentezlenmektedir. 1970'li yıllarda katekolamin sentezleyen bu enzimlere yönelik immünohistokimyasal yöntemlerin bulunmasıyla, katekolamin sistemini daha detaylı haritalandırmak mümkün olmuştur ve bu yeni teknikler ile farklı katekolaminler arasında

daha doğru bir ayırım yapılması sağlanmıştır (Dahlström ve Fuxe 1964). Şekil 2.1'de retina hariç dokuz büyük dopaminerjik hücre grubunun TH immünohistokimyası ile ortaya konulan dağılımı, embriyonik gelişim (Şekil 2.1a) ve yetişkin (Şekil 2.1b) dönemdeki sıçan beyninin sagittal kesitlerinde şematik olarak gösterilmektedir. Tüm bu nöronal grupların ortak özelliği DA nörotransmitterini kullanmasına karşın her grup birbirinden farklı işlev göstermekte ve bu nöronların moleküler yapımları da birbirinden farklılık göstermektedir (Smidt vd 1997).



Şekil 2.1 DA nöron gruplarının gelişmekte (a) ve yetişkin (b) kemirgen beyninde dağılımı. (a)'da gelişmekte olan kemirgen beynindeki DA nöron gruplarının yerleşimi, (b)'de ise DA yetişkin kemirgen beynindeki DA nöron gruplarının yerleşimi ve dopaminerjik hücre gruplarının temel projeksiyonları oklar ile resmedilmiştir. Lge: lateral ganglionic eminence, mge: medial ganglionic eminence, p1–p3: prosomer 1–3. (Björklund ve Dunnett 2007'den alınmıştır).

İnsan mesencephalon'unda DA sentezinin hız kısıtlayıcı enzimi olan TH'nin mRNA ekspresyonunun yüksek olduğu gösterilmiştir. TH, bütün katekolaminerjik nöronlar için fenotipik bir marker olarak kullanılmaktadır (Marin 2005). TH'nin insan fetal hayatının dört buçukuncu haftasından itibaren mesencephalon'da bulunduğu gösterilmiştir (Freeman vd 1991, Verney vd 1991, Zecevic ve Verney 1995). TH hücre gruplarının bu gelişim aşamasındaki dağılımı, mezensefalik ve hipotalamik dopaminerjik gruplara karşılık gelmektedir (Zecevic ve Verney 1995). Bununla birlikte, insan fetüsünde yaklaşık 19 haftaya kadar TH-immünreaktif mezensefalik nöronlar, substantia nigra pars compacta (SNpc), ventral tegmental alan (VTA) ve retrorubral alanda (retrorubral field, RRF) farklı dağılım gösteren yetişkinle benzer bir organizasyona sahip olmamaktadır (Aubert vd 1997).

2.1.6.1.1.1 Mezensefalik dopaminerjik nöronlar

Mezensefalik dopaminerjik (mDA) nöronlar ödül, motivasyon, öğrenme, bellek, Yİ'ler ve motor davranışlarda önemli rol oynamaktadır (Li vd 2013). Bu nedenle bir çok

psikiyatrik ve gelişimsel bozuklukla ilişkilendirilen mDA nöronlarının spesifik olarak kümelenmesi incelenmiştir (Winterer vd 2004, Tye vd 2013). Anatomik ve fonksiyonel olarak üç farklı nöron grup olarak tanımlanan mDA nöronları, toplam dopaminerjik nöronların %75'ini oluşturmaktadır ve A8, A9 ve A10 gruplarına ayrılmaktadır (Şekil 2.2) (Carlsson vd 1962, Dahlström ve Fuxe 1964). Bu nöronlar beynin başka bir yerinde var olan diğer DA nöron gruplarından belirgin olarak farklılık göstermektedir. Bu farklılıklar mDA sistemindeki moleküler bulguları değerlendirmek için önemlidir (Smits vd 2006). mDA nöronlarının en büyük grupları SN ve VTA olmak üzere komşu iki çekirdekte lokalizedir (Smits vd 2006, Roeper vd 2013). Bu iki komşu çekirdekteki nöronların ateşlenme ve projeksiyon paternleri birbirinden farklılık göstermektedir (Margolis vd 2003, 2006).

A8 grubunu işlevleri ve bağlantıları iyi tanımlanmamış olan RRF'de bulunan nöronlar oluşturmaktadır. RRF'nin sadece dorsal striatuma, limbik sisteme ve PFK'ya olan projeksiyonları tanımlanmıştır (Björklund ve Dunnett 2007, Ikemoto 2007). Bununla birlikte, son çalışmalar, farklı projeksiyonlara ve elektrofizyolojik özelliklere ve moleküler heterojeniteye sahip daha birçok mDA nöron grubu olduğunu ileri sürülmektedir (Roeper vd 2013).

A9 grubundaki mDA nöronları SNpc'den dorsal striatum'a projekte olan nigrostriatal (mesostriatal) DA sisteminin oluşturmaktadır. A9 grubu nöronları istemli hareketlerin düzenlenmesinde rol oynamaktadır. SNpc'de bulunan nigrostriatal yolağı oluşturan mDA nöronlarının kaybı Parkinson Hastalığı ile karakterizedir (Sulzer vd 2007).

A10 mDA nöronlarının hücre gövdeleri VTA'da yer almaktadır. Bu nöronlar özellikle PFK olmak üzere mesokortikal yolak ile serebral kortekse ve mezolimbik yolak aracılığıyla hippocampus, amigdala, nucleus accumbens (NAc), limbik korteks gibi limbik sistem yapılarına projekte olmaktadır. VTA'dan PFK'ya projekte olan nöronlar Yİ'ler ve dikkat ile ilişkiliyken, limbik sistem yapılarına projekte olan nöronlar ödül ilişkili bilişsel süreçlerde rol oynamaktadır (Bentivoglio ve Morelli 2005, Sesack vd 2010). Mezokortikal yolaktaki DA bozukluklarının, yönetici işlev zayıflıkları ve dikkat bozuklukları ile ilişkili DEHB semptomlarına (Tzschentke ve Schmidt 2000, Solanto vd 2002), mezolimbik yolaktaki DA bozukluklarının ise bağımlılık, depresyon ve şizofreniye neden olduğu ileri sürülmektedir (Carlsson vd 2001).

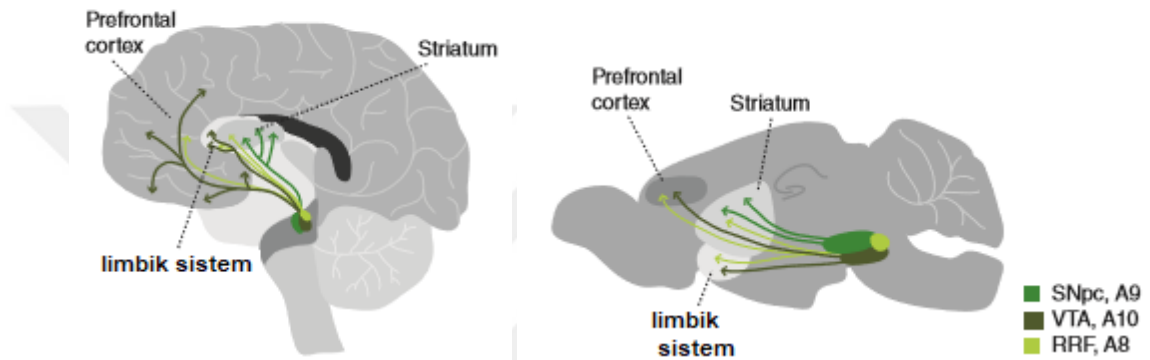
Primatlarda mDA nöronal sisteminin boyutu ve karmaşıklığı artmaktadır. Kemirgenlerde üç hücre grubundaki (A8-A10) TH pozitif hücrelerin bilateral toplam sayısı 20000-30000 (fare), 40000-45000 (sıçan) iken, maymunlarda 160000-320000, insanlarda ise yüzde yetmişinden fazlası SN'de yerleşik olmak üzere 400000-600000 aralığındadır (Bentivoglio ve Morelli 2005). Bu hücre sayısındaki artış, primatlarda ve insanda kemirgenlerden daha fazla mDA afferentleri tarafından daha yoğun olarak

innerve edilen özellikle neokorteksdeki DA innervasyon alanlarının genişlenmesiyle eşleşmektedir. Kemirgenlerde, kortikal DA innervasyonu, frontal, singulat ve entorinal korteks alanlarıyla büyük ölçüde sınırlanırken, primatlarda DA innervasyon bölgesi tüm kortikal tabakayı kapsamaktadır (Lewis ve Sesack 1997, Lewis vd 1998). Bu yaygın kortikal projeksiyon, mDA nöron kompleksinin tüm bölümlerinden kaynaklanmaktadır (Williams ve Goldman-Rakic 1998).

Bağlantı ve morfolojik özelliklere dayalı olarak, mDA nöronları dorsal ve ventral tabaka (tier) ayrılmaktadır. Dorsal tabaka, VTA ve SN'nin dorsal tarafındaki nöronları, ventral striatal, limbik ve kortikal alanları innerve eden A8 grubu nöronlarını ve dorsal striatumun matriks kompartmanını içermektedir (Lynd-Balta ve Haber 1994). Dorsal tabakada bulunan hücreler yuvarlak veya fusiform şekilli, kalbindin pozitif ve göreceli olarak düşük DAT ekspresyonuna sahip hücrelerdir. Ventral tabaka ise, VTA ve SN'nin ventral kısımlarında yer alan daha yoğun paketlenmiş, anguler hücreleri içermektedir. Ventral tabaka hücreleri yüksek DAT ekspresyonuna sahip, Calbindin negatif ve çoğunlukla bir iyon kanalı proteini olan GIRK2 için immünopozitif hücrelerdir. Ventral tabaka nöronları innerve ettikleri striatumun patch kompartmanına kadar uzanmaktadır. Bu nöronların çoğu substantia nigra pars reticulata'ya (SNpr) projekte olan belirgin dendritlere sahiptir (Prensa vd 2001). Dorsal tabakanın kalbindin pozitif nöronları daha kompleks bir popülasyon oluşturmaktadır. Bu nöronlar yalnızca limbik ve kortikal alanlara değil aynı zamanda striatumun matriks kompartmanına da projekte olmaktadır (Gerfen vd 1987, Fallon ve Loughlin 1995). Böylelikle mDA nöronları, morfolojileri, önbeyin projeksiyon paternleri ve moleküler belirteçleri farklı olan karmaşık bir organizasyon sergilemektedir (Björklund ve Dunnett 2007).

mDA nöronlarının gelişimi ventral mesencephalon'un tetikleme ile embriyonik sekizinci günde başlamaktadır. mDA nöronlarının gelişimi spesifikasyon, diferansiyasyon ve migrasyon gibi erken gelişim basamaklarını ve nörit gelişimi, rehberliği, budanması, sinaps oluşumu gibi geç basamakları içeren karmaşık ve çok basamaklı bir süreçtir. Bazı erken basamakların tanımlanmasında önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. Bunlar bölgesel spesifikasyonu ve hücresele diferansiyasyonu düzenleyen transkripsiyonel belirleyicilerin tanımlanmasını içermektedir (Smidt vd 2007). mDA nöron gelişiminin geç basamaklarının daha az anlaşılmasına rağmen, son çalışmalarda, mDA nöronal bağlantısının kurulmasında yer aldığı düşünülen hücresele ve moleküler sinyaller tanımlanmıştır. mDA sisteminin ilk çeşitliliği, nöronların spesifikasyon, migrasyon ve diferansiyasyon süreçlerinin kontrollü ontogenetiği ile oluşturulmaktadır (Van den Heuvel ve Pasterkamp 2008). Diferansiyasyon esnasında mDA nöronları matur dopaminerjik bir fenotip kazanmakta, SNpc, VTA ve RRF'yi oluşturmak üzere göç etmekte ve hedef önbeyin yapılarına aksonal projeksiyonlar göndererek sinaps ve bağlantılar

oluşturmaktadır. Başlıca gelişim basamaklarının her biri belirli gen gruplarının ekspresyonu ile karakterize edilmektedir. Farklılaşmış mDA nöronlarını tanımlamak için en yaygın kullanılan belirteç, DA sentezinde hız sınırlayıcı enzim olan TH'dir. Bununla birlikte, mDA nöron kimliğinin doğrulanması için DA taşıyıcı SLC6A3'ün, veziküler monoamin taşıyıcısı SLC18A2'nin ve dopa dekarboksilazın (DDK) ve mDA nöron-spesifik eşlenmiş homeodomain transkripsiyon faktörü 3'ün (PITX3) ekspresyonu gibi diğer ortak mDA özelliklerinin de değerlendirilmesi gerekmektedir (Smidt vd 1997, Blaess ve Ang 2015).

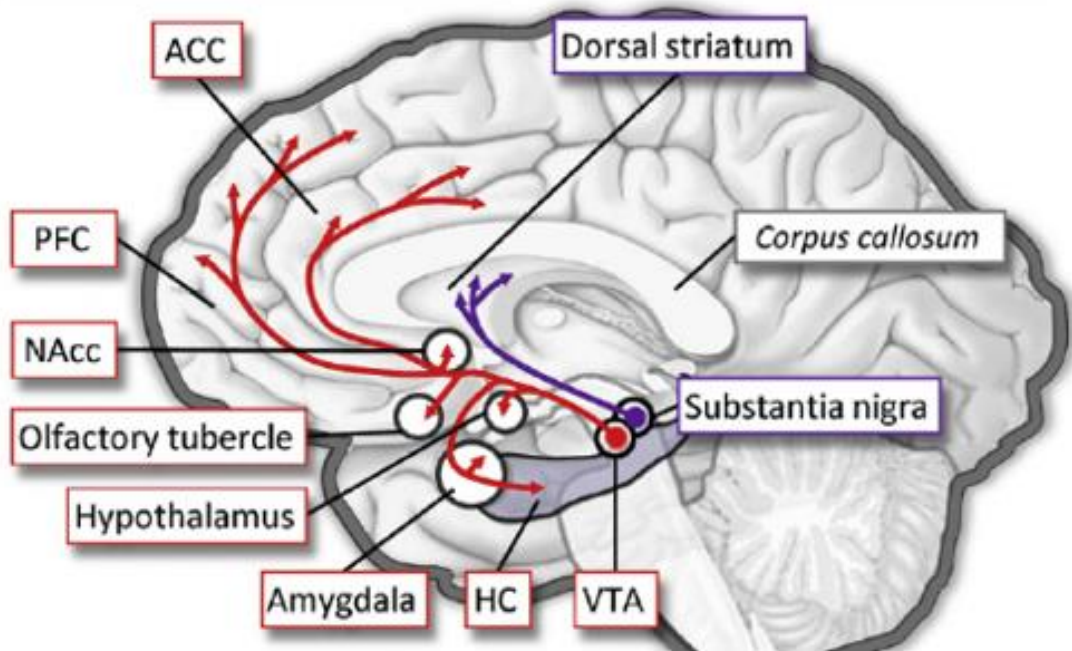


Şekil 2.2 İnsan ve fare beyininde mDA nöronlarının lokalizasyonu. Soldaki resimde insan beyininde sağdaki ise fare beyininde sagittal kesitleri gösterilmektedir. SNpc: Substantia Nigra pars compacta, VTA: ventral tegmental alan, RRF: retrorubral alan (Blaess ve Ang 2015'den alınmıştır)

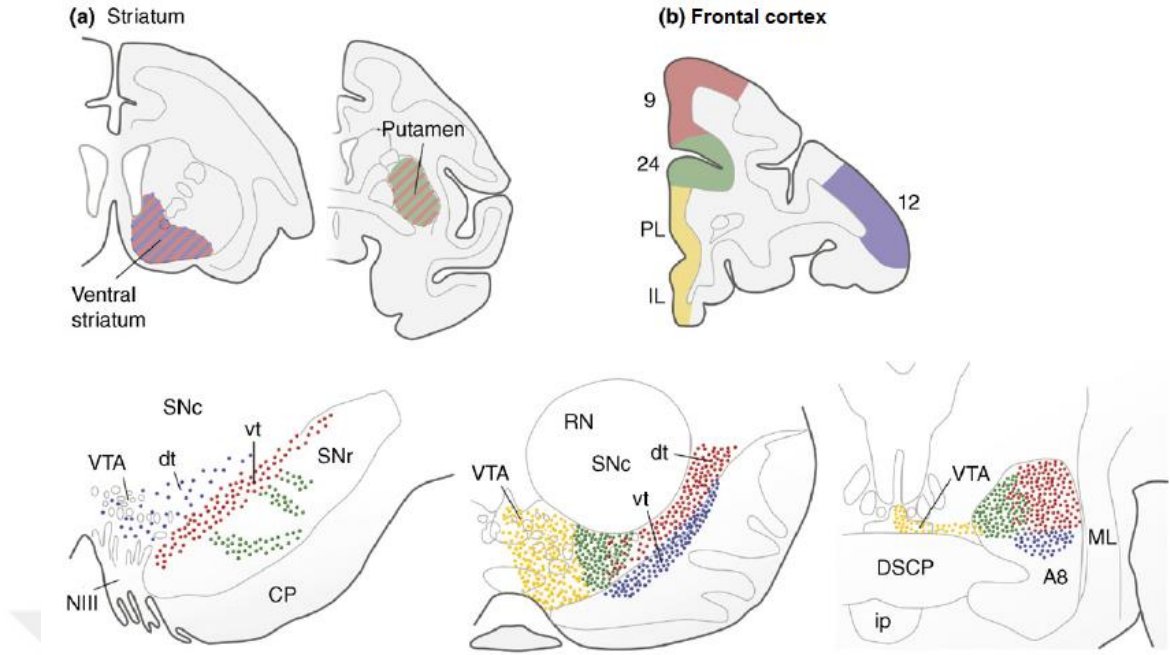
2.1.6.1.2 Dopaminerjik yollar

İmmunolojik teknikler insan beyinindeki ön beyin boyunca yaygın innervasyon gösteren TH terminallerinin dağılımını haritalamak için kullanılmaktadır (McGeer vd 1971, Torack ve Morris 1990). Dopaminerjik nöronal yolların anatomik organizasyonu ile ilgili bilgiler insan beyinindeki TH immünoaktif nöron terminallerinin analizi ve insan olmayan primatlardaki anatomik yolak izleme çalışmalarından elde edilmiştir (Björklund ve Hökfelt 2005). Histofloresan çalışmaları, SN-VTA kompleksinden başlayan üç farklı çıkan (asendan) DA projeksiyon sistemi olduğunu ortaya çıkarmıştır. Bunlar ön beyin hedeflerine yaygın projeksiyonlar gönderen nigrostriatal (mesostriatal), mezolimbik ve mezokortikal yollarlardır (Şekil 2.3) (Lindvall vd 1974, 1977, Fallon ve Moore 1978). Striatuma projekte olan DA nöronları, nadiren extrastriatal alanlara kollateral lifler göndermektedir. Bunun yanı sıra mezolimbik veya mezokortikal DA nöronlarından striatuma veya diğer ön beyin alanlarına olan projeksiyonlarda aynı derecede seyrek; bu mezolimbik ve mezokortikal yolak projeksiyonlarının büyük ölçüde limbik veya kortikal

hedeflerle sınırlı olduğunu göstermektedir (Swanson vd 1982, Fallon ve Loughlin 1982, Loughlin ve Fallon 1984). Hem kemirgenler hem de primatlarda, striatal DA innervasyonu, sadece SNpc'den değil, aynı zamanda lateral VTA ve A8 hücre grubunda bulunan hücrelerden; limbik ve kortikal alanlara projekte olan DA nöronları ise yalnızca VTA'dan değil, SN'nin dorsal tabakası ve A8 hücre grubundan kaynaklanmaktadır (Şekil 2.4). Bu birbirine karışma, mezolimbik ve mezostriatal yollarının orijini olan hücrelerinin dorsal tabaka boyunca yaygın olarak dağılım gösterdiği, striatuma projekte olan hücrelerin arasında serpiştirildiği primatlarda göze çarpmaktadır (Williams ve Goldman-Rakic 1998, Lynd-Balta ve Haber 1994, Laughlin ve Fallon 1984).



Şekil 2.3 Beyindeki dopaminerjik yolların nöroanatomi. Kırmızı ile gösterilen oklar mezokortikal dopaminerjik yolları, mor ile gösterilen oklar ise mezolimbik dopaminerjik yolları göstermektedir. ACC: anterior cingulat cortex; HC: hippocampal complex; NAcc: nucleus accumbens; PFC: prefrontal cortex; VTA: ventral tegmental area. (Perogamvrosa ve Schwartz 2012'den alınmıştır)



Şekil 2.4 Primatlarda striatal, limbik ve kortikal alanlara projekte olan mDA nöronlarının dağılımı. Mezostratial, mezolimbik ve meзокortikal yolak kökenli alt nöron grupları gösterilmektedir. CP: pedunculus cerebri; DSCP: decussatio pedunculus cerebellaris superior; dt: dorsal tabaka; IL: İnfralimbik alan; ip: nucleus interpeduncularis; ML: lemniscus medialis; NIII: nervus oculomotorius; PL: Prelimbic alanı; RN: nucleus ruber; vt: ventral tabaka.(Björklund ve Dunnett 2007'den alınmıştır).

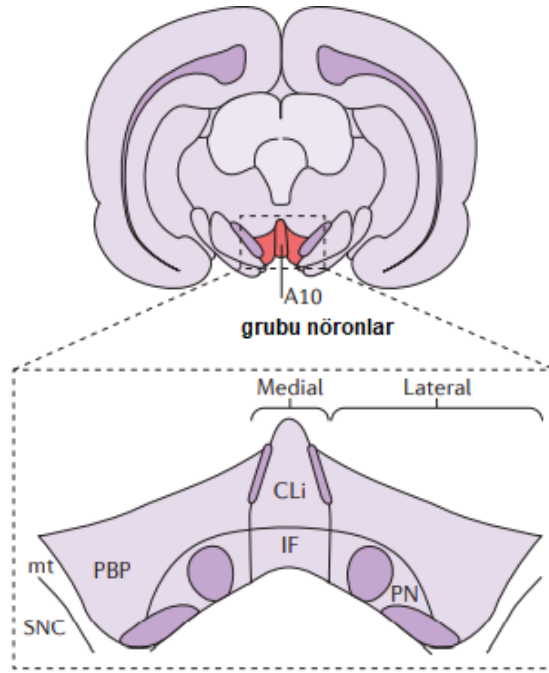
2.1.6.1.3 Ventral tegmental alan nöroanatomi

VTA, mesencephalon'un orta hatta yakınında, lateralde SN, ventralde nucleus interpeduncularis, dorsalde nucleus ruber ile sınırlı olarak bulunan heterojen bir hücre popülasyonundan oluşmaktadır (Sanchez-Catalan vd 2014).

VTA'nın literatürde ilk defa Tsai tarafından opposum beyninin tanımlayıcı anatomi çalışmalarında kullanılmıştır (Tsai vd 1925). Tsai yaptığı boyamalar sırasında nucleus interpeduncularis'in lateralinde, pedunculus mamillaris, lemniscus medialis ve nucleus tegmenti ventralis'i (ventromedial mesencephalic tegmentum, günümüzde VTA) içeren bir bölge olduğunu bildirmiştir. Bunun yanı sıra nucleus tegmenti ventralis'in, trigonum interpeduncularis'in medial kısmını oluşturduğu ve pedunculus cerebellaris'ten SN'nin ventral ucuna kadar yayıldığı da rapor edilmiştir. Tsai'nin çalışmasından önce nucleus tegmenti ventralis hücrelerinin fusiform yapıları sebebiyle bu yapı SN'nin bir parçası olarak düşünülmüştür (Kosaka ve Hiraiwa 1915). Yapısı sebebiyle nucleus niger suboculomotorius olarak da belirtilmiştir (Hassler vd 1937). Fakat, hücrelerin küçük boyutlarının yanı sıra tractus mamillopeduncularis ve tractus olfactotegmentalis'e yakın komşuluğu, yapının spesifik anatomik ve fonksiyonel özellikleri olduğunu akla getirmiştir. Ancak nucleus tegmentalis ventralis'in SN'ye ait olup olmadığı uzun süre tartışma

konusu olarak kalmıştır. Bu tartışma aynı zamanda, bölgenin sitoarşitektonik heterojenliğinden ve kemirgenlerle karşılaştırıldığında primatlarda bulunan SNpc'den ayırt edilmesinin zorluğundan kaynaklanmıştır (Sanchez-Catalan vd 2014). 1950'li yıllarda, lateral hipotalamus gibi bazı beyin yapılarının VTA'ya olan projeksiyonlarının gösterilmesi ile Tsai'nin sonuçlarını doğrulanmış ve 1958 yılında 'Tsai'nin ventral tegmental alanı' olarak adlandırılmıştır (Nauta vd 1958). İlerleyen yıllarda bu bölge diğer memeli türlerinde de incelenmiş ve VTA adını almıştır (Halliday ve Törk 1986).

1979 yılında yapılan üç çalışma, Tsai'nin VTA'sını beş çekirdeğe bölmüştür (Phillipson, 1979a,b,c). Golgi boyaması ile DA hücrelerince zengin olan iki lateral çekirdek [nucleus parabrachialis pigmentosus (PBP), nucleus paranigralis (PN)] tanımlanmıştır (Şekil 2.5). Bu çekirdekler, VTA'nın rostrakaudal uzantısının büyük bir bölümünde bulunmaktadır. PN, nucleus interpeduncularis'in anterolateral kısmının hemen üzerinde yer almaktadır ve çoğunlukla fusiform, orta büyüklükte hücre gövdesine sahip ve birkaç dikensi dendritleri olan küçük hücrelerden oluşmaktadır. PBP'nin sınırlarını tanımlamak daha zordur çünkü VTA'nın bu alt bölgesi anteroposterior seviyeye bağlı olarak PN'nin dorsalinde ve/veya dorsolateralinde bulunmaktadır. Aynı zamanda PBP, VTA ve SN arasındaki lateral sınırı oluşturmaktadır. Hücre gövdelerinin tiplerinden biri SNpc'nin dorsal tabakasında bulunan fusiform nöronlara benzemektedir. PBP'nin diğer nöronları, çok sayıda radyal dendrite sahip orta büyüklükte küresel bir hücre gövdesine sahiptir. İki lateral çekirdeğin yanı sıra VTA'da üç orta hat çekirdeği [nucleus interfascicularis (IF), nucleus linearis caudalis/centralis (LC) ve nucleus linearis raphe rostralis (LR)] tanımlanmıştır (Şekil 2.5). IF, VTA'nın bütün antero-posterior uzantısı boyunca bulunmakta ve VTA'nın geri kalanından daha küçük, yuvarlak ve yoğun paketlenmiş hücrelerden oluşmaktadır. IF'nin anterior kısmında VTA'nın en büyük hücrelerini içeren LR ve posterior kısmında LC yer almaktadır (Sanchez-Catalan vd 2014). PBP ve PN, VTA'nın ana çekirdekleridir (Swanson vd 1982). A10 grubunun içinde TH eksprese eden DA nöronlarının arasında GABA ve Glutamat (Glu) nöronları bulunmaktadır (Kawano vd 2006, Yamaguchi vd 2011). Bunların %65'ini dopaminerjik (TH pozitif), %30'unu GABAerjik, %5'ini ise glutamaterjik nöronlar oluşmaktadır (Carr ve Sesack 2000b, Yamaguchi vd 2011).



Şekil 2.5. VTA'da tanımlanan medial ve lateral hücre grupları. PBP: nucleus parabrachialis pigmentosus, PN: nucleus paranigralis, SNC: Substantia nigra pars compacta, mt:IF:nucleus interfascicularis, LC: nucleus linearis caudalis/centralis LR: nucleus linearis raphe rostralis (Morales ve Margolis 2017'den alınmıştır)

VTA nöronlarının fenotipik karakterizasyonu, TH nöronlarının kalsiyum bağlayıcı protein Calbindin (Ahel-Kakunda ve Silverman 1997), beyin derive nörotrofik faktör (Seroogy 1994), nörotensin (Jayaraman vd 1990), kolesistokinin (Jayaraman vd 1990), kortikotropin salıverici faktör bağlayıcı protein (Wang ve Morales 2008) veya veziküler glutamat taşıyıcı tip 2 (VGluT2) (Kawano vd 2006, Yamaguchi vd 2011) içeren altbirimleri olduğu göstermiştir. VTA TH nöronlarının altbirimlerinin varlığı, farklı VTA TH nöronları arasında efferent ve afferent bağlantının organizasyonunu gösteren yolak izleme çalışmaları ile de desteklenmiştir (Swanson vd 1982, Carr ve Sesack 2000b, Omelchenko ve Sesack 2006). Retrograd olarak işaretlenmiş VTA TH nöronlarının hücre kayıtlarından, opioidlerin projeksiyon hedeflerine bağlı olarak mDA nöronlarını farklı şekilde inhibe ettiği bilgisine ulaşılmıştır (Margolis vd 2006, Lammel vd 2008). Bu, VTA'daki TH nöronlarının alt kümelerinin farklı morfolojik (Grace and Onn 1989) ve işlevsel özelliklere sahip olduğunu bilgisini desteklemektedir (Lammel vd 2011).

VTA DA nöronları, biyokimyasal kompozisyonları, morfolojik özellikleri, fonksiyonları aksonal projeksiyonları ve sinaptik bağlantıları bakımından oldukça farklılık göstermektedir. Daha önce yapılan çalışmalar, VTA'nın ventromedialdeki medial NAc'ye projekte olan DA nöronlarının, lateral NAc'ye projekte olan dorsolateral VTA nöronlarına kıyasla daha küçük ve daha az dendritik dallara sahip olduğunu göstermiştir (Tan vd 1995). Bu bilgiler deneysel nöroanatomik, elektrofizyolojik, immünohistokimyasal ve

lazer disseksiyon tekniklerini kullanılarak yapılan çalışma ile de desteklenmiştir. Yapılan çalışmada ventromedial VTA'da yerleşmiş DA nöronlarının bir grubunun mPFC, NAc medial kabuk ve çekirdek kısmı, bazolateral amigdalaya, dorsolateral VTA'da yerleşimli olanların çoğunluğunun ise NAc kabuk kısmı ve ventrolateral striatuma projekte olduğu gösterilmiştir (Lammel vd 2008). Ventromedial VTA nöronları SN DA nöronlarına kıyasla hızlı ve yüksek frekanslarda (> 20 Hz) sürekli olarak ateşleme ve düşük DAT/TH mRNA oranlarına sahipken, dorsolateral VTA nöronları, SNpc DA nöronlarınıninkine benzer elektrofizyolojik özelliklere (yavaş ateşleme paterni) sahiptir ve DAT'ı daha fazlaca eksprese etmektedir. Eşik altı aralıkta, bu ventromedial DA VTA nöronları sadece bir küçük hiperpolarizasyonla aktive olan siklik nükleotid kapılı aracılı rebound aktivitesine sahiptir ve birkaç saniyeliğine inhibe edilerek susturulabilmektedir. Bu ventromedial DA nöronlarının arasında mPFC'ya projekte olanlar DA reseptör tipi 2'nin (DRD2) aktivasyonuna fonksiyonel bir yanıt oluşturmamaları sebebiyle benzersizdirler. Hücreye spesifik ekspresyon çalışmaları, mesokortikal DA VTA nöronlarında DRD2 ve G-protein kenetli içeriye doğrultucu potasyum kanalı altbirimi 2'nin düşük ekspresyonunu olduğu doğrulanmış ve hızlı ateşlenen DA VTA nöronlarının DA sentez kapasitelerine göre daha az DAT ekspresyonu olduğunu göstermektedir (Lammel vd 2008). Elektrofizyolojik özelliklerine göre yapılan hiyerarşik sınıflandırma, SN ve VTA'nın her biri içerisinde ikiden dörde alt grup olduğunu ortaya koymuştur. DA nöronlarının in vivo elektrofizyolojik özelliklerinin, aksonal projeksiyon alanlarına benzer bir biçimde ayrılıp ayrılmadığı henüz bilinmemektedir, ancak bunun olabileceğine dair bazı ilk ipuçları bulunmaktadır (Schiemann vd 2012, Li vd 2012). Mezokortikal yolağa ait VTA'da bulunan DA nöronları, SN'de bulunan DA nöronlarına kıyasla farklı N-Metil D-Aspartik Asit reseptörü (NMDAR) kinetiğine sahip olmalarının yanı sıra daha büyük α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropionik asit reseptörü (AMPA)/NMDAR oranlarına sahiptir (Roepner vd 2013).

VTA iç bağlantısalılığı oldukça kompleks olup, tonik veya fazik aktivite gösteren, elektriksel ve kimyasal sinapslarla bağlantılı heterojen bir nöron popülasyonu ile karakterize edilmektedir (Grillner vd 2002). VTA'ya izleyici enjeksiyonunu takiben TH immünoreaktivitesi gösteren az sayıda anterograd işaretli akson terminali veya retrograd işaretlenmiş VTA nöronunun olması sebebiyle VTA nöronlarının iç bağlantısalılığının çoğunlukla dopaminerjik olmayan VTA nöronlarından kaynaklandığı düşünülmektedir (Bayer ve Pickel 1990, Ferreira vd 2008).

2.2 Clarity Tekniği

Canlı ve bütünlüğü bozulmamış biyolojik dokuların, doku bütünlüğüne zarar vermeden, yapısal ve moleküler bilgi elde edebilme isteği bilimsel araştırmalarda her zaman ön planda olmuştur. Ancak teknolojinin el verdiği ölçülerde dokunun derinliğine incelenmesi söz konusudur. Bu konudaki en bilinen metod ışık mikroskobisidir. Işık mikroskobisi ve diğer konvansiyonel yöntemlerin dezavantajı, dokunun bazı işlemlerden geçirilerek mikrometre düzeyinde ince kesitler alınmasıdır. Bu yöntem ile elde edilen veriler nöron aksonu gibi üç boyutlu uzanan büyük yapılar hakkında yeterli değildir. Bu nedenle stereoloji gibi yöntemler geliştirilerek üçüncü boyut hakkında bilgi edinilmeye çalışılmaktadır (Denk ve Horstmann 2004, Ware vd 1975, West vd 1991). Teknolojinin ilerlemesi ile daha kalın biyolojik kesitlerin, canlı ve bütün halde incelenmesine izin veren yöntemler geliştirilmiştir. Konfokal mikroskopi bu konuda oldukça detaylı veri sağlamasına rağmen doku inceleme derinliği yeterli olmamaktadır (Nwaneshiudu vd 2012). Bu problemin aşılması için, daha kalın biyolojik dokuların incelenmesine olanak veren “two-photon” ve “multiphoton” mikroskobisi yöntemleri geliştirilmiştir (Helmchen ve Denk 2005, Ertürk vd 2011, Ustione ve Piston 2011).

Biyolojik dokular her ne kadar ışığa geçirgen olsalar da kalın dokuların incelenmesi sırasında ortaya çıkan diğer bir problem, ışığın doku tarafından soğurulması veya saçılıma uğramasıdır (Ustione ve Piston 2011). Bu nedenle multiifoton gibi yeni teknolojilerin uygulanmasında, incelenecek dokunun ışığa geçirgen hale getirilmesi ihtiyacı doğmuştur. Ancak bu çabaların sonucunda elde edilen yöntemlerin bir kısmı pahalı ve uygulaması zor yöntemler olup, çok küçük doku parçalarında uygulanabilmektedirler (Helmstaedter vd 2008). Daha ekonomik ve uygulanabilir yöntemler, genellikle dokudaki opasiteyi gideren ve ışık saçılımını azaltan solüsyonlar kullanma eğilimindedir. Örnek olarak; BABB, ScaleA, ScaleA2, Scale U2, fruktoz/tyol, gliserol, sükroz, SeeDB, SeeDB37 ve FocusClear diye adlandırılan solüsyonlardır (Ke vd 2013, Hama vd 2011, Tsai vd 2009). Sükroz ve benzeri şekerlerin kullanımı her ne kadar ekonomik ve kolay olsa da, özellikle yüksek sıcaklıklarda uzun süreli muameleler otoflouresansa ve kahverengileşmeye yol açmaktadır (Dills vd 1993). Bazı araştırmacılar Maillard reaksiyonu olarak adlandırılan bu etkiyi ortadan kaldırmak için metamerkaptoetanol veya α -tiyogliserol gibi tiyolleri solüsyona eklemektedirler. Örneğin SeeDB, %0,5'lik α -tiyogliserol içeren su içerisinde, %80,2'lik satürefruktoz solüsyonudur (Ke vd 2013). Opasitenin giderilmesi ışık geçirgenliğini artırmasına rağmen özellikle immünoflerosan boyaların uygulanmasında gerekli olan permabilitiyi sağlamamaktadır. Bu problemi aşmak için geliştirilen Clarity tekniğinde, sağlam biyolojik dokuların, makromoleküllerin geçişine engel olan doku komponentleri uzaklaştırılarak, hidrojel

monomerleri bu komponentlerin yerine transfer edilmektedir. Oluşturulan yeni üç boyutlu form, dokunun doğal morfolojik özelliklerini korumasının yanı sıra, immünohistokimya ve immünofloresan tekniklerinin uygulanması sırasında gerekli olan, makromolekül difüzyonuna izin vererek, istenilen hücre yapılarının işaretlenmesine olanak sağlamaktadır (Chung vd 2013, Chung ve Deisseroth 2013).

Clarity yönteminde, canlı doku sırasıyla paraformaldehit ve hidrojel (monomer karışımı) solüsyonu ile perfüze edilerek fiksasyonu sağlanır. Sonrasında monomer solüsyonu içerisinde inkübe edilerek, monomerlerin doku içerisinde çapraz bağlı üç boyutlu ağ oluşturması sağlanır. Böylece tespit edilmiş ve morfolojik özelliklerini koruyan doku, nanporoz hibridize hidrojel formuna dönüştürülmüş olmaktadır. Doku, hala ışık geçirgenliği açısından opak özellikler taşımaktadır. Bu opasitenin giderilmesi için sodyum dodesil sülfat (SDS) ve borik asit (ph:8,5) bulunan solüsyona bırakılarak pasif olarak ya da yine aynı solüsyon içerisinde elektroforeze tabi tutularak aktif olarak hücre duvarında bulunan lipidlerin uzaklaştırılması (şeffaflaştırma, clearing) sağlanmaktadır. Son haliyle immünohistokimya ve immünofloresan boyama teknikleri açısından büyük moleküllü proteinlerin difüzyonuna uygun hale gelen doku, ışık kırılma indisini düzelteren solüsyonlarla muamele edildikten sonra şeffaf görünüm kazanmaktadır (Chung vd 2013).

2.3. Hipotez

Bu çalışmada aşağıdaki hipotezleri test etmek amacıyla planlanmıştır.

1. DEHB'li sıçanlarda, VTA'da mezokortikal dopaminerjik yolağa ait nöronların sayısında azalma vardır.
2. DEHB'li sıçanlarda, mezokortikal dopaminerjik yolağın VTA'dan PFK'ye olan projeksiyonların aksonal dallanmasında azalma vardır.
3. DEHB'li sıçanlarda, mezokortikal yolağın PFK'ye projekte olan liflerinin dağılımında, DEHB olmayanlara göre topografik farklılık vardır.

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışma Pamukkale Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu'nun 02.12.2015 tarihli ve 2015/09 sayılı toplantısının ve Virginia Üniversitesi Kurumsal Hayvan Bakım ve Kullanım Kurulunun 3717-08-17 protokol numaralı izni ile gerçekleştirildi. Stereotaksik intraserebral enjeksiyonlar Pamukkale Üniversitesi Deneysel Cerrahi Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde (DECUAM), diğer tüm deneysel basamaklar ise Virginia Üniversitesi Psikoloji Bölümü Nöral Gelişim ve Plastisite Laboratuvarında yapıldı. Çalışmanın tüm aşamaları, Pamukkale Üniversitesi Hayvanları Deneyleri Etik Kurulu ve Virginia Üniversitesi Kurumsal Hayvan Bakım ve Kullanım Kurulu yönetmeliğine uygun olarak yapıldı.

3.1. Deney Hayvanlarının Seçimi ve Gruplandırılması

Stereotaksik beyin girişi için üretilen atlaslar genel olarak erişkin sıçanlara uygun hazırlanmıştır. Juvenil sıçanlarla ilgili yeterli literatür bulunmadığı için deney öncesi ön çalışma yapılması gerekti. Juvenil sıçanların VTA stereotaksik koordinatlarının belirlenmesinde Pamukkale Üniversitesi DECUAM'dan temin edilen postnatal 21 günlük sütte henüz kesilmiş 20 adet Sprague Dawley cinsi sıçan kullanıldı.

İmmunohistokimyasal analizler için ise, Charles River Laboratuvarı'ndan satın alınan, postnatal 27-34 günlük olmak üzere, kontrol grubu için 5 WKY, DEHB hayvan modeli için 5 SHR olmak üzere toplam 10 adet erkek sıçan kullanıldı. Sıçanların teslim alınmalarını takiben birbirlerine ve ortama adapte olmaları için iki gün boyunca herhangi bir işlem yapılmadı. Deneysel sürecin başlangıcına kadar tüm hayvanlar en az 48 saat boyunca standart şartlar altında, havalandırılmalı, sabit ısı odalarda, % 50±5 nem ortamında, 12 saatlik aydınlık-karanlık siklusu bulunan vivaryum koşullarında barındırıldı. Sıçanların beslenmesinde sekiz milimetrelik (mm) standart sıçan pellet yemi, içme suyu olarak musluk suyu ve istedikleri kadar yem ve su tüketmelerine izin verildi. SHR'lerde hipertansiyon gelişmeden önce çalışmanın tamamlanması için, teslim alınmalarını takiben üç gün içerisinde deneysel protokole başlandı. Kontrol grubu

sıçanlar ile SHR'lerin aynı yaşlarda (age-matched) olabilmeleri için çalışma iki aşamada gerçekleştirildi. Önce kontrol grubu WKY'ler satın alındı ve deneysel protokolün tamamlanmasının ardından SHR'ler satın alınarak aynı deneysel basamaklar uygulandı. Uygulanan deneysel protokol daha detaylı açıklanacaktır. Perfüzyonlar sonrasında sıçanlara dekapitasyon yolu ile ötenazi uygulandı.

3.2. Stereotaksik İntraserebral Enjeksiyon

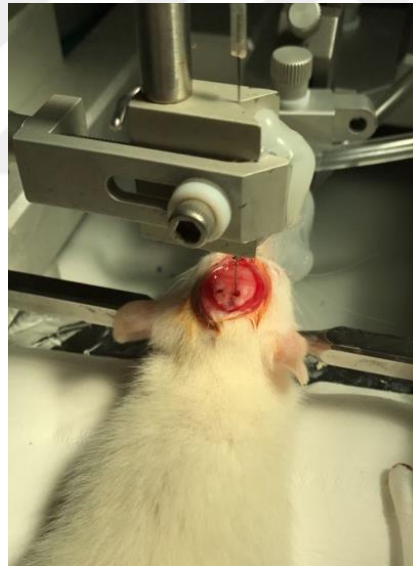
Stereotaksik izleyici enjeksiyonun yapılacağı, postnatal 21 günlük sıçanlarda VTA stereotaksik koordinatlarının bulunması amaçlandı. VTA koordinatlarının belirlenmesine yönelik yapılacak intraserebral enjeksiyon denemeleri öncesinde stereotaksi kafesi tadil edilerek juvenil sıçanlara uygun hale getirildi (Şekil 3.1). Bunun için dış aparatı sıçan boyutuna uygun hale getirilerek üzerine inhaler anestezi için anestezi maskesi adapte edildi.



Şekil 3.1 Stereotaksik enjeksiyon cerrahisi gerçekleştirmek üzere kurulan düzenek. Stereotaksi kafesinin solunda mikroenjeksiyon pompası bulunmaktadır. Dış aparatı juvenil sıçanlara uygun hale getirilerek üzerine inhalasyon anestezi için maske monte edildi.

Sıçanlara sevofluran inhalasyonu ile genel anestezi yapıldıktan sonra stereotaksi kafesine yerleştirilip sabitlendi. Işık kaynağı sebebiyle göz kurumasını engellemek için cerrahi öncesi sıçanın gözlerine oftalmik merhem sürüldü. İnsizyon bölgesi antiseptik ile temizlenerek cilt insizyonu yapıldı. Cilt insizyonunu takiben kranium üzerine yapışık olan periost bistüri ucu ile sıyrıldı ve soğuk serum fizyolojik ile kraniumun üzeri temizlendi. Kranium üzerinde yer alan sutural eklem izleri incelenerek lambda ve bregma bulundu

ve işaret konuldu. İlk uygulamalarda yetişkin sıçanlara göre hazırlanmış olan atlas kullanılarak düzeltme formülleri ile VTA koordinatlarına ulaşılmaya çalışıldı. Bunun için, yetişkin sıçanlara göre hazırlanmış olan, sıçan beyni stereotaksik koordinatları atlasında belirtilen lambda (L) bregma (B) arası mesafe (9 mm) ve VTA koordinatları, referans ve kılavuz olarak kullanıldı. Deneme için stereotaksi kafesine yerleştirilen sıçanın L-B arası mesafe ölçülerek oran orantı yöntemiyle VTA koordinatları hesaplandı. Örneğin, erişkin sıçan için L-B arası mesafesi 9.00 mm olan sıçanda VTA koordinatı anteroposterior (AP) -5.4 mm (bregmadan), mediolateral (ML) 0.8 mm (midsagittal sütürden), ve dorsoventral (DV) 8.3 mm (kranium yüzeyinden) iken, L-B mesafesi 6.2 mm olan juvenil sıçanda VTA koordinatı AP -3.7 mm, ML 0.6 mm, DV 5.7 mm olarak hesaplandı. Hesaplama sonrasında elde edilen AP koordinatına dental drill yardımı ile kranium dorsalinden küçük bir delik açılarak kraniotomi yapıldı. Sonrasında kanülün istenilen koordinata kolayca ulaşabilmesi için açılan delikten enjektör iğnesi ucu sokularak dura yırtıldı. Stereotaksi yardımıyla ilerletilen kanül ile istenilen derinliğe (DV ekseninde) ulaşıldı ve intrakranial basıncın eşitlenmesi için beş dakika boyunca herhangi bir işlem yapılmaksızın beklenildi (Şekil 3.2).



Şekil 3.2 Stereotaksik cerrahi işlem uygulanması. Yetişkin sıçanlara göre olan stereotaksi kafesi, denemelerden önce juvenil sıçanlara uygun hale getirildi. Bunun için çelik bir çubuğun modifiye edilerek juvenil sıçana uygun bir dış barına dönüştürüldü. Dış barı üzerine inhalasyon anestezisine uygun, gaz kaçışına izin vermeyen bir maske yapılarak anestezisi idame edildi.

VTA koordinatlarına doğru bir şekilde ulaşıldığının test edilmesi için toplam 100 nanolitre (nl) boyar madde (latex bead) perfüzyon pompası ile 0,020µl/dk hızında enjekte edildi. Enjeksiyon sonrasında geriye sıvı difüzyonunu engellemek için beş dakika kanül geri çekilmeden beklendi. Deney sonunda sıçanlar önce fosfat tamponlu salin (PBS; 1XPBS; 0,01M; 0.01 M PB + 0.9% NaCl; pH 7.4) solüsyonu, sonra 0.1 M fosfat tamponu

(PB, pH 7.4) içinde hazırlanan %4'lük paraformaldehit solüsyonu (PFA) ile transkardiyak olarak perfüze edildi ve beyinleri çıkartıldı. VTA'ya doğru olarak ulaşıp ulaşılmadığının test edilmesi için beyin diseksiyonu gerçekleştirilerek kriyostat yardımı ile alınan kesitler mikroskop altında incelendi.

Bu işlemlerle elde edilen bulgular standart sonuçlar elde edilemediği için kullanılmadı.

3.3. İmmunohistokimyasal Analizler için Dokuların Hazırlanması

3.3.1. Transkardiyak Perfüzyon ve Kesitlerin Alınması

Sıçanlar intraperitoneal olarak uygulanan pentobarbital (150 mg/kg) ile derin anestezi altına alındı. Fleksör ve korneal reflekslerin azalmasını takiben, peristaltik pompa aracılığıyla, oda sıcaklığındaki Tyrode's solüsyonuyla (137 mM NaCl, 5,5 mM dekstroz/glukoz, 1,2 mM MgCl₂, 2 mM KCl, 0,4 mM NaH₂PO₄, 0,9 mM CaCl₂, 11,9 mM NaHCO₃, in 1 L dH₂O; pH 7,3) iki dakika, ardından %4 paraformaldehit ve %0,5 gluteraldehit karışımıyla beş dakika, transkardiyak perfüzyon uygulandı. PFA solüsyonu 0,2 M PB içinde çözülerek hazırlandı. Perfüzyon sonrasında beyin çıkartıldı ve aynı fiksatifte 4°C'de gece boyu inkübe edildi.

Kontrol sıçanlarından ilk ikisinin kesitlenmesinde kriyostat kullanıldı. Kriyostatla kesit alımı öncesinde beyin dokusu, Tyrode's solüsyonu içerisinde hazırlanan %30 sükröz solüsyonunda batana dek inkübe edildi. Ardından kriyostat yardımıyla 35 µm kalınlığında kesitler alındı. Kesit alınması sırasında, kesitlerde katlanma, kırılma ve parçalanma meydana gelmesi sebebiyle, kesitler immunohistokimyasal boyamalarda kullanılmadı. Bu sebeple kesit alma stratejisi değiştirilerek bundan sonraki beyinlerin kesitlenmesinde vibratom kullanıldı. Vibratom yardımıyla, PFK ve VTA'yı içeren 50 µm kalınlığındaki koronal kesitler, oda sıcaklığında 0.01 M PBS ile doldurulmuş oniki kuyucuklu plakaya dört seri halinde toplandı (Şekil 3.3). Bu kesit toplama stratejisi, iki farklı boyama yapılan (Nissl ve TH) ardışık kesitlerin seri halinde elde edilmesine olanak sağladı.

Kuyucuk 1 (Nissl)	Kuyucuk 5 (Nissl)	Kuyucuk 9 (Nissl)	Seri I
Kuyucuk 2 (TH)	Kuyucuk 6 (TH)	Kuyucuk 10 (TH)	Seri II
Kuyucuk 3	Kuyucuk 7	Kuyucuk 11	Seri III
Kuyucuk 4	Kuyucuk 8	Kuyucuk 12	Seri IV

Şekil 3.3 Kesit toplama stratejisi. Seri I'e Nissl boyaması, Seri II'ye ise TH immunohistokimyası yapıldı. Seri III içerisindeki kesitlerden mPFK'yi içerenler seçilerek konfokal analizlerinde kullanıldı. Seri IV uygun işlemlerden geçirilerek saklandı.

Beyin kesitleri 12 kuyucuklu plak içerisine dört seri halinde toplandı. Seri I'deki tüm kesitlere Nissl boyaması, Seri II'dekilere ise TH boyaması yapıldı. Seri III'deki kesitlerden mPFK'yi içeren kesitler seçildi ve bu kesitler TH/DBH ikili immunohistokimyasında kullanıldı. Seri IV'deki kesitler ise gerektiğinde kullanılmak üzere uygun işlemlerden geçirilerek 4°C'ye kaldırıldı.

Kesitler, aldehit fiksasyonunu sonlandırmak için %1 sodyum borohidrat (NaBH_4 ; 1 g NaBH_4 , 100 ml 0.01 M PBS) ile 30 dakika muamele edildi ve kesitler üzerinde oluşan kabarcıklar temizlenene dek 0.01 M PBS ile yıkandı. İmmunohistokimyasal boyamalara dek kesitler, 4°C'de % 0.05 sodyum azit (NaN_3) içeren 0.01M PBS içinde saklandı.

Birinci seri kesitler (Seri I) jelatin ile kaplanmış lamlar üzerine dizildi ve hücre gövdesinin görünür hale getirilmesi için Cresyl Violet ile standart prosedürler kullanılarak Nissl boyası uygulandı. Nissl boyaması için kesitler önce rehidrate edildi, ardından 14 dakika boyunca % 0,1 Cresyl Violet solüsyonu içine daldırıldı. Kesitler distile su (dH_2O) ile yıkamayı takiben yükselen etanol serisi ile dehidrate edildi. Kesitler ile temizlenen kesitler entellan ile kapatıldı.

3.3.2. İmmünohistokimyasal Boyamalar

VTA'yı içeren kesitlerde dopaminerjik nöronların, mPFK'yi içeren kesitlerde dopaminerjik liflerin saptanması için TH, mPFK'yi içeren kesitlerde noradrenerjik liflerin saptanması için DBH immunohistokimyası gerçekleştirildi.

Işık mikroskobu (seri II) için kesitler, 30 dakika boyunca 0.01 M PBS içindeki % 1 sığır serum albüminde (blok solüsyonu) bloke edildi. Daha sonra kesitler, 1:1000 oranında, % 0.5 Triton X-100 ve % 1 BSA içeren 0.01 M PBS solüsyonu ile dilüe edilen TH primer antikorunda (Abcam, AB76442) oda sıcaklığında 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon ortamına, bakteriyel üremeyi önlemek için % 0.05 sodyum azid (NaN_3 ; 0.05 g NaN_3 , 100 ml 0.01 M PBS) eklendi.

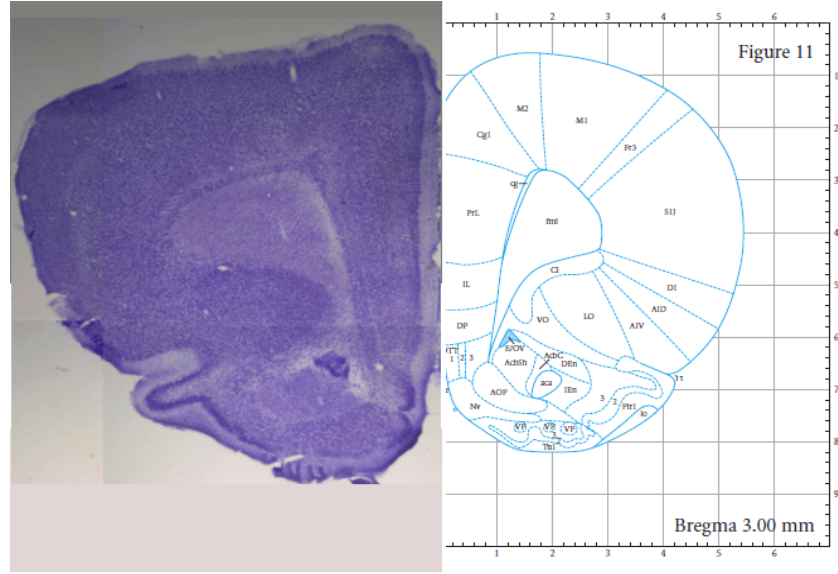
İkili immunohistokimyasal boyama için (konfokal mikroskopide kullanılmak üzere), 30 dakika blok solüsyonunda tutulan kesitler, ardından 1:300 oranında dilüe

edilen DBH (Milipore, MAB308) ve 1:1000 oranında dilüe edilen TH primer antikörlerinde 48 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında kesitler, PBS ile yıkamayı takiben, TRITC (Jackson Immunoresearch, 715-025-151, 1:500) ve Alexa Fluor 488 (Jackson Immunoresearch, 703-545-155, 1:500) ile konjuge edilmiş sekonder antikörler ile oda sıcaklığında ve karanlıkta 2 saat inkübe edildi. DBH ve TH immunohistokimyasal boyamasından sonra, kesitler PBS ile yıkandı, jelatin kaplı lamalar üzerine dizildi ve kurumalarını takiben VectaShield kapatma medyumunu ile kapatıldı. İmmünohistokimyasal boyama paterni varyasyonunu önlemek için, iki deney grubundan alınan kesitler, eş zamanlı olarak aynı kuyucuk içinde bir set olarak boyandı.

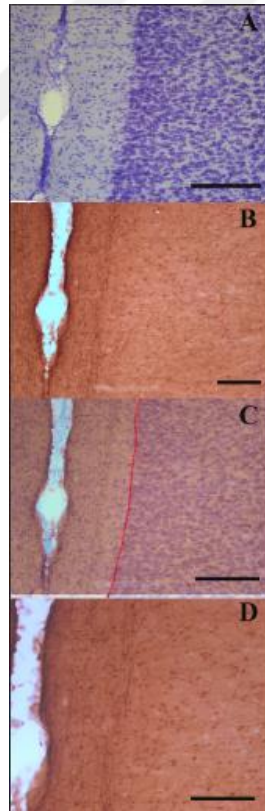
Işık mikroskopisi için hazırlanan kesitler primer antikör inkübasyonunu sonlandırmak için 0.01 M PBS ile yıkandı ve 1: 100 oranında dilüe edilen biyotinli sekonder antikör (Vector Laboratories, Burlingame, CA; catalog no. BA-9010) ile 2 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. Kesitler PBS ile yıkandı ve antijen antikör kompleksinin görünür hale getirilmesi için Vectastain Elite ABC HRP Kit (Vectastain ABC Kit PK-4000, Vector Laboratories) kullanılarak ABC protokolü uygulandı. HRP ile konjuge edilmiş avidin biotin kompleksi inkübasyondan 30 dakika önce hazırlandı. Kesitler, bu kompleks içerisinde, oda sıcaklığında 2 saat inkübe edildi ve ardından PBS ile yıkandı. 3,3'diaminobenzidin (DAB) kromojen solüsyonu (DAB Peroxidase (HRP) Substrate Kit, SK-4100, Vector Laboratories) hazırlandı ve kesitler bu solüsyonda 5 dakika inkübe edildi. Reaksiyonun sonlandırılması için kesitler 5 dakika distile su ile yıkandı ve jelatin kaplanmış dizildi. Gece boyu kurumaya bırakılan kesitler ertesi gün dereceli alkol serisinden geçirilerek dehidrate edildi ve xylol ile temizlenerek entellan ile kapatıldı.

3.4 Görüntüleme

İlgilenilen anatomik bölgelerin belirlenmesi için Nissl ve TH boyaması uygulanan koronal seri kesitler kullanıldı. Yoğun nöron ve lif boyanmasının olduğu bölgeler ışık mikroskobu (Leica DMLB) kullanılarak belirlendi ve küçük ve büyük büyütmelerde dijital fotoğraf makinesi (Leica MC170 HD) yardımıyla fotoğraflandı. PFK'nin kortikal tabakalarının ve VTA'nın sınırlarının belirlenmesi için Nissl boyalı kesitler kullanıldı (Şekil 3.4). Ardışık Nissl ve TH boyalı kesitlerin görüntüleri birbiri üzerine aktarıldı (Şekil 3.5). forceps minor (corpus callosum), claustrum ve commissura anterior mPFK'nin PrL (prelimbik) alanı için, substantia nigra, lemniscus medialis ve superior colliculus lamina superficialis ise VTA için referans olarak kullanıldı.



Şekil 3.4 PFK'de ilgilenilen alanın sınırlarının belirlenmesi için Nissl boyalı koronal kesit mikrofrafisi (büyütme 1.6x) (sol) ve kesite karşılık gelen atlas görüntüsünün (sağ) karşılaştırması. PFK'nin kortikal tabakaları ve alt alanları Nissl boyalı koronal kesite karşılık gelen atlas görüntüsü kullanılarak belirlendi. PrL: prelimbik alan, IL: infralimbik alan, Cg1: Cortex cingularis.



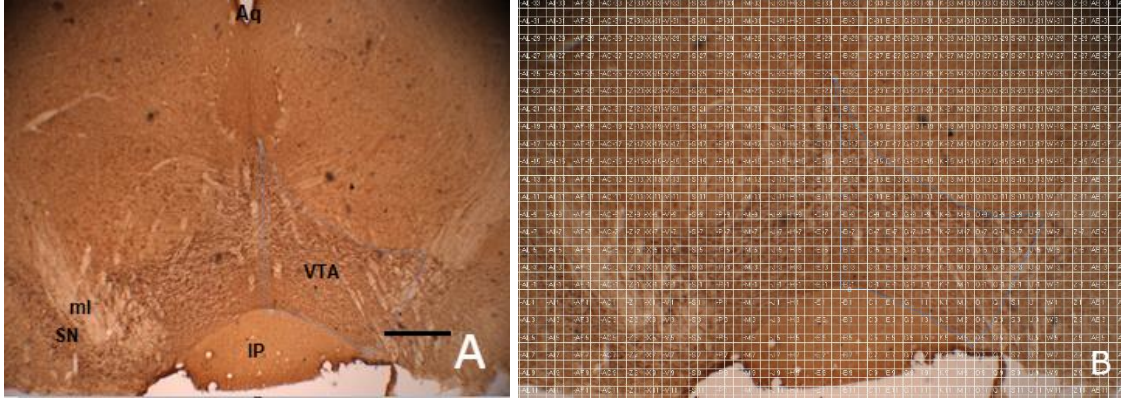
Şekil 3.5 mPFK'nin PrL alanının I. tabakasının ve TH (+) dopaminerjik projeksiyon alanlarının farklı büyütme ve farklı boyalar ile karşılaştırmalı mikroskop görüntüleri. mPFK'yi içeren ardışık koronal kesitlerde Nissl (A), dopaminerjik liflerdeki TH için ABC-DAB boyamaları (Büyütmeler: B, 5x; A, C ve D 10x). I. tabaka sınırları (C), Nissl boyalı kesitlerde tanımlandı ve ardışık olarak alınan TH boyanmış kesit (C) üzerine aktarıldı (Skala: 250 μ m).

3.4.1 Işık Mikroskopisi Analizleri

mPFK'nin PrL alanında TH (+) dopaminerjik liflerin ve VTA'da TH (+) dopaminerjik nöronların sayısal yoğunluğunun belirlenmesi için 3 WKY kontrol 5 SHR sıçan kullanıldı. Kontrol grubu sıçanlardan ilk ikisi, kesit alınımı sırasında yaşanan sıkıntılar sebebiyle kullanılmadı. VTA'da TH (+) nöron yoğunluğunun hesaplanmasına Stereoinvestigator yazılımı (MicroBright Field), mPFK'deki TH (+) lif yoğunluğunun hesaplanmasında ise Neurolucida yazılımı (MicroBright Field) kullanıldı. Sayısal analizleri hemisfer farkı gözetmeksizin her iki hemisferden elde edilen kesitler üzerinde gerçekleştirildi.

3.4.1.1 VTA Analizi (Hacimsel Nöron Yoğunluk Ölçümü)

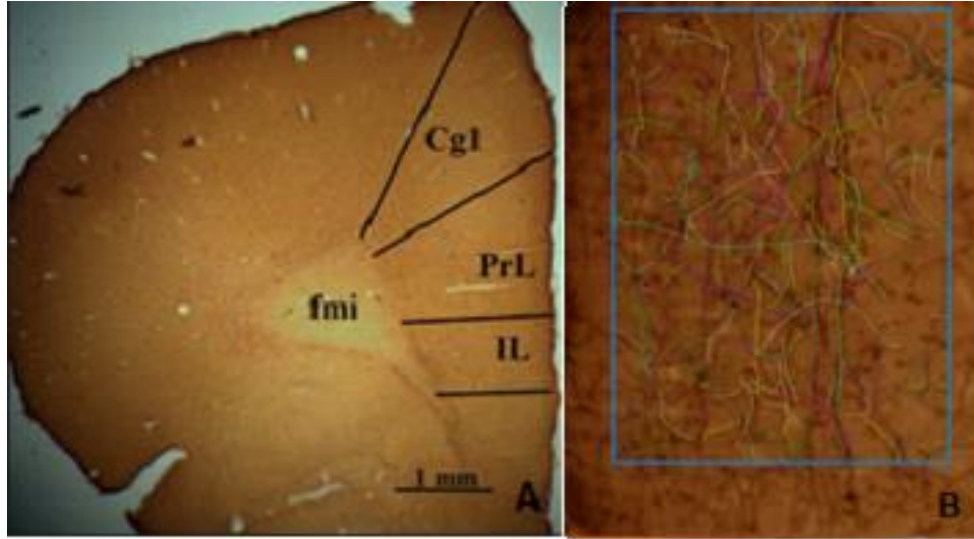
VTA'da TH (+) dopaminerjik nöron yoğunluk analizinin yapılacağı referans alan Paxinos ve Watson (2007) sıçan beyin atlası kullanılarak belirlendi. Referans alan olarak, kesitlerde superior colliculus lamina superficialis'in görünmeye başladığı ilk kesit (Bregma -5.28 mm) ile pedunculus mamillaris'in görüldüğü son kesit (Bregma -6.00 mm) arasında kalan bölge seçildi. Bu referans bölge içindeki toplam TH (+) dopaminerjik nöron sayısının hesaplanmasında Stereoinvestigator yazılımı kullanıldı. Hesaplama öncesinde küçük büyütmede VTA sınırları belirlendi ve etrafına kontur çizildi (Şekil 3.6A). Sayım yapılacak alan üzerine, Stereoinvestigator yazılımının grid eklentisi kullanılarak, 50x50µm karelerden oluşan bir grid yerleştirildi (Şekil 3.6B). Belirlenen kontur içinde kalan en üst ilk grid kutusundan başlayarak, önceden belirlenmiş aralıklarla (x = 150 µm, y = 150 µm) sayım yapıldı. VTA sınırları içinde kalan grid kutularında bulunan her hücre sayıldı. Belirlenen sayım stratejisi ile kontur içinde kalan tüm grid kareleri analize dâhil edildi. Grid kutusunda bulunan ve stereolojik sayım kurallarına uyan her TH (+) nöron sayıldı. Sıçan başına dört farklı VTA sınırları içinde sayım yapıldı. Her beyinde 44 ile 112 grid kutusu değerlendirildi. Sayımlar büyük büyütmede (40x) gerçekleştirildi. Hacimsel nöron yoğunluğunun hesaplanabilmesi için gerçek zamanlı görüntüler, Zeiss faz kontrast mikroskobu kullanılarak elde edildi. VTA içindeki toplam TH (+) dopaminerjik nöronların hacimsel yoğunluğu ($/\mu\text{m}^3$), toplam dopaminerjik nöron sayısının, sayım gerçekleştirilen toplam hacme (grid kutusu hacmi x sayıma dâhil edilen kutu sayısı) bölünmesiyle elde edildi.



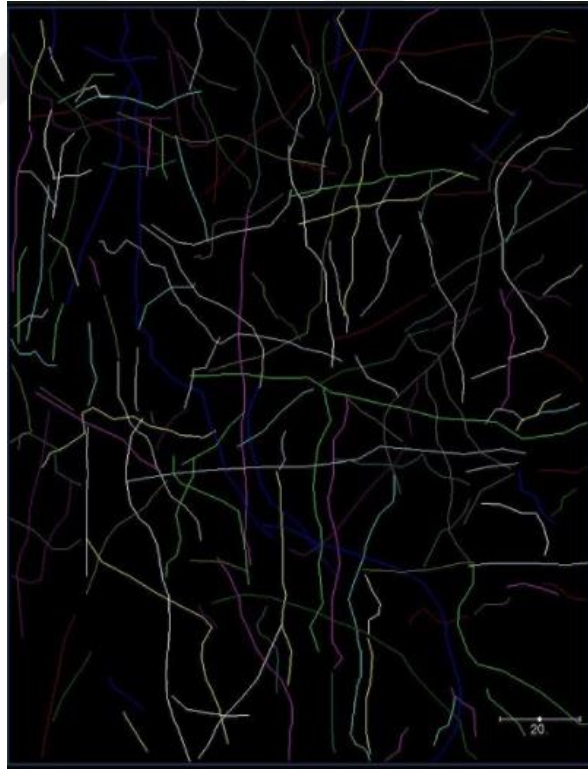
Şekil 3.6 VTA'da gerçekleştirilen nöron yoğunluk analizi yapılırken kullanılan mikroskop görüntüsüne ait örnek fotomikrografi. A'da, VTA sınırlarının belirlenmesi ve kontur çizimi, B'de ise Stereoinvestigator yazılımı kullanılarak sayım yapılacak alan üzerine grid yerleştirilmesi gösterilmektedir (büyütme 1.6x). ml:lemniscus medialis, IP: nucleus interpeduncularis, VTA: ventral tegmental area, Aq: aquaductus cerebri, SN: Substantia nigra. (Skala: 400 μ m).

3.4.1.2 mPFK Analizi (Lif Yoğunluk Analizi)

Sıçan için hazırlanmış stereotaksik beyin atlası (Paxinos ve Watson 2006) kullanılarak, lif yoğunluk analizinin gerçekleştirileceği mPFK alt bölgelerinden PrL'nin sınırları belirlendi. Referans bölge olarak kesitlerde forceps minor'un (corpus callosum) görünür hale geldiği ilk kesit (Bregma 4.20 mm) ile striatum'un kesitlerde ilk görünür hale geldiği kesit (Bregma 2.76 mm) arasında kalan bölge seçildi. Sayısal analizler için referans bölge arasından alınan kesitler kullanıldı. Hacimsel yoğunluğun hesaplanabilmesi için gerçek zamanlı görüntüler, Zeiss faz kontrast mikroskobu kullanılarak elde edildi. Bu kesitlerden elde edilen görüntülerde, PrL alanının I.tabakasındaki toplam TH (+) dopaminerjik liflerin uzunluğu Neurolucida yazılımı kullanılarak hesaplandı. Hesaplama öncesinde 4x büyütmede, PrL alanının I.tabakasının (İlgilenilen alan, region of interest, ROI) içinde TH (+) dopaminerjik projeksiyon liflerinin olduğu alan tarandı (Şekil 3.7A). Sonrasında 10x büyütmede ROI içine, korteks yüzeyinden 150 mikrometre (μ m) derinliğe sahip bir dikdörtgen kontur olarak çizildi (Şekil 3.7B). Analizler, ROI içinde kontur olarak çizilen dikdörtgen alanda yapıldı. Sıçan başına altı farklı dikdörtgen içinde sayım yapıldı. Analize sadece ROI içindeki TH (+) dopaminerjik lifler dâhil edildi. ROI içindeki lifler 40x objektifi altında çizildi (Şekil 3.7C). Neurolucida yazılımı kullanılarak ROI içindeki toplam lif uzunluğu hesaplandı (Şekil 3.8). ROI içindeki toplam TH (+) dopaminerjik liflerin hacimsel yoğunluğu (μ m/ μ m³), toplam dopaminerjik lif uzunluğunun, sayım gerçekleştirilen toplam hacme (dikdörtgen alanı x kesit kalınlığı) bölünmesiyle elde edildi.



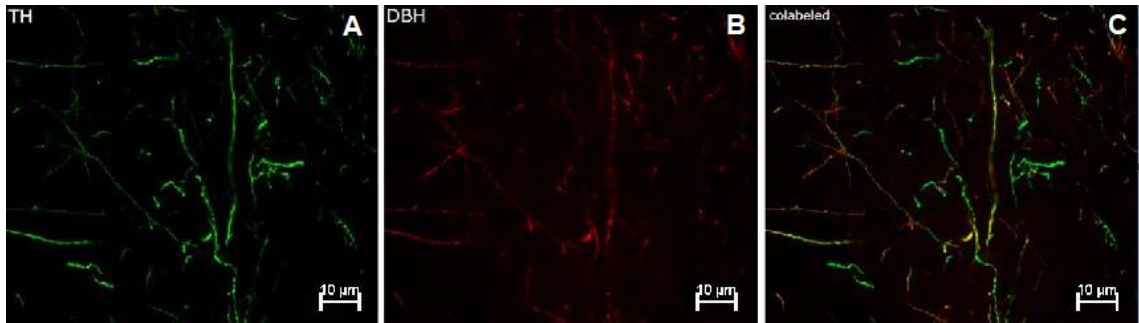
Şekil 3.7 mPFK'de gerçekleştirilen lif yoğunluk analizinde kullanılan fotomikrografilere ait örnek görüntü. Nissl boyalı kesitler kullanılarak belirlenmiş olan mPFK'nın alt alanlarından, analiz gerçekleştirilecek olan ROI kalın çizgilerle ayrılmıştır (büyütme 4x) (A), ROI içinde sınır çizilerek, sınır içinde TH (+) liflerin işaretli hali (büyütme 40X) gösterilmektedir (B). fmi: forceps minor (corpus callosum), Cg1: cortex cingularis, PrL: prelimbic alan, IL: infralimbik alan.



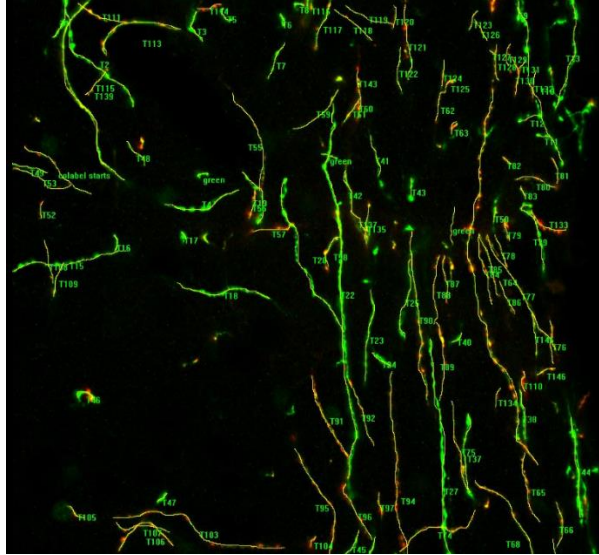
Şekil 3.8 mPFK'nin PrL alanının I. tabakasındaki TH (+) dopaminerjik liflerin Neurolucida yazılımı kullanılarak çizilmiş hali görülmektedir. Neurolucida yazılımı kullanılarak 40x büyütmede analiz gerçekleştirilen ROI içindeki TH (+) lifler işaretlenmiş ve toplam uzunlukları hesaplanmıştır (Skala: 20 µm).

3.4.2 Konfokal Mikroskopi Analizi

mPFK'nin PrL alt bölgesinin I.tabakasında TH (+) dopaminerjik lif yüzdesinin belirlenmesi için 3 WKY kontrol ve 3 SHR sıçan beyni kullanıldı. Dopaminerjik nöron ve liflerin görüntülenmesi için TH immunohistokimyasal boyaması, noradrenerjik liflerin görüntülenmesi için DBH immunohistokimyası kullanıldı. mPFK'nin PrL alanının I.tabakasındaki (ROI), TH (+) kortikal liflerin, katekolaminerjik nondopaminerjik yüzdesinin belirlenmesi için TH-DBH ikili immunohistokimyasal boyama yapıldı. TH (+) dopaminerjik lif yüzdesi analizlerinde, lif yoğunluk analizlerinde kullanılan kesitlerin ardışık kesitleri kullanıldı. Analizler için tarama sistemi ile donatılmış (Nikon C2+) bir konfokal mikroskop (Nikon Eclipse 80i), FITC'nin uyarılması için Argon lazeri (488 nm'de eksitasyon), CY3'ün uyarılması için DPSS lazeri (561 nm'de eksitasyon) kullanıldı. Görüntülerin elde edilirken, piksel boyutu, tarama boyutu, optik çözünürlük, adım boyutu ve tarama derinliği gibi değerler sabit tutuldu. Görüntüler immersiyon objektifi (Nikon, PlanApo VC; NA =1.4) altında mPFK'nin PrL alt alanının I.tabakasından elde edildi (Şekil 3.8). Elde edilen üç boyutlu görüntü, maksimum intensite projeksiyon görüntüsüne dönüştürülerek TIFF dosyası olarak kaydedildi. ROI içinde her sıçan başına üç farklı alan içinde sayım yapıldı. mPFK'nin PrL alanının I.tabakasındaki dopaminerjik ve noradrenerjik liflerin toplam uzunluğu Image-Pro Plus 7,0 (Media Cybernetics) yazılımı kullanılarak manuel olarak hesaplandı (Şekil 3.9). TH (+) lifler yüzde olarak ifade edildi. ROI içindeki toplam TH (+) dopaminerjik liflerin yüzdesi, toplam dopaminerjik lif uzunluğunun, tüm liflerin uzunlukları toplamına oranlanmasıyla elde edildi.



Şekil 3.9 mPFK'nin PrL alt alanının I.tabakasında TH ve DBH immünohistokimyası uygulanmış kesitlerden elde edilen örnek konfokal fotomikrografileri (büyütme 60x) TH (+) dopaminerjik lifler (A) ve DBH (+) noradrenerjik lifler (B) TH-DBH (+) lifler (C) gösterilmektedir.



Şekil 3.10 mPFC'deki TH (+) dopaminergic liflerin Image-Pro Plus yazılımı kullanılarak toplam uzunluklarının hesaplanmasını gösteren fotomikrografi (büyütme 60X). Yüzde analizi için, mPFC'nin I. tabakasındaki TH (+) ve TH-DBH (+) lifler Image-Pro Plus yazılımı kullanılarak toplam uzunlukları ve birbirine oranlanarak yüzdeleri hesaplanmıştır.

3.5. Clarity Tekniğinin Uygulanması

Clarity tekniğinin uygulanması sırasında kullanılacak olan hidrojel ve clearing solüyonları deneme öncesinde taze olarak hazırlandı. Hidrojel solüsyonunun hazırlanmasında kullanılacak kimyasalların (akrilamid, bisakrilamid, PFA) toksik olmaları sebebiyle hazırlama öncesinde kişisel koruyucu ekipmanlar giyildi ve solüsyon çeker ocak altında hazırlandı. Hidrojel solüsyonunun hazırlanmasında kullanılacak 10XPBS ve %16 PFA solüsyonları ayrıca hazırlandı. 10X PBS solüsyonunun hazırlanması için 1 adet PBS tablet 20 ml dH₂O içerisinde tablet çözülünceye dek karıştırıldı. %16 PFA solüsyonunun hazırlanması için 8 g PFA tartılarak 50 ml dH₂O içerisine eklendi ve opak beyaz renge alana dek 60-65°C'ye kadar ısıtıldı. Renk berrak hale gelene dek 1 N NaOH solüsyonu damlatıldı. Solüsyon oda sıcaklığına geldikten sonra filtre ederek kullanıma hazır hale getirildi. Hazırlanan her iki solüsyonun pH'ları ölçülerek uygun aralıklara getirildi.

Hidrojel solüsyonu 400 ml olacak şekilde stok olarak hazırlandı. Hidrojel solüsyonunun hazırlanması sırasında polimerizasyon oluşumunu engellemek için kullanılacak kimyasallar buz üzerine konuldu. Karıştırıcı üzerine alınan 500 ml'lik erlene 150 ml dH₂O koyuldu. Üzerine hızla 40 ml %40 akrilamid ve 10 ml %2 bisakrilamidi sırasıyla pipetlenerek eklendi. Önceden hazırlanmış olan %16 PFA'dan 100 ml,

10XPBS'den 40 ml eklenerek orta hızla karıştırmaya devam edildi. Karışmakta olan solüsyona 1g azo-başlatıcı eklendi. Hazırlanan solüsyon mezüre alınarak 400 ml hacmine ulaşana dek dH₂O eklendi. Buz üzerinde hazır olan 50 ml'lik falkonlara 40 ml olacak şekilde solüsyonu paylaştırıldı. Aliquotlanan falkonların kapakları sıkıca kapatıldı ve üzerleri parafilm ile kaplanarak -20 °C'ye kaldırıldı.

Clearing solüsyonun hazırlanmasında kullanılan sodyum SDS'in de toksik olması sebebiyle clearing solüsyonu hazırlanması sırasında da kişisel koruyucu ekipmanlar giyildi ve solüsyon çeker ocak altında hazırlandı. Karıştırıcı üzerine alınan 2000 ml'lik behere 1600 ml dH₂O konuldu. İçerisine 80g SDS, 24.73g borik asit eklendi ve karışım homojen hale gelene dek karıştırıldı. Homojen hale gelen solüsyonun pH'sı sodyum hidroksit ile 8,5'e ayarlandı. Solüsyon mezüre alarak hacmi 2000 ml'ye tamamlandı. Cam şişeye alınan solüsyon oda sıcaklığında kullanılabilecek şekilde bekletildi.

Clarity tekniği uygulanacak olan Sprague Dawley cinsi yetişkin sıçanlar intraperitoneal olarak uygulanan ketamin (100 mg/kg) ve ksilazin hidroklorid (10 mg/kg) ile derin anestezi altına alındı ve ekstremitesine ağırlı uyaran verilerek refleksleri kontrol edildi. Sıçanlar çeker ocak altında, düz bir zeminde buz üzerine yatırılarak perfüzyona hazır hale getirildi. Perfüzyon öncesinde daha önceden aliquotlanmış dondurulmuş hidrojel monomer çözeltisi polimerizasyonu engellemek için buz üzerinde çözdürüldü. Çözelti tamamen eridiğinde hafifçe ters çevirerek karıştırıldı ve çözültide hava kabarcığı veya çökelti olmadığından emin olundu. Eriyen hidrojel solüsyonundan perfüzyonda kullanılmak üzere 20 ml enjektör içerisine çekildi ve enjektör buz içerisine konuldu. Falkonda kalan 20 ml solüsyon ise hidrojel inkübasyonunda kullanılmak üzere +4°C'ye kaldırıldı. Önceden hazırlanmış 20 ml 1XPBS de enjektöre çekilerek perfüzyon öncesi +4°C'ye getirildi. Perfüzyona 20 ml 1XPBS (pH 7,4) ile başlandı ve 20 ml hidrojel solüsyonu ile devam edildi. Solüsyonların her biri yaklaşık iki dakika süre içerisinde verildi. Perfüzyonun tamamlanmasının ardından giyotin aracılığıyla ötenazi yapıldı. Yine buz üzerinde beyinler hızlıca çıkartıldı ve içerisinde 20 ml hidrojel solüsyonu olan falkona konuldu. Falkonun kapağı kapatıldı ve floroforu engellemek için falkon alüminyum folyo ile kaplandı. Hidrojen solüsyonunun doku içine daha fazla difüze olması için +4 °C'de 2 gün inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında hidrojel doku gömülmesinin (polimerizasyon) başlatılması için polimerizasyon oluşumunu engelleyecek oksijen ortamdan uzaklaştırıldı (degassing). Bunun için boş bir enjektör içerisine hidrojel inkübasyonu tamamlanan beyin konuldu ve içerisine bir miktar zeytinyağı çekildi. Enjektörün ucu kapatılarak parafilm ile kaplandı ve sıcaklığı 42°C'ye ayarlanmış olan su banyosu içerisine yerleştirildi. Su banyosunun içerisine, içerisinde sadece hidrojel solüsyonu bulunan ayrı bir enjektör de konuldu. Bu sayede içerisinde sadece hidrojel solüsyonunun bulunduğu enjektörde polimerizasyon tamamlandığında diğer enjektörde bulunan doku içerisinde

de polimerizasyonun tamamlandığı teyit edildi. Polimerizasyonun tamamlanmasının ardından sürecin son basamağı olan clearing basamağına geçildi.

Clearing basamağı TÜBİTAK 114S407 nolu proje ekibimiz tarafından tasarlanan kompakt organ elektroforez sistemi (CORES) ile yapıldı. Clearing basamağı için CORES içerisine alınan beyin, clearing solüsyonunda yaklaşık 37°C ve 0-3 A arasında değişen bir akım altında 48 saat süre boyunca elektroforeze tabi tutuldu. Clearing sonrası şeffaf hale getirilen beyin dokusu yaklaşık 3 mm kalınlığında sagittal olarak dilimlendi. İmmünohistokimyasal boyama öncesinde dokudan fazla SDS'in uzaklaştırılması için beyin dilimleri tritonlu fosfat tamponlu salin (1XPBS içinde 0,1% TritonX-100) solüsyonu içerisinde oda sıcaklığında gece boyu inkübasyona bırakıldı. Bu inkübasyon ertesi gün solüsyon değiştirilerek tekrar edildi. İnkübasyonların tamamlanmasından sonra dopaminerjik nöronların bulunduğu *mesencephalon*'u içeren kesitlere TH boyaması yapıldı. Kesitler %0,1Triton X-100, %5 keçi serumu, %0.05 sodyum azit içeren 0.01M PBS solüsyonu ile dilüe edilen TH primer antikoru (1:1000) içerisinde oda sıcaklığında 3 gün inkübe edildi. Primer inkübasyon sonrası kesitler birkaç defa (3 dakika, 3 tekrar) PBS ile yıkamayı takiben, %1 keçi serumlu 1XPBS ile dilüe edilmiş FITC konjuge TH sekonder antikoru (1:1000) içerisinde oda sıcaklığında 4 saat inkübe edildi. Kesitler bir kaç defa 1XPBS ile yıkandı ve görüntüleme öncesi dokunun refraksiyon indeksinin eşitlenmesi için %80 gliserol solüsyonuna alınarak 48 saat inkübe edildi. İnkübasyon sırasında floresan kaybının önlenmesi için alüminyum ile kaplanarak ışıktan korundu. Multifoton mikroskopunda kesitlerin incelenmesinin konvansiyonel mikroskoplardan farklılık göstermesi sebebiyle, kesitlerin incelenebilmesi için dokunun hava ile teması kesileceği bir havuz oluşturularak görüntü alındı.

3.6 İstatistiksel Analiz

Elde edilen verilerin istatistiksel analizi bilgisayar ortamında SPSS (Statistical Package for Social Sciences, 21. sürüm) programında yapıldı. Veriler, ortalama, standart sapma, ortanca, minimum ve maksimum tanımlayıcı istatistikleri ile ifade edildi. Verilerin normal dağılıma uygunluğu gruptaki olgu sayılarının otuzdan az olması sebebiyle Shapiro-Wilk testi ile belirlendi. Her iki grubun dağılımının normal dağılıma uyması ve örneklem sayısının on'un üzerinde olması durumunda, grupların ortalamaları arasındaki fark, parametrik bağımsız örneklem t testi ile değerlendirildi. Gruplardan birinin veya her ikisinin normal dağılıma uymadığı durumda, gruplar arasındaki farklılık parametrik olmayan Mann Whitney U testi ile değerlendirildi. %95'lik güven aralığında ve $p < 0,05$ olan farklar anlamlı kabul edildi.

4.BULGULAR

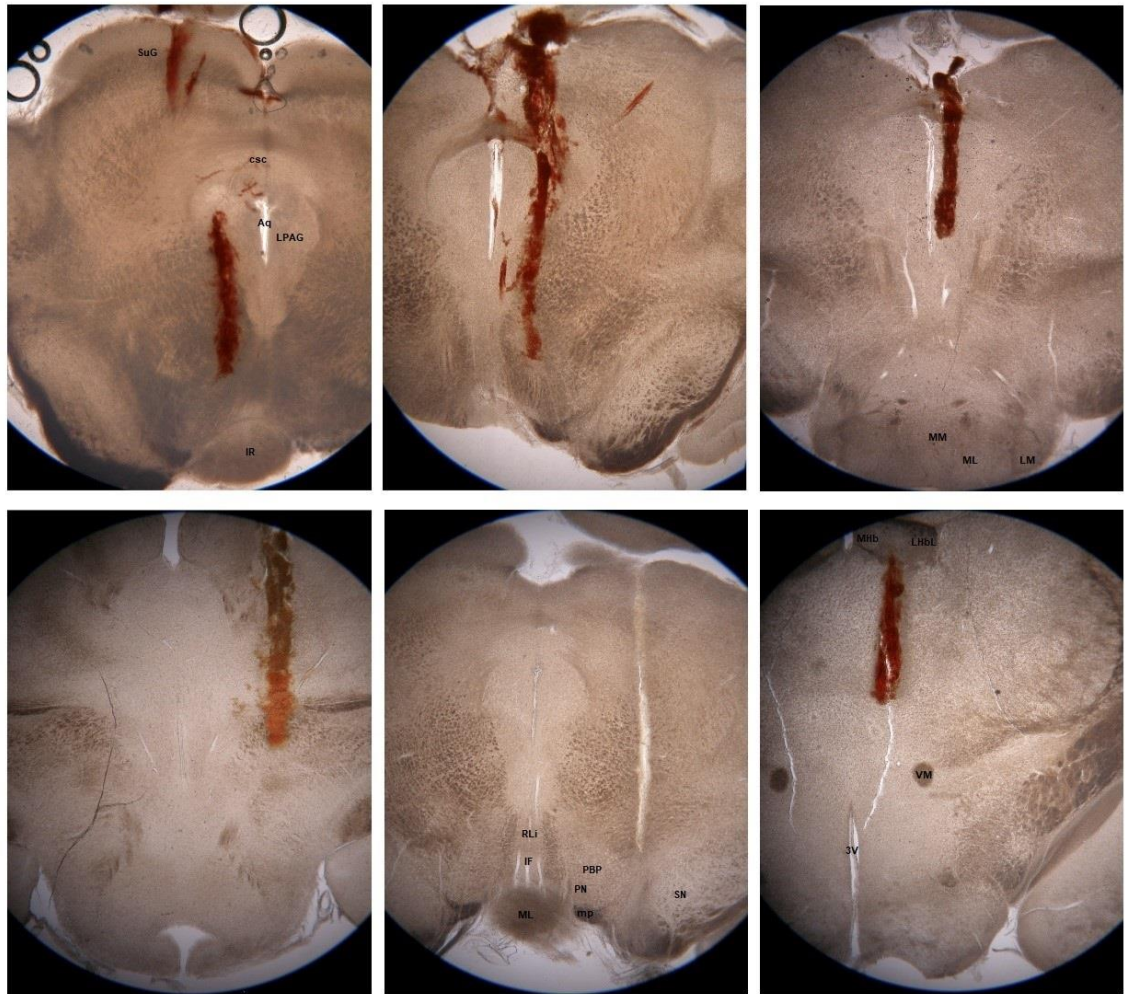
4.1. Ventral Tegmental Alan'ın Stereotaksik Koordinatlarının Belirlenmesi

Tez çalışmasında üç haftalık sıçanlara VTA enjeksiyonu uygulamasında başarılı olunamadı. Gelişmekte olan sıçanların beyin yapılarının stereotaksik koordinatlarını gösteren bir atlas bulunmaması sebebiyle öncelikle VTA'nın koordinatları belirlenmeye çalışıldı. Satın alınan SHR'lerin yüksek maliyetli olmasından dolayı denemeler postnatal dördüncü hafta içerisindeki sütten yeni kesilmiş Sprague Dawley sıçanlar kullanılarak yapıldı. Koordinatların tespit edilmesi için yapılan denemeler, yetişkin sıçanlara ait VTA koordinatları göz önünde oran orantı hesabıyla bulunmaya çalışıldı (Tablo 4.1). Ancak bu denemelerde VTA koordinatlarına standart şekilde ulaşamadığı tespit edildi (Şekil 4.1). Bu nedenle VTA'nın izleyicilerle işaretlenerek mezokortikal dopaminerjik yolağın ve bu yolağa ait liflerin dağılımının tespit edilmesinden vazgeçildi.

Tablo 4.1 Denemeler için hesaplanan VTA stereotaksik koordinatları. Erişkin sıçak için hazırlanan stereotaksik koordinat atlası verileri temel alınarak juvenil sıçan ile erişkin sıçan L-B mesafesi oranlanarak aynı oran koordinatların hesabında kullanıldı.

Deneme No	Sıçan Ağırlığı (gr)	L-B Mesafesi (mm)	Hesaplanan AP Koordinatı	Hesaplanan ML Koordinatı	Hesaplanan DV koordinatı
1	30	6.6	3.8	0.5	6.0
2	24.4	5.2	3.0	0.4	4.7
3	44	6.1	3.5	0.5	5.6
4	49	6.2	3.6	0.5	5.7
5	44	5.5	3.2	0.4	6.9
6	42	5.9	3.4	0.5	5.4 (-0.8)
7	28.5	4.9	2.8	0.4	4.5 (-1)
8	30	5.9	3.4	0.5	5.4 (-1)

9	28.7	6.0	3.5	0.5	5.5
10	35.4	6.3	3.7	0.5	5.8 (-1)
11	43.4	5.7	3.4	0.5	5.2 (-1)
12	41.6	6.3	3.7	0.5	5.8 (-1)
13	40.1	6.6	3.9	0.6	6.1
14	38.2	6.4	3.8	0.4	5.9
15	29	5.8	3.4	0.5	5.3 (-1)
16	29	5.2	3.1	0.5	4.8 (-1)
17	39	6.2	3.6	0.5	5.7
18	50	5.3	3.1	0.5	4.7 (-1)
19	40	5.5	3.2	0.4	6.9 (-1)
20	-	5.9	3.4	0.5 / 0.5	5.4 (-2/-2.5)

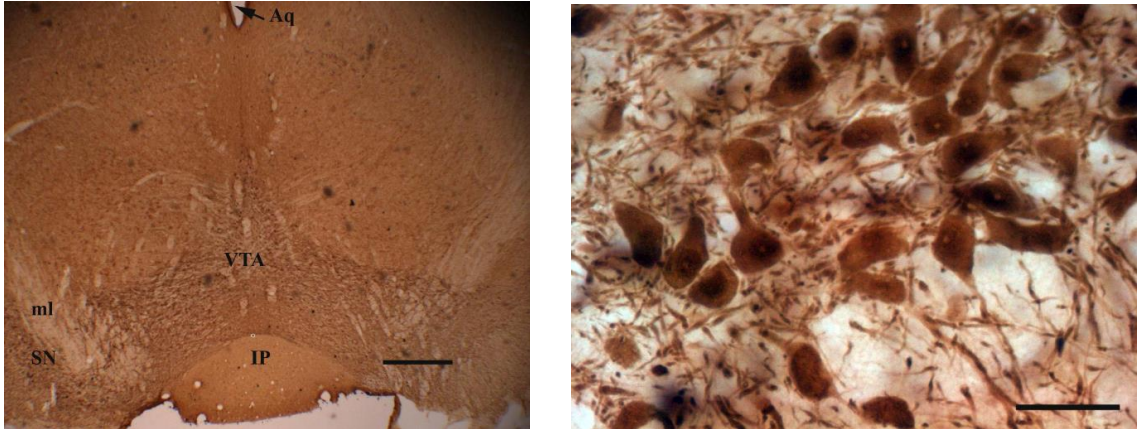


Şekil 4.1 Ventral tegmental alana stereotaksik enjeksiyon ile koordinat belirleme denemeleri sonucu elde edilen koronal kesit görüntüleri. İşaretleyicinin VTA' ya ulaşmadığına dair örnek fotoğraflar görülmektedir. Aq:aqueductus cerebri, LPAG:

Substantia grisea centralis, csc: Commissura colliculorum superiorum, SuG:colliculus superior lamina superficialis, IR: nucleus interpeduncularis, MM:nucleus mamillaris medialis (pars medialis) ML: nucleus mamillaris medialis (pars lateralis) LM: nucleus mamillaris lateralis, RLi: nucleus linearis rostralis, IF: nucleus interfascicularis, PBP: nucleus pigmentosus parabrachialis, PN: nucleus paranigralis, mp:pedunculus mamillaris, SN: substantia nigra, 3V: ventriculus tertius, VM: nucleus thalamicus ventromedialis, MHb: nucleus habenularis medialis, LHbL: nucleus habenularis lateralis (pars lateralis).

4.2. Ventral Tegmental Alanda TH Pozitif Dopaminerjik Nöron Yoğunluğu

Sıçanlarda VTA'da bulunan dopaminerjik nöronların belirlenmesinde TH immunohistokimyası kullanıldı (Şekil 4.2). VTA' da bulunan TH (+) dopaminerjik nöronların hacimsel olarak yoğunluğu (yoğunluk: TH (+) dopaminerjik nöron/hacim) hesaplandı. Elde edilen verilerin normal dağılıma uygun olup olmadığı, her bir gruptaki olgu sayısının otuzdan az olması sebebiyle Shapiro-Wilk testi ile belirlendi (WKY grubu için $p=0,233$ SHR grubu için $p=0,456$). Her iki grubunun dağılımının normal dağılıma uyması sebebiyle, dopaminerjik nöron yoğunluklarının gruplar arasındaki farklılığı parametrik bağımsız örneklem t testi ile karşılaştırıldı (Tablo 4.3). SHR grubunun TH (+) dopaminerjik nöron yoğunluğu WKY grubuna göre anlamlı derecede düşük olduğu bulundu ($p=0.044$) (Şekil 4.5).

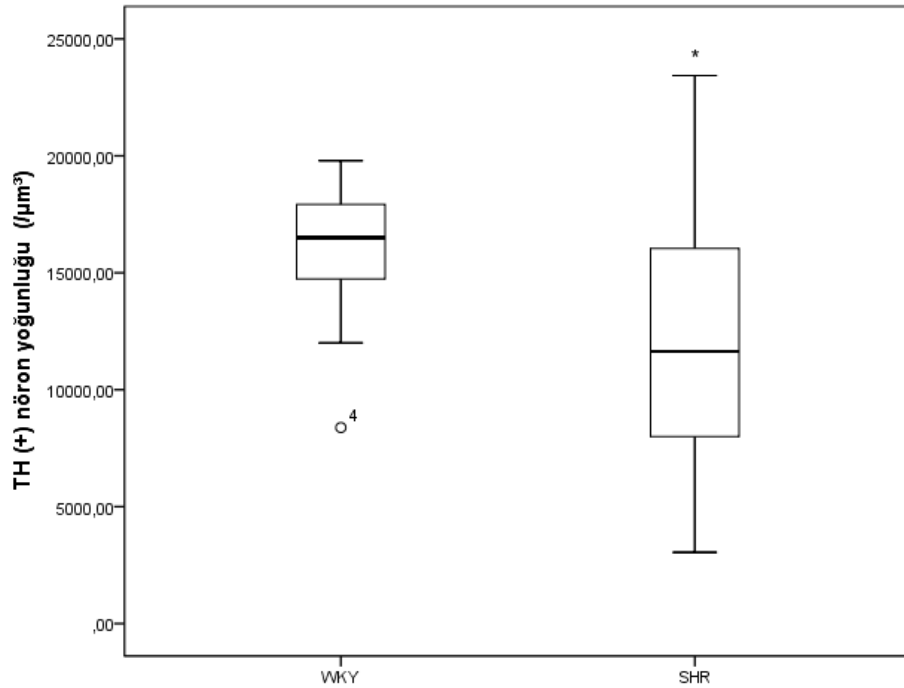


Şekil 4.2 VTA'da TH immunohistokimyası ile boyanmış nöronların 5x (sol) ve 40x (sağ) büyütmedeki fotomikrografileri görülmektedir. 40X büyütmede VTA sınırları içinde kalan TH (+) nöronlar, analiz gerçekleştirilen hacme bölünerek nöron yoğunlukları hesaplandı. ml:lemniscus medialis, IP: nucleus interpeduncularis, VTA: ventral tegmental area, Aq: aquaductus cerebri, SN: Substantia nigra [Skala: 400 μ m (solda), 20 μ m (sağda)].

Tablo 4.2 VTA'daki TH(+) dopaminerjik nöronların yoğunluğu (μm^3)

Gruplar	N	Ortalama	Std. Sapma	Ortanca	Minimum	Maksimum
WKY	12	15897	3229	16500	8381	19789
SHR	20	12041	5828	11641	3048	23429

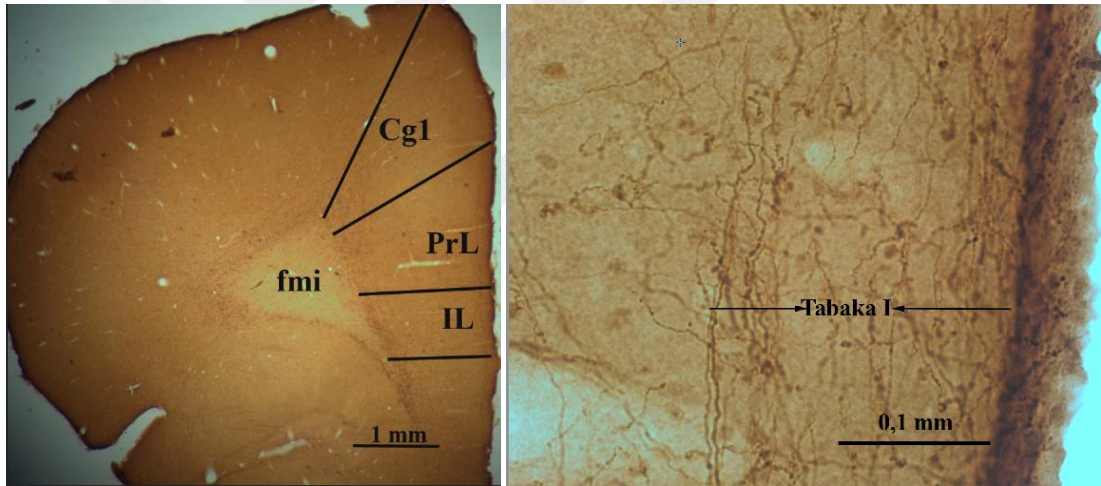
Tabloda verilen değerler, ortalama, standart sapma, ortanca, minimum ve maksimum değerlerini göstermektedir. WKY= Wistar Kyoto Sıçan, SHR= Spontan hipertansif sıçan. Tüm analizlerde, 3 WKY kontrol, 5 SHR sıçan kullanıldı. VTA'da yapılan nöron yoğunluğu analizlerinde, sıçan başına dört farklı VTA sınırı içinde sayım yapıldı. Grup içi elde edilen değerlerde, varyansların dağılımının homojenliği test edilerek, denek sayıları, kontrol grubu n=12 (3 sıçan x 4 VTA alanı), SHR grubu ise n=20 (5 sıçan x 4 VTA alanı) olarak kullanıldı.



Şekil 4.3 WKY ve SHR gruplarında VTA'daki TH (+) dopaminerjik nöronların hacimsel yoğunluklarının kutu grafiği. Grafikte verilen değerler bir çeyrek, üç çeyrek sınır değerleri, çeyrekler arası aralık ve uç değerleri göstermektedir. (WKY = Wistar Kyoto Sıçan (n=12); SHR = Spontan hipertansif sıçan (n=20). * p<0.05.

4.3. Medial Prefrontal Kortekste TH (+) Dopaminerjik Lif Yoğunluk Analizi

İzleyici enjeksiyonunda VTA koordinatının standart olarak saptanması nedeniyle VTA kaynaklı dopaminerjik liflerin gösterilmesinde izleyici olmaksızın immunohistokimyasal boyama yöntemi kullanıldı. TH immunohistokimyasal boyaması ile mPFK'nin PrL alanının I.tabakasındaki dopaminerjik lifler belirlendi (Şekil 4.4). WKY ve SHR gruplarında, mPFK'nin PrL alanının I. tabakasındaki TH (+) dopaminerjik liflerin hacimsel yoğunlukları (TH (+) dopaminerjik liflerin uzunluğu/hacim) hesaplandı. Her bir gruptaki olgu sayısının otuzdan az olması sebebiyle elde edilen verilerin normal dağılıma uygun olup olmadığı, Shapiro-Wilk testi ile belirlendi (WKY grubu için $p=0,309$, SHR grubu için $p=0,030$). SHR grubunun dağılımının normal dağılıma uymamasından dolayı dopaminerjik lif yoğunluklarının gruplar arasındaki farklılığı nonparametrik Mann-Whitney U testi ile karşılaştırıldı (Tablo 4.3). SHR grubunun TH (+) dopaminerjik lif yoğunluğu WKY grubuna göre anlamlı derecede düşük bulundu ($p=0.032$) (Şekil 4.5).

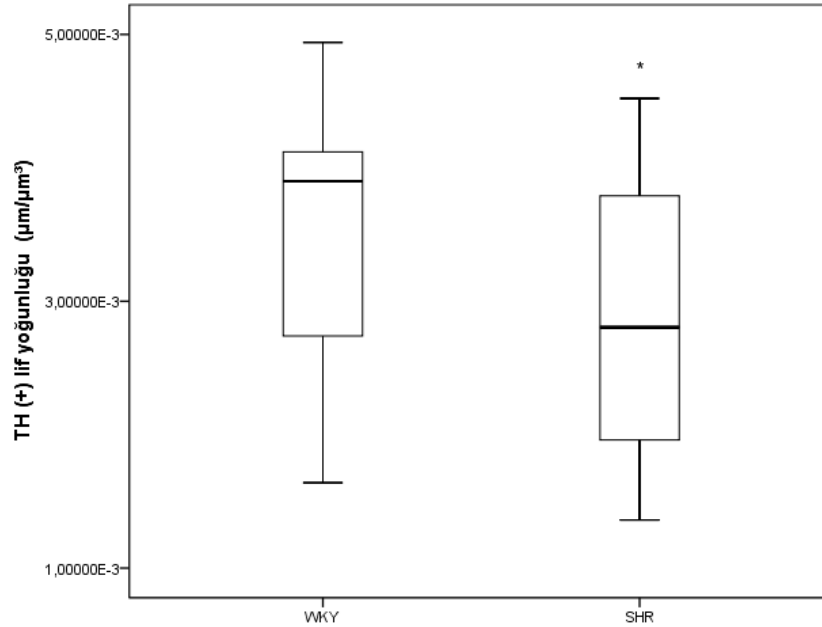


Şekil 4.4 mPFK'deki TH immunohistokimyası ile boyanmış aksonların 1.6X (sol) ve 40X (sağ) büyütmedeki örnek fotomikrografisi. Solda, mPFK'nin alt alanları, sağda ise mPFK'nin PrL alanının I.tabakasındaki TH (+) lifler göstermektedir. 40X büyütmede ROI içinde kalan liflerin toplam uzunları, analiz gerçekleştirilen hacme bölünerek lif yoğunlukları hesaplandı. fmi: forceps minor (corpus callosum), Cg1: cortex cingularis, PrL: prelimbik alan, IL: infralimbik alan

Tablo 4.3 mPFK'daki TH(+) dopaminerjik liflerin yoğunluğu ($\mu\text{m}/\mu\text{m}^3$)

Gruplar	N	Ortalama	Std. Sapma	Ortanca	Minimum	Maksimum
WKY	17	0,0036	0,0009	0,0039	0,0016	0,0049
SHR	30	0,0029	0,0010	0,0028	0,0014	0,0045

Tabloda verilen değerler, ortalama, standart sapma, ortanca, minimum ve maksimum değerlerini göstermektedir. WKY= Wistar Kyoto Sıçan, SHR= Spontan hipertansif sıçan. Tüm analizlerde, 3 WKY kontrol, 5 SHR sıçan kullanıldı. mPFK'de yapılan lif yoğunluğu analizlerinde, sıçan başına altı farklı dikdörtgen içinde sayım yapıldı. Grup içi elde edilen değerlerde, varyansların dağılımının homojenliği test edilerek, denek sayıları, kontrol grubu n=17 (3 sıçan x 6 farklı sayım alanı), SHR grubu ise n=30 (5 sıçan x 6 farklı sayım alanı) olarak kullanıldı. Kontrol grubu verilerinden 1 tanesi immunohistokimyasal boyamadaki problem sebebiyle analizden dışlandı.

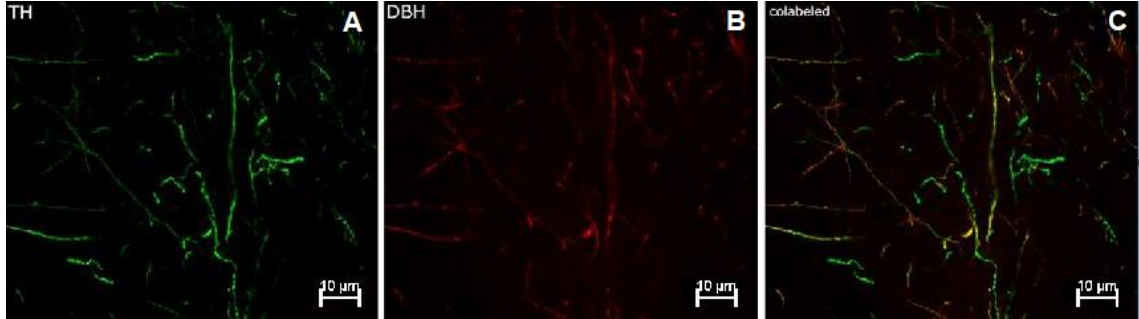


Şekil 4.5 WKY ve SHR gruplarında mPFK'deki TH (+) dopaminerjik liflerin yoğunluklarının kutu grafiği. Grafikte verilen değerler bir çeyrek, üç çeyrek sınır değerleri, çeyrekler arası aralık ve uç değerleri göstermektedir. WKY = Wistar Kyoto Sıçan (n=17); SHR = Spontan hipertansif sıçan (n=30). * p<0.05.

4.4. Medial Prefrontal Kortekste TH Pozitif Dopaminerjik Lif Yüzdesi Analizi

mPFK'nın PrL alanının I. tabakasında bulunan dopaminerjik liflerin belirlenmesinde TH immunohistokimyasal boyası, noradrenerjik liflerin belirlenmesinde DBH immunohistokimyasal boyası kullanıldı (Şekil 4.6). mPFK'deki TH (+) kortikal

aksonların dopaminerjik veya noradrenerjik karakterini ortaya koymak için ikili immün boyama (TH-DBH) uygulandı WKY ve SHR gruplarında mPFK'nın PrL alanının I. tabakasında dopaminerjik liflerin yüzdesi (TH (+) dopaminerjik liflerin uzunluğu/tüm liflerin uzunluğu)*100) hesaplandı.



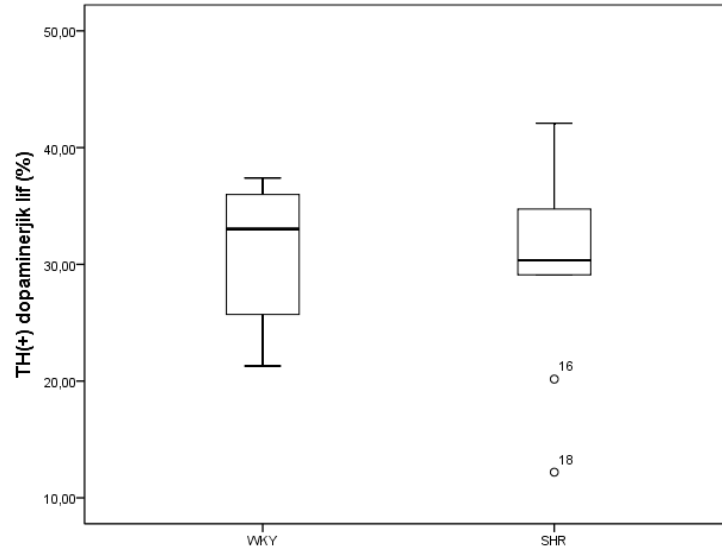
Şekil 4.6 mPFK'nın PrL alanının I. tabakasındaki TH-DBH immunohistokimyası uygulanmış kesitlerin örnek fotomikrografileri (büyütme 60x). TH (+) dopaminerjik (A), DBH (+) noradrenerjik (B) ve TH-DBH (+) lifler (C) gösterilmektedir.

Her iki grubunun dağılımının normal dağılıma uyması sebebiyle (WKY grubu için $p=0,247$, SHR grubu için $p=0,556$), dopaminerjik lif yüzdesi ortalamalarının, gruplar arasındaki farklılığı, parametrik bağımsız örneklem t testi ile karşılaştırıldı (Tablo 4.4). İki grup arasında TH (+) dopaminerjik lif yüzdesi arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0.845$) (Şekil 4.7).

Tablo 4.4 mPFK'deki TH (+) dopaminerjik liflerin toplam lif uzunluğuna oranı (%)

Gruplar	N	Ortalama	Std. Sapma	Ortanca	Minimum	Maksimum
WKY	9	30,86	6,07	33,03	21,29	37,39
SHR	9	30,13	9,23	30,35	12,20	42,09

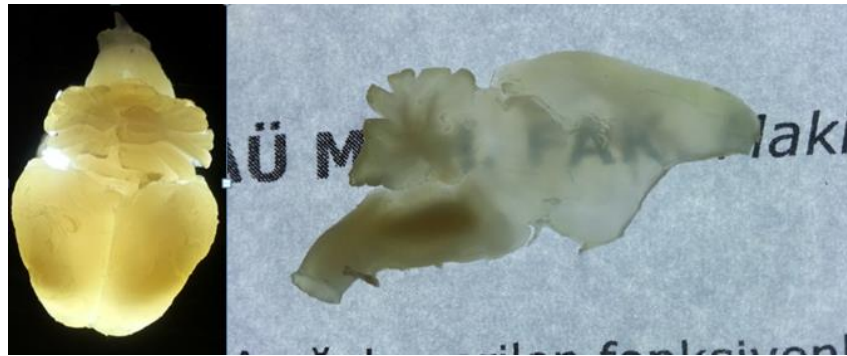
Tabloda verilen değerler, ortalama, standart sapma, ortanca, minimum ve maksimum değerlerini göstermektedir. WKY= Wistar Kyoto Sıçan, SHR= Spontan hipertansif sıçan. Konfokal mikroskopisi analizinde, 3 WKY kontrol, 3 SHR sıçan kullanıldı. Dopaminerjik lif yüzdesi belirlenmesinde, sıçan başına üç farklı alan değerlendirildi. Grup içi elde edilen değerlerde, varyansların dağılımının homojenliği test edilerek, denek sayıları, kontrol grubu $n=9$ (3 sıçan x 3 farklı sayım alanı), SHR grubu ise $n=9$ (3 sıçan x 3 farklı sayım alanı) olarak kullanıldı.



Şekil 4.7 WKY ve SHR gruplarında mPFK'deki TH (+) dopaminergic liflerin yüzdeleri gösteren kutu grafiği. Grafikte verilen değerler bir çeyrek, üç çeyrek sınır değerleri, çeyrekler arası aralık ve uç değerleri göstermektedir. WKY = Wistar Kyoto Sıçan (n=9); SHR = Spontan hipertansif sıçan (n=9).

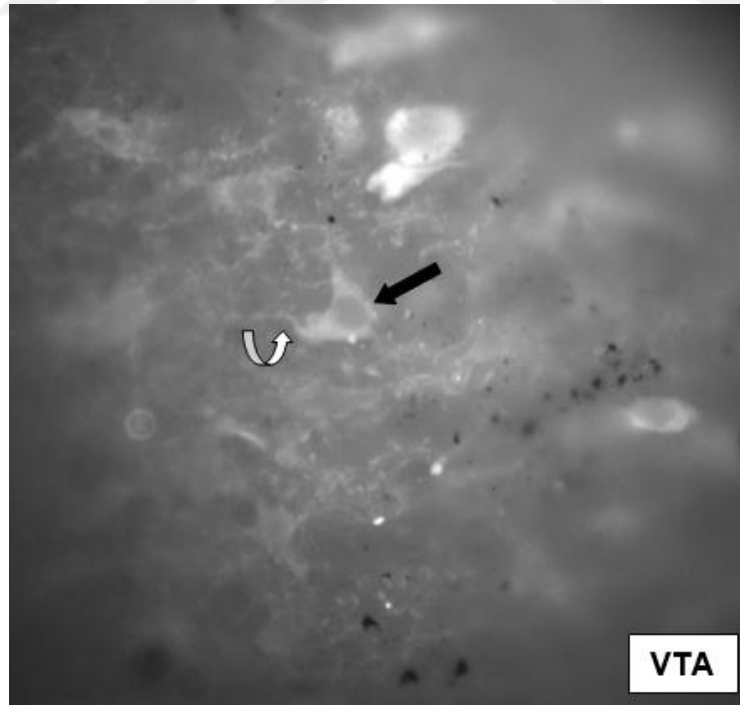
4.5 Clarity Tekniği Kullanılarak VTA'daki Dopaminergic Nöronların Görüntülenmesi

Clarity tekniği ile VTA'daki mezokortikal dopaminergic nöronların akson bütünlüğünü ve topografik dağılımının ortaya konulması teknik sıkıntılar nedeniyle mümkün olmamıştır. Ancak, bu teknik kullanılarak VTA'daki mezokortikal dopaminergic nöronlar ortaya koyulmuştur. Clarity tekniğinin ikinci basamağı olan şeffaştırma basamağı TÜBİTAK 114S407 nolu proje tarafından desteklenen çalışmamız kapsamında tasarlanan CORES ile yapılmış ve şeffaştırma sağlanmıştır (Şekil 4.7).

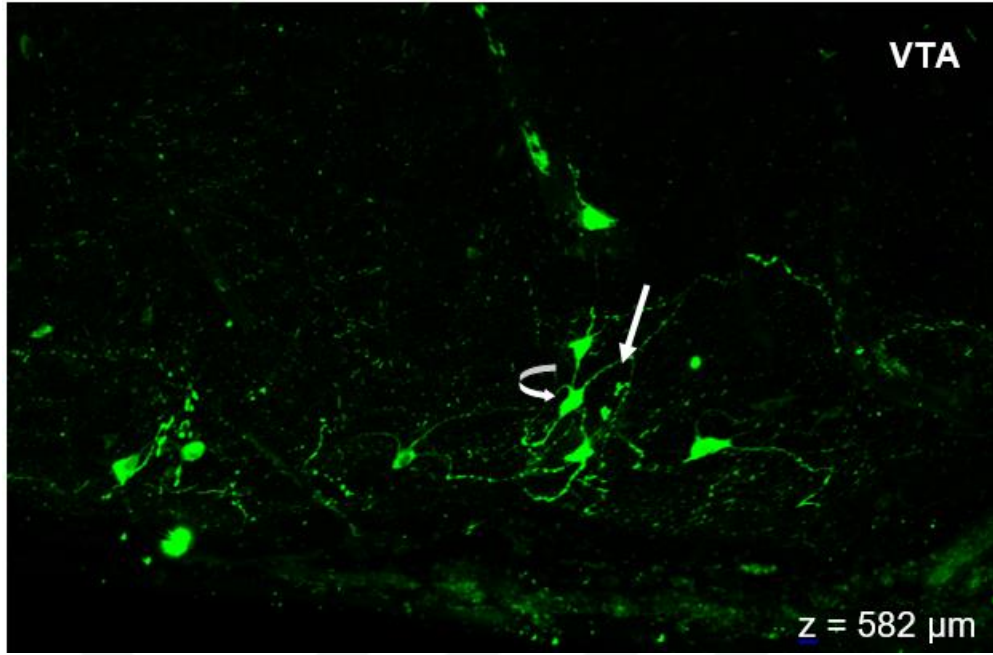


Şekil 4.8 Kırk sekiz saat boyunca yapılan elektroforez işlemi sonrası polimerize edilmiş sıçan beyinde elde edilen şeffaştırma gösteren örnek fotoğraflar. Solda beyin bütün olarak görülmekte, sağda ise 3 mm kalınlığındaki sagittal kesit yer almaktadır.

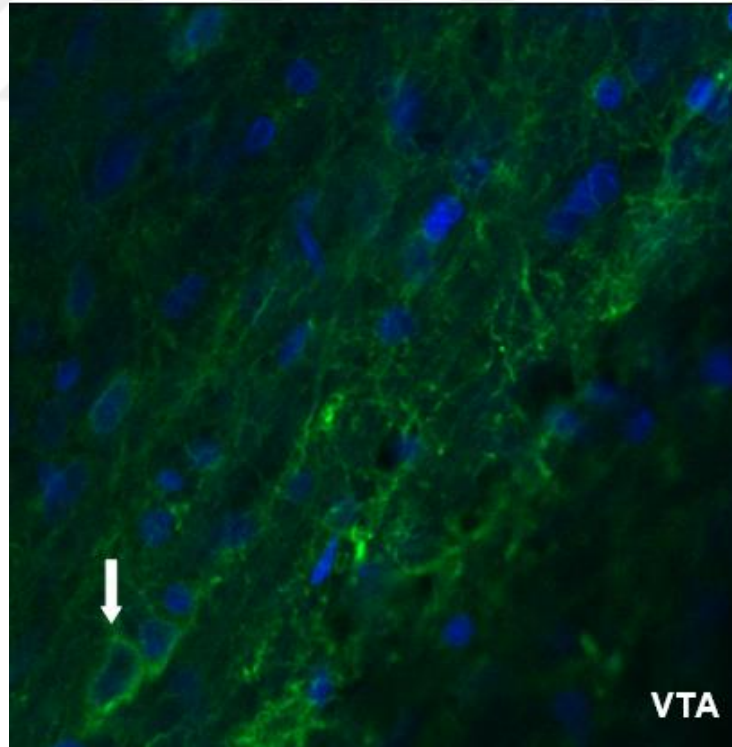
Clearing basamağı sonrasında beyin dokusu 3 mm kalınlığında dilimlenmiş ve dopaminerjik nöronların bulunduğu mesencephalon'u içeren kesitlere TH immunohistokimyası uygulanmıştır. Clarity tekniğinin uygulanmasının ve TH immunohistokimyası ardından, yaklaşık 3 mm kalınlığıdaki kesitler floresan mikroskobu kullanılarak görüntülenmiştir. Bu kalınlığın, floresan mikroskobu ile görüntü almak için oldukça fazla olması sebebiyle temiz bir görüntü elde edilememiş olup dopaminerjik nöronlar kabaca gösterilebilmiştir (Şekil 4.8). Floresan mikroskobu ile gösterilen nöronların detaylı incelenmesi için, TÜBİTAK 114S407 nolu proje tarafından desteklenen çalışmamız kapsamında hizmet satın alınması yapılmıştır. Hizmet kapsamında Medipol Üniversitesi Rejeneratif ve Restoratif Tıp Araştırmaları Merkezi bünyesinde bulunan multifoton ve konfokal mikroskopları kullanılarak aynı alan görüntülenmiştir (Şekil 4.9). Bu mikroskoplar ile inceleme öncesinde dokunun refraksiyon indeksinin eşitlenmesi gerekmektedir. Bu sebeple immunohistokimyasal boyamanın son yıkama basamağını takiben, görüntülemeye 48 saat önce için kesitler %80 gliserol solüsyonuna alınmıştır. Gliserol solüsyonu görüntü alınana kadar dokuda opasiteye neden olmuştur fakat bu görüntülemeye engel olmamıştır. Medipol Üniversitesine götürülen kesitler 30 dakika DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) boyasında inkübe edilmiş ve dopaminerjik nöron çekirdeklerinin de gösterilmesi sağlanmıştır (Şekil 4.10).



Şekil 4.9 VTA'da TH (+) dopaminerjik nöron gövdesinin (siyah ok) ve uzantısının (beyaz ok) konvansiyonel floresan mikroskobu ile elde edilen örnek görüntü (büyütme 40X,TH).



Şekil 4.10 VTA'da TH (+) dopaminerjik nöronların konfokal mikroskobu ile elde edilen örnek görüntü (büyütme 10X, FITC, z=582 μ m). Beyaz ok nöronlar arası bağlanmayı, kıvrık ok ise dopaminerjik nöron gövdesini göstermektedir.



Şekil 4.11 VTA'daki dopaminerjik nöronların TH ve DAPI boyaması sonrası konfokal mikroskobu ile elde edilen örnek görüntü (büyütme 10X, FITC, DAPI, z=184 μ m). Beyaz ok dopaminerjik nöronu ve DAPI ile boyanmış nöron çekirdeğini göstermektedir.

5.TARTIŞMA

Bu alışmada, DEHB hayvan modeli olarak kullanılan SHR'lerde, dopaminerjik disfonksiyonun, mezokortikal dopaminerjik yolağa ait nöron ve liflerde azalma olduğu hipotezinden hareketle, mezokortikal dopaminerjik yolağa ait nöron ve lif yoğunluğunda azalma olup olmadığı araştırılmıştır. SHR'lerde mezokortikal dopaminerjik yolağa ait nöron gövdelerinin bulunduğu VTA'da, TH (+) nöron yoğunluğunun kontrol grubundakilere kıyasla anlamlı derecede düşük olduğu gözlenmiştir. Buna ek olarak, SHR'lerde PFK'de TH (+) lif yoğunluğunun da kontrol grubundakilere kıyasla anlamlı derecede düşük olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Mezokortikal dopaminerjik yolağın projekte olduğu mPFK'de analize dâhil edilen TH (+) liflerin dopaminerjik veya noradrenerjik olduğunun ayırt edilmesi için, aynı alanda TH / DBH ikili immünohistokimyası uygulanarak DA/NE yüzdeleri belirlenmiştir. Yapılan yüzde analizi sonucunda, SHR'lerde her iki tipteki katekolaminerjik liflerde de azalma olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

Bu alışmada DEHB hayvan modeli olarak SHR kullanılmıştır. Bu model bozukluğun patofizyolojik mekanizmalarını açıklamak ve yeni tedavi stratejileri geliştirmek için sıkça kullanılmaktadır (Sagvolden vd 2005a). Kontrol grubu olarak ise SHR'lerin öncülü olan WKY'ler kullanılmaktadır. Çalışmamızda, DEHB'deki dopaminerjik hipofonksiyon hipotezinin test edilmesi için ilk olarak, mezokortikal dopaminerjik yolağa ait nöron gövdelerinin bulunduğu VTA'da nöron yoğunluk analizi yapılmıştır. SHR'lerde TH (+) dopaminerjik nöron yoğunluğunun anlamlı olarak azaldığı saptanmıştır. Dopaminerjik hipofonksiyon hipotezinin test edilmesi için ikinci olarak, VTA'dan PFK'ye projekte olan mezokortikal dopaminerjik yolak liflerinin yoğunluk analizi yapılmıştır. SHR'lerde PFK'de TH (+) lif yoğunluğunun kontrol grubundakilere kıyasla anlamlı derecede düşük olduğu gözlenmiştir.

Bu alışmada, VTA'da bulunan dopaminerjik nöronların ve mPFK'de bulunan dopaminerjik liflerin saptanması için TH, mPFK'de bulunan noradrenerjik liflerin saptanması için DBH immunohistokimyası gerçekleştirilmiştir. Primatlarda yapılan immnositokimyasal çalışmalar, hem NE hem de DA afferentleri içeren PFK gibi beyin bölgelerinde, TH ve DBH antiserumlarının farklı popülasyonlara ait terminalleri

işaretlediği göstermiştir. TH immonoreaktivitesinin DA'ya daha spesifik olduğunun göstergesi olarak, TH (+) terminallerin dağılım paternlerinin, NE afferentlerine kıyasla DA afferentleri ile daha benzer olduğu gösterilmiştir (Lewis vd 1987, 1988, Noack ve Lewis 1989). Buna ek olarak, kortekse projekte olan NE nöronlarının bulunduğu locus coeruleus lezyonlarının, TH immünoreaktivitesini değiştirmeksizin, kortikal DBH immünohistokimyasını önemli ölçüde azalttığı belirtilmiştir (Lewis vd 1987, 1988). Sıçan PFK'sindeki terminallerin ultrastrüktürel karşılaştırmasında, TH veya DA için işaretlemeleri arasında farklılık olmadığı ortaya konulmuştur (Sesack vd 1995). Bu literatür bilgileri, TH içeren terminallerin immünohistokimyasal işaretleme sinin, PFK'deki DA aksonlarını tanımlamak için duyarlı ve spesifik bir yöntem olduğunu göstermektedir (Miner vd 2003). Sıçan PFK'sindeki TH immünoreaktivitesinin her ne kadar DA'ya spesifik olduğu gösterilse de, ışık mikroskopisi analizlerinde değerlendirilen mPFK'de, TH (+) liflerin, dopaminerjik mi yoksa noradrenerjik mi olduğunun ayırt edilmesi için, TH / DBH ikili immunohistokimyası uygulanmıştır. TH / DBH ikili immunohistokimyası sonucunda, konfokal mikroskopu kullanılarak, yalnız TH (+) lifler ile TH / DBH (+) lifler ayrı ayrı belirlenerek, dopaminerjik liflerin yüzdesi hesaplanmıştır. SHR'ler ile kontrol grubundakiler arasında, dopaminerjik lif yüzdeleri açısından anlamlı bir fark bulunmamıştır. Işık mikroskopisi analizi sonucunda, SHR'lerde, mPFK'de TH (+) lif yoğunluğunda azalma olmasına karşın, konfokal mikroskopisi analizi sonucunda, dopaminerjik lif yüzdesinin iki grup arası farklılık göstermemesi, DEHB modeli olarak kullanılan SHR'lerde mPFK'de, hem dopaminerjik hem de noradrenerjik liflerin azaldığına işaret etmektedir.

VTA'dan mPFK'ye olan mezokortikal DA sistemi de DEHB'de rol oynamaktadır (Arnsten vd 2009). Sıçan mPFK'si VTA ve bitişik bölgelerinde yer alan A10 hücre grubundan dopaminerjik afferentler almaktadır (Lindvall vd 1984). Mezokortikal DA sistemi PFK nöronlarının aktivitesi üzerinde inhibitör etki göstermektedir. VTA'nın elektriksel stimülasyonunun ve PFK'ye DA'nın mikroiyontoforetik uygulanmasının, kortikal hücrelerin kendiliğinden ateşleme hızlarının inhibisyonunu indüklediği gösterilmiştir (Sesack vd 1989, Godbout vd 1991). DEHB'li çocukların davranışsal problemlerinin, prefrontal kortikal nöronlar üzerinde güçlü inhibitör etki göstermesi sebebiyle, mezokortikal dopaminerjik projeksiyonlardaki disfonksiyondan kaynaklanabileceği öne sürülmektedir (Pirot vd 1992). PFK'ye projekte olan mezokortikal DA projeksiyon lezyonlarının, DEHB'de gözlenenlere benzer davranışsal bozukluklara neden olduğu yapılan hayvan çalışmaları ile gösterilmiştir (Bubser ve Schmidt 1990). Bizim çalışmamızda, SHR'lerde mezokortikal dopaminerjik yolağın nöron gövdelerinin bulunduğu VTA'da hücre yoğunluğunda ve bu nöronların mPFK'ye olan projeksiyonlarında azalma bulgusunun, DEHB'li çocukların davranış problemlerini

açıklayabileceği düşünülmüştür. Ayrıca, bu davranış problemlerinin, mezokortikal dopaminerjik projeksiyonlardaki disfonksiyondan kaynaklanabileceği bulguları ile benzerlik göstermektedir.

SHR'lerde WKY'lere kıyasla artmış lokomotor aktivitede, monoamin taşıyıcı inhibitörlerini inceleyen çalışmada, SHR'lerde monoamin taşıyıcı inhibitörleri sonrası gözlenen hiperaktivitedeki azalmanın, ekstraselüler DA ve NE'deki artış ile ilişkili olduğu, mPFK mikrodiyalizatında gösterilmiştir (Umehara vd 2013). Bu bulgular, SHR'lerdeki hiperaktiviteye, PFK'de çeşitli nörotransmitterlerdeki değişikliklerin neden olabileceğini düşündürmektedir. Ergenlik dönemindeki metilfenidat tedavisinin, PFK'de DA ve NE'de kalıcı adaptasyonlar oluşturarak, SHR'lerde gözlenen hiperaktiviteyi normalleştirdiği belirtilmiştir (Somkuwar vd 2016). Bizim çalışmamızda da bu bulguya paralel olarak, mPFK'de hem DA hem de NE liflerinin azaldığı saptanmıştır. Fakat çalışmamızda mPFK'de ekstraselüler DA ve NE düzeylerindeki değişiklikler arasındaki ilişki değerlendirilmemiştir. İleri çalışmalarda, mPFK'de ve mPFK'nin farklı alt alanlarındaki ekstraselüler DA ve NE düzeylerindeki değişikliklerin ve bu değişikliklerin DEHB ile ilişkisinin araştırılmasına ihtiyaç olabilir.

VTA'dan çıkan DA afferentlerinin dikkat, motivasyon, ödül, öğrenme ve bellek gibi çeşitli nöral fonksiyonlarda önemli rol oynadığı bilinmektedir (Kalivas ve Nemeroff 1988). VTA'da, fonksiyonları tanımlanmış ve iyi karakterize edilmiş DA içeren hücre popülasyonuna ek olarak, bu nöral fonksiyonlara katkı sağlayacak önemli miktarda DA olmayan projeksiyon nöronları da bulunmaktadır (Swanson vd 1982). Bu DA olmayan VTA nöronlarının nörokimyasal fenotipi bilinmemesine karşın, yapılan çalışmalar VTA'dan mPFK'ya olan DA dışı projeksiyonların en az bir kısmının GABA içerdiğini göstermektedir. Ayrıca anatomik çalışmalarda, VTA'da bir GABA hücre popülasyonu tanımlanmış ve bu popülasyonun, VTA'daki tüm nöronların %15 -20'sini oluşturduğu ortaya konmuştur (Mugniani ve Oertel 1985, Kosaka vd 1987, Yamaguchi vd 2007). VTA'da, GABA içeren nöronların büyük bir kısmının, hem piramidal hem de lokal devre nöronlarının distal uzantıları ile sinaps yaptıkları PFK'ye aksonlar gönderdiği gösterilmiştir. Bu GABA içeren mezokortikal yolağın, PFK nöronal aktivitesi üzerinde hem inhibitör hem de disinhibitör etkili olabileceği düşünülmektedir (Carr vd 2000). Bu tez çalışmasında, VTA'dan PFK'ye olan dopaminerjik lif yoğunluğundaki değişiklikler incelenmiş, VTA'dan PFK'ye olan GABAerjik liflerdeki değişiklikler incelenmemiştir. VTA'dan PFK'ye olan GABA içeren liflerin inceleneceği ileri çalışmaların, DEHB semptomlarından sorumlu olduğu düşünülen, PFK'deki nöral devrelerin anlaşılmasına katkı sağlayabileceği düşünülmüştür.

Bu tez çalışmasında, ışık mikroskopisi analizinde TH (+) liflerin SHR ve kontrol grupları arasında farklı olmasına karşın, konfokal mikroskopisi analizinde TH (+) lif

yüzdesinin iki grup arasında değişmemesi, SHR'lerde dopaminerjik liflerin yanı sıra noradrenerjik liflerin de azaldığını ortaya koymuştur. Literatür bilgisine göre, DEHB'de dopaminerjik sistemlerin hipofonksiyonel olduğu hipotezine ek olarak, DEHB'li çocukların PFK'sinde, noradrenerjik nöronların yetersiz düzenlendiği ve hiperfonksiyonel olduğu ileri sürülmektedir (Arnsten vd 1998, Russell vd 2002). Noradrenerjik nöronlar, ilgili uyaranlara verilen yanıtları arttırıp ve ilgisiz uyaranlara verilen yanıtları azaltarak, prefrontal ve paryetal kortekslerdeki sinyal-gürültü oranını arttırmaktadır. DEHB' de hem sinyalin arttırılması, hem de gürültünün azaltılması yetersizdir (Aston-Jones vd 1994, Himelstein vd 2000). Locus coeruleus'tan PFK'ye projekte olan noradrenerjik nöronlardan salınan NE, seçici ve sürdürülen dikkatten sorumlu nöronal devreler aracılığıyla, bilginin iletimini düzenleyerek, davranışın yönlendirilmesine yardımcı olmaktadır (Solanto vd 1998). Primat PFK'sindeki dopaminerjik ve noradrenerjik nöronların lezyonu, yürütücü fonksiyonlarda bozulmalarla sonuçlanmaktadır (Brozoski vd 1979). DEHB ilaçları, PFK'de noradrenerjik nörotransmisyonu arttırmaktadır (Berridge vd 2006, Fernando vd 2012). Artan ekstraselüler NE, PFK'de piramidal nöronların ateşleme gücünü ve süresini arttırmaktadır. Artmış piramidal nöronal ateşlemesinin, DEHB ilaçlarının dikkati ve çalışma belleğini geliştirdiği ve dürtüsellliği azalttığı mekanizma olduğu varsayılmaktadır (Sagvolden vd 2006, Wang vd 2007). DEHB tedavisinde kullanılan metilfenidatin, insan dışı primatlarda ve sıçanlarda, dolaylı olarak kortikal $\alpha 2A$ adrenerjik reseptörlerin aktivasyonunu arttırdığı gösterilmiştir (Gamo vd 2010). Bunun yanı sıra SHR'de, PFK kesitlerinde, NE salınımının $\alpha 2A$ otoreseptör aracılı regülasyonunun azaldığı gösterilmiştir (Russell 2000). Ayrıca, DEHB terapötiklerinin etkinliğinin, artmış noradrenerjik transmisyon ile ilişkili olduğunu gösteren çalışmalar da mevcuttur (Levy vd 2009). Dolayısıyla, DEHB patolojisi noradrenerjik nörotransmisyondaki defisitlerle güçlü bir şekilde bağlıdır. Bu tez çalışmasında literatür ile uyumlu, azalmış olarak bulunan noradrenerjik liflere, locus coeruleus'ta bulunan noradrenerjik nöronların kaybının neden olabileceği düşünülmüştür. NE liflerindeki azalmaya, noradrenerjik nöron kaybının neden olduğunun kanıtlanması için, noradrenerjik nöronlara spesifik olarak yapılacak boyamalarla gösterilmesi gerekmektedir.

Literatürde DEHB'de mezokortikal dopaminerjik yolağa ait nöron ve aksonların yoğunluğunu analiz eden çalışmalar henüz sınırlı sayıdadır. DEHB'yle ilgili yapılan çalışmaların büyük çoğunluğunu, reseptörler aracılığıyla ilaç etkisini inceleyen klinik çalışmalar oluşturmaktadır (Wigal vd 2018, Pauly vd 2018). Literatürdeki yoğun bilgiye rağmen DEHB'de mezokortikal yolaktaki lif dağılımı ve yoğunluğunu hastalığın fizyopatolojisine yönelik olarak gösteren çalışma bulunmamaktadır.

DEHB, tüm klinik kriterlerin davranışsal olduğu heterojen gelişimsel bir bozukluktur (Farone vd 2003). DSM-V'te, dikkatsizliğin baskın olduğu, aşırı hareketliliğin/dürtüsellüğün baskın olduğu ve birleşik olmak üzere DEHB'nin üç alt görünümü tanımlanmaktadır. DEHB'nin dikkatsizliğin baskın olduğu görünüm, en az altı dikkatsizlik belirtisi, altıdan az hiperaktivite-dürtüsellik belirtisi; aşırı hareketliliğin/dürtüsellüğün baskın olduğu görünüm en az altı hiperaktivite-dürtüsellik belirtisi, altıdan daha az dikkatsizlik belirtisi; birleşik görünüm ise hem dikkatsizlik hem de hiperaktivite-dürtüsellikten en az altı semptom gerektirmektedir. DSM-V, hem dikkatsizliğin baskın olduğu görünümün hem de birleşik görünümün tanısı için dikkatsizlik belirtileri gerektirmektedir (DSM-V). Ancak bu dikkatsizlik belirtileri genel olarak tanımlanmıştır. Araştırmacılar, dikkatsizliğin baskın olduğu görünüm ve birleşik görünüm ile ilişkili dikkatsizlik arasında ayırım yapmışlardır. Dikkatsizliğin baskın olduğu görünümde dikkatsizlik, genellikle spesifik olmayan, dalgın ve ağır bilişsel tempo ile yetersiz duyuşal işleme ve yönelim problemleri ile (Carlson vd 2010, Garner vd 2010, Roberts vd 2015), birleşik görünümde ise dikkatsizlik, çevredeki duyuşal stimulanlara dikkat etmede eksiklik ile değil, dikkat dağınıklığı ve dikkati sürdürmede güçlük ile karakterize edilmektedir (Sagvolden vd 2009). Hayvan modellerinde DEHB alt görünümlerinin doğru bir şekilde modellenmesi, alt görünüm spesifik tedavilerin geliştirmesi için önemli olduğu belirtilmiştir (Fox vd 2017).

SHR, en iyi karakterize edilmiş ve en uygun DEHB modeli olarak kullanılmaktadır. Önceki çalışmalarda, SHR'nin hiperaktivite, dikkati sürdürmede bozukluk ve dürtüsellik gibi DEHB'nin ana davranışsal karakterlerini gösterdiği ortaya konulmuştur (Sagvolden vd 2009, Russell vd 2011). Charles River tarafından üretilen SHR (SHR / NCrl), en yaygın olarak kullanılan DEHB birleşik alt görünümü kemirgen modellerinden birisidir (Sagvolden vd 2005a). En sık kullanılan DEHB modeli olmasında karşın, SHR / NCrl türünün kullanımı, insanlarda DEHB tanısı ile tutarlı fenotipik özellikler sergilemediği için sorgulanmaktadır (Adriani vd 2003, Garcia ve Kirkpatrick 2013). SHR / NCrl için en yaygın kullanılan kontrol türlerinden biri Charles River'dan WKY (WKY / NCrl) türüdür. Ancak Sagvolden (2009) tarafından, WKY / NCrl'nin, SHR / NCrl için uygun bir kontrol olup olmadığı incelenmiştir. WKY / NCrl türünün bir dikkatsizliğin baskın olduğu DEHB modeli olduğu, SHR / NCrl'nin ise DEHB birleşik görünümü modeli olduğu tartışılmaktadır. SHR / NCrl ve WKY / NCrl türlerinin, insanlarda DEHB'nin bazı alt görünümleri için sadece belirli fenotipik özellikleri modellemesinin mümkün olduğu düşünülmektedir (Fox vd 2017). Son yapılan çalışmalarda, Harlan laboratuvarı'ndan WKY türü (WKY / NHsd) (Mazur vd 2014, Johansen vd 2014), Sprague-Dawley türü (De Bruin 2003) veya iki model türünün de progenitörü olan Wistar türü (WI) (de la Pena vd 2015, Orduna vd 2015) kontrol olarak kullanılmıştır. Bütün bunların yanı sıra literatürde

en kabul görmüş DEHB hayvan modeli olarak SHR kullanılmaktadır. Bu tez çalışmasında da, literatür bilgisi açısından insan DEHB'sini en iyi taklit eden model olması nedeni ile DEHB hayvan modeli olarak, SHR / NCrl türü, kontrol olarak WKY / NCrl türü kullanılmıştır.

Bu tez çalışmasında, mezokortikal dopaminerjik projeksiyonlar yalnızca mPFC'nin PrL alt alanının I.tabakasında incelenmiştir. Çalışmanın planlanma aşamasında, DEHB patofizyolojisinden sorumlu ana PFC yapıları [dorsolateral PFC (dlPFC), dorsal anterior singulat korteks (dACC), orbitofrontal korteks (OFC)] göz önünde bulundurularak, bu yapıların kemirgenlerdeki homologların biri olan PrL alt alanı seçilmiştir. Memeli PFC'si, sitoarkitektonik özellikler (granüler ve agranüler özellikler) (Brodmann vd 1909), mediodorsal talamik nukleus ile bağlantısallık (Krettek vd 1977, Groenewegen vd 1988), ventral mesencephalon'dan dopaminerjik afferentler veya bu kriterlerin kombinasyonu gibi anatomik kriterler ile tanımlanmıştır (Thierry vd 1973, Uylings vd 1990, Williams vd 1998). Sıçan PFC'si, topolojik olarak üç farklı bölgeye ayrılmıştır. Bunlar, medial yerleşimli kortikal bölge (mPFC), ventral yerleşimli kortikal bölge (OFC) ve lateral ya da sulkal PFC olarak isimlendirilen lateral yerleşimli kortikal bölgedir. Sonuncusu, sıçanlarda rinal sulkusun anteriorunda yerleşim göstermekte ve agranüler insular korteks olarak da adlandırılmaktadır (Krettek vd 1977, Sesack vd 1989). Sıçan mPFC'si, medial presentral alan (PrCm) veya Fr2 alanı, anterior singulat alan, PrL ve infralimbik alan (IL) olmak üzere en az dört sitoarkitektonik bölgeye ayrılmaktadır (Krettek vd 1977, Van Eden vd1985). mPFC homolojisi, projeksiyonlarına, yoğun dopaminerjik innervasyonu ve fonksiyonlarına dayanmaktadır (Fallon ve Loughlin 1982). Tüm mPFC dopaminerjik projeksiyonlar alırken, ventral alanlar en yoğun olarak innerve edilmektedir (Thierry vd 1973). Bu mezokortikal dopaminerjik innervasyonlar başlıca VTA'dan kaynaklanmaktadır. VTA ile mPFC arasında ters bir dorso-ventral topografi gözlemlenmiştir. VTA'daki dorsal yerleşimli DA nöronları, mPFC'nin ventral bölgelerini innerve ederken, ventral yerleşimli nöronların, dorsal bölgeleri innerve ettiği gösterilmiştir (Deutch vd 1993). Hem anatomik (Van Eden vd 1987) hem de nörokimyasal çalışmalar (Tassin vd 1978), en yüksek yoğunluktaki DA innervasyonunun, prelimbik kortekste bulunduğunu açığa çıkartmıştır. mPFC alt alanlarının her birinin farklı intrakortikal ve subkortikal bağlantılara sahip olması (Heidbreder vd 2003) ve bu topografik innervasyon özellikleri göz önünde bulundurularak, dopaminerjik hipofonksiyon hipotezinin mPFC'nin diğer alt alanlarında da test edilmesinin, DEHB'nin patofizyolojisinin aydınlatılmasına ve bölgesel bazlı tedavilerin uygulanmasına katkı sağlayabileceği düşünülmüştür.

Bu çalışmanın bazı kısıtlılıkları bulunmaktadır. Bunlardan ilki çalışmada kullanılan hayvan sayısının (örneklem büyüklüğünün) istatistiksel analiz yapmak için

yetersiz olmasıdır. Beş kontrol WKY ve beş DEHB modeli SHR kullanılarak yapılması planlanan çalışma, dokunun immunohistokimyasal incelemeler öncesinde histolojik kesit alınması sırasında yaşanan aksaklıklar sebebiyle, üç kontrol WKY, beş DEHB modeli SHR ile tamamlanabilmiştir. Kontrol grubu sıçanlar ile SHR'lerin aynı yaşlarda (age-matched) olabilmeleri için çalışma iki aşamada gerçekleştirilmiştir. İlk olarak WKY'ler satın alınarak deneysel prosedür gerçekleştirilmiş, immunohistokimyasal boyamaların tamamlanmasını takiben SHR'ler satın alınarak aynı deneysel basamaklar gerçekleştirilmiştir.

Satın alınan SHR'lerde DEHB'ye ait şahit parametrelerin gösterilmemesi kısıtlılık gibi görülebilir. Ancak Charles River'dan (North Carolina, USA) satın alınan SHR / NCrl türünün DEHB çalışmaları için en uygun model olduğu, referans hayvan türü seçmenin önemini inceleyen çalışma ile gösterilmiştir (Sagvolden vd 2009). Yapılan çalışmada, davranışsal, genetik ve nörobiyolojik bir dizi kriterlere dayanılarak SHR / NCrl türünün, DEHB çalışmaları için en uygun model olduğu kanıtlanmıştır (Sagvolden vd 2009). Dolayısı ile şahit parametrelerin gösterilmemiş olması bir kısıtlılığa neden olmamıştır.

Deneysel prosedüre WKY'ler ile başlanmıştır. İlk iki WKY'ye ait beyin dokusunun histolojik kesit alınmasında kriyostat kullanılmıştır. Kriyostat ile kesit alınımı öncesinde, dokunun gradientli sükröz solüsyonunda inkübe edilmesine rağmen, kesit alınmasında sıkıntılar yaşanmıştır. Dokuyu dondurarak kesen kriyostat ile kesit alınımı ve toplanması sırasında, katlanma, kırılma ve parçalanma gibi problemlerle karşılaşmıştır. İmmunohistokimyasal aşamalara tabi tutulabilecek durumda kesitlerin elde edilememesi sebebiyle ilk iki sıçan beyni kullanılamamıştır. Hayvan sayısının yetersiz olmasından kaynaklanan kısıtlılık, istatistiksel yöntemler ile giderilmeye çalışılmıştır. Bunun için, her bir analiz sonucu elde edilen verilerde grup içi varyansların homojen olup olmadığı test edilmiştir. Grup içi varyansların homojen olduğu sonucuna ulaşılmayla birlikte, ölçümle elde edilen tekrarlayan verilerden veri havuzu oluşturularak iki grup arası farklılıklar değerlendirilmiştir. Tekrarlayan verilerin ayrı veri olarak kullanılmasının istatistiksel olarak uygun olduğu bu durum ile kısıtlılık giderilmeye çalışılmıştır.

Çalışmanın diğer kısıtlılıkları arasında yapılması planlanan ancak gerçekleştirilemeyen stereotaksik enjeksiyon uygulaması ve Clarity tekniği sayılabilir. VTA'ya stereotaksik intraserebral izleyici enjeksiyonunun yapılamaması, VTA'dan PFK'ye projekte olan mezokortikal dopaminerjik yolak liflerinde azalma olup olmadığının incelenmesi için bir kısıtlılık gibi gözükmektedir. Ancak, PFK'ye gelen mezokortikal projeksiyonların büyük kısmının VTA'ya ait olduğunun (Fallon ve Loughlin 1987) ve VTA'dan frontal kortekse projekte olan hücrelerinin büyük çoğunluğunun (% 90'a kadar) katekolaminerjik olduğunun (Albanese ve Bentivoglio 1982) retrograd izleme çalışmaları ile gösterilmiş olmasıyla, enjeksiyon yapılamamış olması kısıtlılığının giderildiği

düşünülmüştür. Bütün bunlara rağmen, intraserebral izleyici enjeksiyonu yapılarak veya elektrofizyolojik olarak, mPFK'deki dopaminerjik projeksiyonların VTA'daki nöronlara ait olduğunun kanıtlanması daha uygun olacaktır.

Bu tez çalışmasında, VTA'da bulunan mezokortikal dopaminerjik yolağa ait nöronların mPFK'deki projeksiyonlarının izlenmesi için yapılması planlanan VTA'ya interaserebral izleyici enjeksiyonu amaçlanmış ancak gerçekleştirilememiştir. Çalışmanın bu kısmının yapılamamasının sebebi, juvenil sıçanların beyin yapılarını gösteren bir stereotaksik atlas olmaması sebebiyledir. Postnatal yirmi bir günlük sıçanlara, sadece kulak çubuklarına yapılacak küçük ayarlamalar ile geleneksel stereotaksik teknikleri kullanılarak, intraserebral elektrod yerleştirilmesinin mümkün olduğu belirtilmektedir (Valenstein vd 1969). Buna karşın birçok çalışmada, stereotaksik koordinatlar seçilirken gelişmekte olan kemirgen beyindeki anatomik farklılıkları göz önünde bulundurmamaktadır. Yapılan önceki çalışmalarda hem juvenil hem de yetişkin kemirgenler için aynı stereotaksik koordinatların kullanıldığı görülmektedir (Nakano ve Mizuno 1996, Pistis vd 2004, Frantz vd 2007, Camarini vd 2008). Ergen ve yetişkin kemirgenler için aynı koordinatların kullanılması ya da girişim yapılacak stereotaksik koordinatların yaş ve kiloya göre ayarlanmaması, hedef olmayan beyin bölgelerine hatalı giriş olasılığını arttırarak, ilgilenilen bölgede yapılan nörokimyasal veya fonksiyon analiz sonuçlarını bozabilmektedir. Bu çalışmada, juvenil sıçanların VTA stereotaksik koordinatları belirlenmeye çalışılmıştır. Bunun için yetişkin sıçan atlasındaki koordinatlar ve L-B arası mesafe referans olarak kullanılmıştır. Yapılan denemelerde L-B arası mesafe göz önünde bulundurulurken, olası VTA koordinatı oran orantı ile hesaplanmıştır. Hesaplanan koordinatlara kanül aracılığıyla ulaşılarak boyar madde enjeksiyonu yapılmıştır. Her deneme sonrası, beyin dokusundan kesitler alınarak enjeksiyon alanı kontrol edilmiştir. Denemelerde standart bir koordinata ulaşamamıştır. Juvenil ve erişkin sıçana ait aynı stereotaksik koordinatların kullanılmayacak olması sebebiyle, çalışmanın başında planlanan VTA'ya izleyici enjeksiyonu yapılamamıştır. Hedeflenen beyin bölgelerinin koordinatlarıyla ilişkili hatalar, özellikle juvenil kemirgenlerin hala büyüdüğünü ve kemirgen atlaslarının çoğunluğunun yetişkinlere göre olduğu göz önüne alındığında, juvenil sıçanlarda hata olasılık dâhilindedir (Sponaugle vd 2008). Bu sebeple juvenil sıçanlara göre hazırlanmış olan stereotaksik atlaslara ihtiyaç duyulmaktadır.

Gelişmekte olan sıçanlarda, VTA için stereotaksik koordinatları inceleyen bir çalışmada, postnatal 28, 35 ve 70. gündeki sıçanlar kullanılmıştır. Çalışmada, VTA alt çekirdeklerinden PN ve PBP çekirdeklerine odaklanılmıştır. Yapılan çalışmada, VTA'daki PBP ve PN çekirdeği için posterior ve ventral stereotaksik koordinatların postnatal 28, 35 ve 70. gündeki sıçanlar arasında farklılık gösterdiğini ve VTA'nın PBP ve PN

çekirdeğinin stereotaksik lokasyonunun vücut ağırlığındaki değişikliklere bağlı olduğunu ortaya koymuştur. Sıçanlarda yaşa bağlı en büyük değişimin, erken ergenlikten erişkinliğe kadar, ventral derinlikte yaklaşık 2 mm bir değişiklikle ventral koordinatlar olduğu gösterilmiştir. Posterior koordinatların da, PBP ve PN çekirdeklerde prob yerleştirme için yaş ve vücut ağırlığına bağımlı olduğu belirtilmiştir. VTA için lateral stereotaksik koordinatlarda yaş veya vücut ağırlığına bağlı olarak farklılık göstermediği ortaya konulmuştur. VTA için lateral stereotaksik koordinatlarda farklılık olmamasını, beyinde büyümenin lateral olarak olabileceği, ancak bu büyümenin anlamlı olmadığı ile ilişkilendirilmiştir. VTA'daki kanül lokalizasyonunun, 90 ile 400 g ağırlığındaki sıçanlarda, bregmadan +1.0 mm lateralde olarak kaldığı gösterilmiştir. Ergen ve yetişkinler için lateral koordinatlardaki benzerlikler, lateral beyin büyümesinin çoğunluğunun, yenidoğanda olduğu gibi, gelişimin çok erken döneminde gerçekleştiğine işaret etmektedir. (Sponaugle vd 2008). Bu literatür bilgisi ile uyumlu olarak, bizim çalışmamızda da, prepubertal dönemdeki juvenil sıçanlar ile yapılan VTA stereotaksik koordinatların belirlenmesi denemelerinde, VTA için lateral stereotaksik koordinatların çok değişmediği anlaşılmıştır. Juvenil sıçanda yapılan denemeler sonucunda, VTA'nın ML koordinatına için ulaşmak için midsagittal sütürden 0,5 mm lateralini yeterli olduğu saptanmıştır.

Bu çalışmada, VTA'dan PFK'ye olan mezokortikal dopaminerjik projeksiyonlarının ve mPFK'deki topografik dağılımının Clarity tekniği ile gösterilmesi planlanmış idi. Clarity denemeleri ardından teknik başarılı bir şekilde gerçekleştirildi. Clarity tekniği uygulanan ve şeffaflaştırılmış dokuların konvansiyonel mikroskoplar ile görüntülenmesi mümkün olmamaktadır. Şeffaflaştırılmış bu dokuların, optik kesitleme yapan yeni nesil mikroskoplar kullanılarak görüntülenmesi gerekliliği ortaya çıkmaktadır (Chung vd 2013). Söz konusu yeni nesil mikroskopların ülkemizde yaygın olarak bulunmayışı ve kullanımlarının yüksek bütçeler gerektirmesi, araştırmanın bu kısmında sıkıntıya neden olmuştur. Çalışmanın bu basamağıyla ilgili olarak, TÜBİTAK 114S407 nolu proje tarafından desteklenen çalışmamız kapsamında Medipol Üniversitesi'nden hizmet satın alınması yapılarak, sadece VTA'daki dopaminerjik nöronların bütünlüğünün ortaya konulması mümkün olmuştur. Ancak mPFK'deki dopaminerjik projeksiyonların görüntülenmesi mümkün olmamıştır.

Yapılacak sonraki çalışmalar ile VTA'nın farklı alt çekirdeklerinde bulunan dopaminerjik nöronların projeksiyon bölgelerinin farklı olduğu göz önünde bulundurularak (Lammel vd 2008), mPFK'ye projekte olduğu bilinen PN ve PBP'deki TH (+) nöronların değerlendirilmesi daha uygun olacak gibi gözükmektedir. Ancak VTA'nın bu alt çekirdeklerinin birbirlerinden kesin sınırlar ile ayrılamayacağı ve en net olarak in

vitro beyin kesitlerinden alınacak elektrofizyolojik kayıtlar ile alt çekirdeklerin belirlenebileceğide göz önünde bulundurulmalıdır.

Literatürde, mPFK'deki TH (+) lif ya da varikozit değişikliklerini araştıran çalışmalar incelendiğinde, toksik maruziyetli DEHB hayvan modeli olarak sayılan prenatal nikotin maruziyetli sıçanda, mPFK'nin PrL alanında TH (+) varikozitlerinin kontrol grubuna kıyasla azalmış olduğu görülmüştür (Alkam vd 2017). TH (+) aksonal varikozitelerinin, DA ve NE innervasyonunun belirteci olması sebebiyle (Finkelstein vd 2009), DA salınımindaki azalma, varikozitedeki azalma ile açıklanabilir. Bizim çalışmamızda da benzer şekilde dopaminerjik salınımda azalmaya işaret eden, SHR'lerde, VTA'nın ana projeksiyon bölgesi olan mPFK'de TH (+) dopaminerjik lif yoğunluğunda kontrol grubuna kıyasla azalma olduğu saptanmıştır. Çalışmamızda, dopaminerjik lifler sadece mPFK'nin PrL alanının I.tabakasında değerlendirilmiştir. Bu sebeple bundan sonra yapılacak çalışmalarda, mPFK'deki bu liflerin bölgesel ve laminar sonlanmalarının ve kortikal piramidal nöronlarla sinaptik bağlantısalılığının incelenmesi gerekmektedir.

SHR'lerde, kalsiyum sinyalizasyonunu içeren başlıca ikinci haberci sisteminde işlev bozukluğu olduğu gösterilmiştir (Lehohla vd 2001,2004). Bu işlev bozukluğu, DEHB'de farklı nörotransmitter sistemlerinin bozulabileceğini düşündürmektedir (Russell vd 2005). WKY'ler ile karşılaştırıldığında SHR'ler düşük beyin kalsiyum (Ca^{2+}) ATPaz aktivitesine sahip oldukları saptanmıştır (Horn vd 1995). Nörotransmitter salınıminin, Ca^{2+} akışına bağlı olması sebebiyle, hücre membranı boyunca Ca^{2+} konsantrasyon gradyanında bir bozulma, Ca^{2+} iyonlarının hücre içine akışında bir azalmaya ve nörotransmitter salınımda bozulmaya neden olabileceği düşünülmektedir (Lehohla vd 2004). Ca^{2+} akışındaki bozulmanın dopaminerjik transmisyonu azaltarak etki etmek yoluyla DEHB fizyopatolojisine katkıda bulunuyor olabileceğinin test edilmesi için, hücre içi Ca^{2+} aktivitesinin, Ca^{2+} iyon kanallarının ve bu iyon kanallarını kodlayan genlerin ekspresyon seviyelerinin incelenmesi uygun olacaktır.

Sonuç olarak bu çalışma, DEHB hayvan modeli olarak SHR'lerde mezokortikal dopaminerjik yolağa ait nöron ve akson yoğunluğundaki değişimleri inceleyen ilk çalışmadır. Mezokortikal dopaminerjik liflerin yanı sıra, mPFK'deki noradrenerjik lifler de bu tez çalışmasında incelenmiştir. Çalışmadan elde edilen sonuçlar:

1. SHR'lerde, mezokortikal dopaminerjik yolağa ait nöron gövdelerinin bulunduğu VTA'da, TH (+) nöron yoğunluğunun kontrol grubundakilere kıyasla anlamlı derecede düşük olduğu gözlenmiştir.
2. SHR'lerde, mPFK'de TH (+) lif yoğunluğunun da kontrol grubundakilere kıyasla anlamlı derecede düşük olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

3. SHR'lerde, mPFK'de dopaminerjik liflerin yanı sıra noradrenerjik liflerin de azaldığı saptanmıştır.

DEHB fizyopatolojisini, özellikle dopaminerjik sistem hipofonksiyonu hipotezi açısından açıklamaya yönelik bu çalışma, literatürdeki diğer çalışmaların vurgusunu destekler nitelikte bulgular ortaya koymuştur.

Çalışmadaki sonuçları değerlendirilirken çalışmanın kısıtlılıkları akılda tutulmalıdır. İleride örneklem sayısı artırılarak ve metodolojik kısıtlılıklar giderilerek yapılacak çalışmalar dopaminerjik sistem - DEHB ilişkisi konusundaki bilgilerimizi genişletecektir. Bozukluğun fizyopatolojisini açıklamaya yönelik yapılacak ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. DEHB hala karmaşık bir psikiyatrik bozukluk olarak karakterize edilmektedir (Matthews vd 2014). DEHB'nin etiyolojisinde dopaminerjik sistemin rolü olabileceğine dair de veriler ortaya konmuştur (Viggiano vd 2003). DEHB gibi karmaşık ve heterojen bozuklukların altında yatan nörobiyolojik değişikliklerin, kemirgen modellerinin nispeten basit sinir sistemleri ile anlaşılması mümkündür (Russell vd 2005). DEHB'nin hayvan modeli olarak en iyi karakterize edilmiş, en sık kullanılan ve en uygun model olan SHR'lerde de, dopaminerjik sistemde değişiklikler olduğu gösterilmiştir (Sagvolden vd 2005a). Dopaminerjik iletime aracılık eden yollardaki değişiklikler, nörokimyasal çevresine son derece hassas olan PFK'nin fonksiyonlarını bozmaktadır (Matsumoto ve Hikosaka 2009). Hastalığın temelini oluşturduğu düşünülen söz konusu yolaktaki değişikliğin ortaya konulması ve incelenmesi, DEHB mekanizması hakkında özgün bilgi sağlayacaktır.

Bunun için;

- VTA'dan mPFK'ye olan dopaminerjik projeksiyonların topografik dağılımını
- VTA'dan mPFK'ye projekte olan dopaminerjik nöronların sinaptik özelliklerini ve ultrastrüktürel yapısını
- DA ve metabolitlerinin ilgili beyin bölgelerindeki düzeylerini
- DA ve metabolitleri değerlerinin, dürtüsellik, motor hiperaktivite gibi DEHB semptomlarını ölçebilen davranış testleri ile korelasyonunu
- DEHB semptomlarını azaltabileceği düşünülen yeni tedavi ajanlarının bu davranış testleri ile korelasyonunu
- mPFK'nin farklı alanlarındaki dopaminerjik reseptörlerin dağılımını
- bu dopaminerjik reseptörleri kodlayan genlerin mRNA seviyelerini
- bu dopaminerjik reseptörleri kodlayan genlerdeki polimorfizmlerini
- Noradrenerjik liflerdeki azalmanın locus coeruleus'taki noradrenerjik nöronlar ile ilişkisini
- Noradrenerjik reseptörlerinin düzeyini

incelemeye olanak sağlayan alışmalar DEHB etyopatogenezini bütüncül olarak kavrayabilmede önemli olacaktır.



6.SONUÇ

Bu çalışmada DEHB hayvan modeli olarak kullanılan SHR'ler ve kontrol grubu olarak kullanılan WKY'lerde mezokortikal dopaminerjik yolağa ait nöron ve liflerin yoğunluğu değerlendirilerek, mezokortikal dopaminerjik sistemin DEHB etyopatogenezdeki yerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu çalışmada;

- ✓ DEHB hayvan modeli olarak kullanılan SHR'lerde, mezokortikal dopaminerjik yolağa ait nöron gövdelerinin bulunduğu VTA'daki hücre yoğunluğunun WKY'lere kıyasla anlamlı derecede düşük olduğu saptanmıştır.
- ✓ DEHB hayvan modeli olarak kullanılan SHR'lerde VTA'dan PFK'ye projekte olan mezokortikal dopaminerjik yolak liflerinin yoğunluğunun, kontrol grubundakilere kıyasla anlamlı derecede düşük olduğu saptanmıştır.
- ✓ SHR'lerde, mPFK'de dopaminerjik liflerin yanı sıra noradrenerjik liflerin de azaldığı saptanmıştır.

7. KAYNAKLAR

Adriani W, Caprioli A, Granstrem O, Carli M, Laviola G. The spontaneously hypertensive-rat as an animal model of ADHD: Evidence for impulsive and nonimpulsive subpopulations. **Neuro Biobeh Rev** 2003; 27 (7): 639-651.

Albanese A, Bentivoglio M. The organization of dopaminergic and non-dopaminergic mesencephalocortical neurons in the rat. **Brain Res** 1982; 238 (82): 421–425.

Alfahel-Kakunda A, Silverman WF. Calcium-binding proteins in the substantia nigra and ventral tegmental area during development: correlation with dopaminergic compartmentalization. **Brain Res** 1997; 103 (81): 9–20.

Alkam T, Mamiya T, Kimura N, Yoshida A, Kihara D, Tsunoda Y, Aoyama Y, Hiramatsu M, Kim HC, Nabeshima T. Prenatal nicotine exposure decreases the release of dopamine in the medial frontal cortex and induces atomoxetine-responsive neurobehavioral deficits in mice. **Psychopharmacology** 2017; 234 (12): 1853-1869.

Amenta F, Tayebati S.K, Tomassoni D. Spontaneously hypertensive rat neuroanatomy: applications to pharmacological research. **Ital J Anat Embryol** 2010; 115 (1-2): 13-17.

American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders (DSM-II), **American Psychiatric Association**, Washington DC, 1968, s. 136.

American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders (DSM-III), **American Psychiatric Association**, Washington DC, 1980, s.145.

American Psychiatric Association Diagnostic and statistical manual of mental disorders (DSM-III- R), **American Psychiatric Association**, Washington DC, 1987, s.218.

American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders (DSM-IV), **American Psychiatric Association**, Washington DC. 1994, s.390.

American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders, Fifth Edition (DSM-V) **American Psychiatric Publishing**, Arlington, 2013, s.396.

Arnsten AFT, Berridge CW, McCracken JT. The Neurobiological Basis of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder **Primary Psychiatry** 2009;16 (7): 47-54.

Arnsten AFT. Catecholamine modulation of prefrontal cortical cognitive function. **Trends Cogn Sci** 1998; 2 (11): 436-447.

Arnsten AFT. Toward a new understanding of attention-deficit hyperactivity disorder pathophysiology: An important role for prefrontal cortex dysfunction. **CNS Drugs** 2009; 23 (1): 33–41.

Arnsten AFT, Steere JC, Hunt RD. The contribution of alpha2 noradrenergic mechanism to prefrontal cortical cognitive function. **Arch Gen Psychiatry** 1996; 53 (5): 448–455.

Aston-Jones G, Rajkowski J, Kubiak P, Alexinsky T: Locus coeruleus neurons in monkey are selectively activated by attended cues in a vigilance task. **J Neurosci** 1994; 14 (7): 4467-4480.

Aubert I, Brana C, Pellevoisin C, Giros B, Caille I, Carles D, Vital C, Bloch B: Molecular anatomy of the development of the human substantia nigra. *J Comp Neurol* 1997; 379 (1): 72–87.

Bailey JN, Cantwell D, Asarnow J, Smalley SL. Segregation analysis of attention deficit hyperactivity disorder. *Genet Epidemiol* 1999; 88 (1): 71-78.

Barkley RA. ADHD and the Nature of Self-Control. *The Guilford Press, New York*, 1997, s.313.

Barkley RA. “History of ADHD”, Attention-Deficit Hyperactivity Disorder A Handbook for Diagnosis and Treatment, Eds. Barkley RA, *The Guilford Press, New York*, 2015; s.16-77.

Barkley RA, Peters H. The earliest reference to ADHD in the medical literature?: Melchior Adam Weikard’s description in 1775 of “Attention Deficit” (Mangel der Aufmerksamkeit, attentio volubilis). *J Atten Disord* 2012; 16 (8): 623–630.

Batty MJ, Liddle EB, Pitiot A, Toro R, Groom MJ, Scerif G, Liotti M, Liddle PF, Paus T, Hollis C. Cortical gray matter in attention-deficit/hyperactivity disorder: a structural magnetic resonance imaging study. *J Am Acad of Child and Adolesc Psychiatry* 2010; 49 (3): 229–238.

Bayer VE, Pickel VM. Ultrastructural localization of tyrosine hydroxylase in the rat ventral tegmental area: relationship between immunolabeling density and neuronal associations. *J Neurosci* 1990; 10 (9): 2996–3013.

Bax M, MacKeith R. Minimal cerebral dysfunction. Little Club Clinics in developmental medicine. No 10. *National Spastic Society with Heinemann Medical*, London, 1963, s.104.

Bendel P, Eilam R: Quantitation of ventricular size in normal and spontaneously hypertensive rats by magnetic resonance imaging. *Brain Res* 1992; 574 (1-2): 224 – 228.

Benjamin J, Patterson C, Greenberg BD, Murphy DL, Hamer DH. Population and familial association between the D4 dopamine receptor gene and measures of novelty seeking. *Nat Genet* 1996; 12 (1): 81–84.

Bentivoglio M, Morelli M. “The organisation and circuits of mesencephalic dopaminergic neurons and the distribution of dopamine receptors in the brain”, Handbook of Chemical Neuroanatomy. (Dopamine) Volume:21, Eds. Dunnett SB, Bentivoglio M, Björklund A, Hökfelt T, *Elsevier*, Amsterdam, 2005, s.1–107.

Bentivoglio M, Chen S. “Retrograde neuronal tracing combined with immunocytochemistry”, Immunohistochemistry II, Eds. Cuello AC, *Wiley*, New York, 1993, s.301–328.

Benton A. Prefrontal injury and behavior in children. *Dev Neuropsychol* 1991; (3): 7: 275–281.

Berridge CW, Devilbiss DM, Andrzejewski ME, Arnsten AF, Kelley AE, Schmeichel B, Hamilton C, Spencer RC. Methylphenidate preferentially increases catecholamine

neurotransmission within the prefrontal cortex at low doses that enhance cognitive function. *Biol Psychiatry* 2006; 60 (10): 1111–1120.

Biederman J, Milberger S, Faraone S, Kiely K, Guite J, Mick E, Ablon S, Warburton R, Reed E. Family-environment risk factors for ADHD: A test of Rutter's indicators of adversity. *Arch Gen Psychiatry* 1995; 52 (6): 464–470.

Björklund A, Dunnett SB. Dopamine neuron systems in the brain: an update. *Trends Neurosci* 2007; 30 (5): 194–202.

Blaess S, Ang SL. Genetic control of midbrain dopaminergic neuron development. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 2015; 4 (2): 113-134.

Blau A. Mental changes following head trauma in children. *Arch NeurPsych* 1936; 35 (4): 722–769

Boix F, Qiao SW, Kolpus T, Sagvolden T. Chronic L-deprenyl treatment alters brain monoamine levels and reduces impulsiveness in an animal model of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *Behav Brain Res* 1998; 94 (1): 153-62.

Bradley W. The behavior of children receiving benzedrine. *Am J Psychiatry* 1937; 94 (3): 577–585.

Bradley W, and Bowen C. School performance of children receiving amphetamine (benzedrine) sulfate. *Am J Orthopsychiatry* 1940; 10 (4): 782–788.

Brozoski T, Brown RM, Rosvold HE, Goldman PS. Cognitive deficit caused by regional depletion of dopamine in prefrontal cortex of rhesus monkey. *Science* 1979; 205 (4409): 929–931.

Bubser M, Schmidt WJ 6-Hydroxydopamine lesion of the rat prefrontal cortex increases locomotor activity, impairs acquisition of delayed alternation tasks, but does not affect uninterrupted tasks in the radial maze. *Behav Brain Res* 1990; 37 (2): 157-68.

Bucci DJ, Hopkins ME, Keene CS, Sharma M, Orr LE. Sex differences in learning and inhibition in spontaneously hypertensive rats. *Behav Brain Res* 2008;187 (1): 27–32.

Byers RK, Lord EE. Late effects of lead poisoning on mental development. *Am J Dis Child* 1943; 66 (5): 471-494.

Camarini R, Griffin III WC, Yanke AB, Rosalina dos Santos B, Olive MF. Effects of adolescent exposure to cocaine on locomotor activity and extracellular dopamine and glutamate levels in nucleus accumbens of DBA/2J mice. *Brain Res* 2008; 1193: 34–42.

Carlson CL, Mann, M. Sluggish cognitive tempo predicts a different pattern of impairment in the attention deficit hyperactivity disorder, predominantly inattentive type. *J Clin Child Adolesc Psychol* 2002; 31 (1): 123-9.

Carlsson A, Falck B, Hillarp NA Cellular localization of brain monoamines. *Acta Physiol Scand Suppl* 1962; 56 (196): 1–28.

Carlsson A, Waters N, Holm-Waters S, Tedroff J, Nilsson M, Carlsson ML. Interactions between monoamines, glutamate, and GABA in schizophrenia: new evidence. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2001; 41: 237-60.

Carr D, Sesack S. GABA-containing neurons in the rat ventral tegmental area project to the prefrontal cortex. **Synapse** 2000; 38 (2): 114-23.

Carr DB, Sesack SR. Projections from the rat prefrontal cortex to the ventral tegmental area: target specificity in the synaptic associations with mesoaccumbens and mesocortical neurons. **J Neurosci** 2000; 20 (10): 3864–3873.

Castellanos FX, Tannock R. Neuroscience of attention-deficit/hyperactivity disorder: The search for endophenotypes. **Nat Rev Neurosci** 2002; 3: 617- 628.

Castellanos FX, Lee PP, Sharp W, Jeffries NO, Greenstein DK, Clasen LS, Blumenthal JD, James RS, Ebens CL, Walter JM, Zijdenbos A, Evans AC, Giedd JN, Rapoport JL. Developmental trajectories of brain volume abnormalities in children and adolescents with attention-deficit/hyperactivity disorder. **JAMA** 2002; 288 (14): 1740–1748.

Chung K, Deisseroth K. CLARITY for mapping the nervous system. **Nat. Methods** 2013; 10 (6): 508-13.

Chung K, Wallace J, Kim SY, Kalyanasundaram S, Andalman AS. Structural and molecular interrogation of intact biological systems, **Nature**, 2013; 497 (7449):332-337.

Clements SD. Minimal brain dysfunction in children: terminology and identification: phase one of a three-phase project. **U.S. Government Printing Office**, Washington, D.C.1966, s.23.

Coggeshall RE, Lekan HA. Methods for determining numbers of cells and synapses: A case for more uniform standards of review. **J Comp Neurol** 1996; 364 (1): 6-15.

Conners CK. Attention-deficit/hyperactivity disorder: historical development and overview. **J Atten Disord** 2000; 3 (4): 173–191

Conrad CH, Brooks WW, Hayes JA, Sen S, Robinson KG, Bing OH. Myocardial fibrosis and stiffness with hypertrophy and heart failure in the spontaneously hypertensive rat. **Circulation** 1995; 91 (1): 161-170.

Cortese S. The neurobiology and genetics of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder (ADHD): what every clinician should know. **Eur J Paediatr Neurol** 2012; 16 (5): 422–433.

Crichton SA. An inquiry into the nature and origin of mental derangement: Comprehending a concise system of the physiology and pathology of the human mind and a history of the passions and their effects. London: Cadell T, Davies W. **Reprinted by AMS Press**, London, 1978; s.458.

Cubillo A, Halari R, Ecker C, Giampietro V, Taylor E, Rubia K. Reduced activation and inter-regional functional connectivity of fronto–striatal networks in adults with childhood attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) and persisting symptoms during tasks of motor inhibition and cognitive switching. **J Psychiatr Res** 2009; 44 (10): 629-639.

Dahlström A, Fuxe K. Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system. I. demonstration of monoamines in the cell bodies of brain stem neurons. **Acta Physiol Scand Suppl** 1964; 65 (4): 573-596.

Davids E, Zhang K, Tarazi FI, Baldessarini RJ. Animal models of attention-deficit hyperactivity disorder. **Brain Res Brain Res Rev.** 2003; 42 (1): 1-21.

Davidson MA. ADHD in adults: a review of the literature. *J Atten Disord* 2008; 11 (6): 628–641.

De Bruin NMWJ, Kiliaan AJ, De Wilde MC, Broersen LM. Combined uridine and choline administration improves cognitive deficits in spontaneously hypertensive rats. *Neurobio Learn Mem* 2003; 80 (1): 63-79.

De Jong W, Linthorst AC, Versteeg HG. The nigrostriatal dopamine system and the development of hypertension in the spontaneously hypertensive rat. *Arch Mal Coeur Vaiss* 1995; 88 (8): 1193-1196.

dela Pena I, Bang M, Lee J, dela Pena JB, Kim BN, Han DH, Noh M, Shin CY, Cheong JH. Common prefrontal cortical gene expression profiles between adolescent SHR/NCrl and WKY/NCrl rats which showed inattention behavior. *Behav Brain Res* 2015; 291: 268-276.

Dell'Anna ME, Calzolari S, Molinari M, Iuvone L, Calimici R. Neonatal anoxia induces transitory hyperactivity, permanent spatial memory deficits and CA1 cell density reduction in developing rats. *Behav Brain Res* 1999; 45 (2): 125-134.

Denk W, Horstmann H. Serial block-face scanning electron microscopy to reconstruct three-dimensional tissue nanostructure. *PLoS Biol* 2004; 2 (11): e329.

Deutch AY. Prefrontal cortical dopamine systems and the elaboration of functional corticostriatal circuits: implications for schizophrenia and Parkinson's disease. *J Neural Transm Gen Sect* 1993; 91 (2-3): 197–221.

Dickstein SG, Bannon K. The neural correlates of attention deficit hyperactivity disorder: an ALE meta-analysis. *J Child Psychol Psychiatry* 2006; 47 (10): 1051–1062.

Dills WL Jr. Protein fructosylation: fructose and the Maillard reaction. *Am J Clin Nutr* 1993; 58 (5): 779S-787S.

Ding YS, Lin KS, Logan J. PET imaging of norepinephrine transporters. *Curr Pharm Des* 2006; 12 (30): 3831–45.

Douglas VI. Stop, look and listen: the problem of sustained attention and impulse control in hyperactive and normal children. *Can J Behav Sci* 1972; 4 (4):259–282.

Engert V, Pruessner JC Dopaminergic and Noradrenergic Contributions to Functionality in ADHD: The Role of Methylphenidate. *Curr Neuropharmacol* 2008; 6(4): 322-328.

Epstein JN, Casey BJ, Tonev ST. ADHD- and medication-related brain activation effects in concordantly affected parent-child dyads with ADHD. *J Child Psychol Psychiatry* 2007; 48 (9): 899–913.

Ertürk A, Mauch CP, Hellal F, Förstner F, Keck T, Becker K, Jähring N, Steffens H, Richter M, Hübener M, Kramer E, Kirchhoff F, Dodt HU, Bradke F. Three dimensional imaging of the unsectioned adult spinal cord to assess axon regeneration and glial responses after injury. *Nat Med* 2011; 18 (1): 166-71.

Falck B, Hillarp NA, Thieme G, Torp A. Fluorescence of catecholamines and related compounds condensed with formaldehyde *Brain Res Bull* 1982; 9 (1-6): xi-xv.

Fallon J, Moore R.Y. Catecholamine innervation of the basal forebrain. IV. Topography of the dopamine projection to the basal forebrain and neostriatum. *J Comp Neurol* 1978; 180 (3): 545-580.

Fallon JH, Loughlin SE "Monoamine innervation of cerebral cortex and a theory of the role of monoamines in cerebral cortex and basal ganglia", Cerebral Cortex, Vol. 6, Eds. Jones EG, Peters A, **Plenum Press**, New York, 1987, s.41–127.

Fallon JH Loughlin SE. Monoamine innervation of the forebrain collateralization. *Brain Res Bull* 1982; 9: 295–307.

Fallon JH, Loughlin SE. "Substantia Nigra", The Rat Nervous System, Eds. Paxinos G, **Academic Press**, San Diego, 1995, s.215–237.

Fan X, Xu M, Hess EJ. D2 dopamine receptor subtype-mediated hyperactivity and amphetamine responses in a model of ADHD. *Neurobiol Dis* 2010; 37 (1): 228-36.

Faraone SV, Biederman J. "Neurobiology of attention deficit hyperactivity disorder", Neurobiology of Mental Illness, Eds. Charney DS, Nestler EJ, Bunney BS, **Oxford University Press**, New York, 2013 s.1034-1048.

Faraone SV, Biederman J, Mennin D, Wozniak J, Spencer T. Attention deficit hyperactivity disorder with bipolar disorder: A familial subtype? *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 1997; 36: 1378–1387.

Faraone SV, Sergeant J, Gillberg C, Biederman J. The worldwide prevalence of ADHD: is it an American condition? *World Psychiatry* 2003; 2 (2):104-113.

Faraone SV, Perlis RH, Doyle AE, Smoller JW, Goralnick JJ, Holmgren MA, Sklar P. Molecular genetics of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry* 2005; 57 (11): 1313–1323.

Fassbender C, Schweitzer JB. Is there evidence for neural compensation in attention deficit hyperactivity disorder? A review of the functional neuroimaging literature. *Clin Psychol Rev* 2006; 26 (4): 445–465.

Fernando AB, Economidou D, Theobald DE, Zou MF, Newman AH, Spoelder M, et al. Modulation of high impulsivity and attentional performance in rats by selective direct and indirect dopaminergic and noradrenergic receptor agonists. *Psychopharmacology* 2012; 219: 341–52.

Ferreira JGP, Del-Fava F, Hause RH, Shammah-Lagnado SJ Organisation of ventral tegmental area projections to the ventral tegmental area–nigral complex in the rat. *Neuroscience* 2008; 153: 196–213.

Finkelstein DI, Stanic D, Parish CL, Tomas D, Dickson K, Horne MK. Axonal sprouting following lesions of the rat substantia nigra. *Neuroscience* 2000; 97: 99–112.

Fox AE, Caramia SR, Haskell MM, Ramey AL, Singha D Stimulus control in two rodent models of attention-deficit/hyperactivity disorder *Behav Processes* 2017; 135: 16-24.

Frantz KJ, O'Dell LE, Parsons LH. Behavioral and neurochemical responses to cocaine in periadolescent and adult rats. *Neuropsychopharmacology* 2007; 32, 625–637.

Freeman TB, Spence MS, Boss BD, Spector DH, Strecker RE, Olanow CW, Kordower JH. Development of dopaminergic neurons in the human substantia nigra. **Exp Neurol** 1991; 113: 344–353.

Fusar-Poli P, Rubia K, Sartori G, Balottin U. Striatal dopamine transporter alterations in ADHD: pathophysiology or adaptation to psychostimulants? A Meta-Analysis. **Am. J Psychiatry** 2012; 169 (3): 264–272.

Fuster JM. The Prefrontal Cortex: Anatomy, Physiology and Neuropsychology of the Frontal Lobe, **Lippincott Williams & Wilkins**, New York, 1997, s.333.

Garcia, A, Kirkpatrick, K. Impulsive choice behavior in four strains of rats: Evaluation of possible models of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. **Behav Brain Res** 2013; 238, 10-22.

Garner A, Marceaux JC, Mrug S, Patterson C, Hodgens B. Dimensions and correlates of attention deficit/hyperactivity disorder and Sluggish Cognitive Tempo. **J Abnorm Child Psychol** 2010; 38 (8): 1097-107.

Gazzaley A, Rissman J, Cooney J. Functional interactions between prefrontal and visual association cortex contribute to top-down modulation of visual processing. **Cereb Cortex** 2007; 17(1): 125-135.

Gazzaley A, Cooney JW, McEvoy K, Knight RT, D'Esposito M. Top-down enhancement and suppression of the magnitude and speed of neural activity. **J Cogn Neurosci** 2005; 17, 507–517.

Gerfen CR, Herkenhan M, Thibault J. The neostriatal mosaic. II. patch-directed and matrix-directed mesostriatal dopaminergic and non-dopaminergic systems. **J Neurosci** 1987; 7(12): 3915–3934.

Gibson MA, Butters NS, Reynolds JN, Brien JF. Effects of chronic prenatal ethanol exposure on locomotor activity, and hippocampal weight, neurons, and nitric oxide synthase activity of the young postnatal guinea pig. **Neurotoxicol Teratol** 2000; 22: 183-192.

Giros B, Jaber M, Jones SR, Wightman RM, Caron MG. Hyperlocomotion and indifference to cocaine and amphetamine in mice lacking the dopamine transporter. **Nature** 1996; 379: 606–612.

Gizer IR, Ficks C, Waldman ID. Candidate gene studies of ADHD: A meta-analytic review. **Hum Genet**, 2009; 126 (1): 51–90.

Godbout R, Mantz J, Pirot S, Glowinski J, Thierry AM. Inhibitory influence of the mesocortical dopaminergic neurons on their target cells: electrophysiological and pharmacological characterisation. **J Pharmacol Exp Ther** 1991; 258 (2): 728-738.

Gonon F. The dopaminergic hypothesis of attention-deficit/hyperactivity disorder needs re-examining. **Trends Neurosci** 2009; 32 (1): 2-8.

Gonzalez-Lima F, Sadile AG. Network operations revealed by brain metabolic mapping in a genetic model of hyperactivity and attention deficit: The Naples high- and low-excitability rats. **Neurosci Biobehav Rev**. 2000; 24 (1): 157–160.

Grace AA, Onn SP Morphology and electrophysiological properties of immunocytochemically identified rat dopamine neurons recorded in vitro. **J Neurosci** 1989; 9: 3463–3481

Granon S, Passetti F, Thomas KL, Dalley JW, Everitt BJ, Robbins TW: Enhanced and impaired attentional performance after infusion of D1 dopaminergic receptor agents into rat prefrontal cortex. **J Neurosci** 2000; 20: 1208 –1215.

Grillner P, Mercuri NB. Intrinsic membrane properties and synaptic inputs regulating the firing activity of the dopamine neurons. **Behav Brain Res** 2002; 130 (1-2):149-69.

Groenewegen HJ. Organization of the afferent connections of the mediodorsal thalamic nucleus in the rat, related to mediodorsalprefrontal topography. **Neuroscience** 1988; 24: 397–431.

Gundersen HJG, Bagger P, Bendtsen TF, Evans SM, Korbo L, Marcussen N, Moller A, Nielsen K, Nyengaard JR, Pakkenberg B, Sorensen FB, Vesterby A, West MJ. The new stereological tools: Disector, fractanator, nucleator, and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. **APMIS** 1988a; 96: 857-881.

Gundersen HJG, Bendtsen TF, Korbo L, Marcussen N, Moller A, Nielsen K, Nyengaard JR, Pakkenberg B, Sorensen FB, Vesterby A, West MJ. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. **APMIS** 1988b; 96: 379-394.

Gustafsson P, Thernlund G, Ryding E, Rosen I, Cederblad M. Associations between cerebral blood-flow measured by single photon emission computed tomography (SPECT), electro-encephalogram (EEG), behavior symptoms, cognition and neurologicalsoft signs in children with attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD). **Acta Paediatrica**, 2000; 89: 830–835

Hall DH, Russell RL. The posterior nervous system of the nematode *Caenorhabditis elegans*: serial reconstruction of identified neurons and complete pattern of synaptic interactions. **J Neurosci.** 1991; 11: 1–22

Halliday GM, Törk J Comparative anatomy of the ventromedial mesencephalic tegmentum in the rat, cat, monkey and human. **J Comp Neurol** 1986; 252 (4): 423-445.

Halperin JM, Schulz KP Revisiting the Role of the Prefrontal Cortex in the Pathophysiology of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder **Psychological Bulletin** 2006; 132 (4): 560–581.

Halperin JM, Newcorn JH, Koda VH, Pick L, McKay KE, Knott P. Noradrenergic mechanisms in ADHD children with and without reading disabilities: A replication and extension. **J Am Acad Child Adolesc Psychiatry** 1997; 36: 1688–1697.

Hama H, Kurokawa H, Kawano H, Ando R, Shimogori T, Noda H, Fukami K, Sakaue-Sawano A, Miyawaki A, Scale: a chemical approach for fluorescence imaging and reconstruction of transparent mouse brain. **Nat Neurosci** 2011; 14 (11): 1481-8.

Heidbreder CA, Groenewegen HJ. The medial prefrontal cortex in the rat: evidence for a dorso-ventral distinction based upon functional and anatomical characteristics **Neurosci Biobehav Rev** 2003; 27 (6): 555-79.

Helmchen F, Denk W. Deep tissue two photon microscopy. **Nat Methods** 2005; 2: 932-940.

Helmstaedter M, Briggman KL, Denk W. 3D structural imaging of the brain with photons and electrons. **Curr Opin Neurobiol** 2008, 18: 633–641.

Hendley ED, Wessel DJ, Atwater DG, Gellis J, Whitehorn D, Low WC. Age, sex and strain differences in activity and habituation in SHR and WKY rats. **Physiol Behav** 1985; 34: 379-383.

Herculano-Houzel, S. “The isotropic fractionator: a fast, reliable method to determine numbers of cells in the brain or other tissues”, Neuronal network analysis: concepts and experimental approaches. Vol. 67, Eds. Fellin T, Halassa MM, **Humana Press**, New York, 2012, s.391-403.

Hess EJ, Collins KA, Wilson MC Mouse model of hyperkinesis implicates SNAP-25 in behavioral regulation. **J Neurosci** 1996; 16 (9): 3104-11.

Heyser CJ, Wilson MC, Gold LH. Coloboma hyperactive mutant exhibits delayed neurobehavioral developmental milestones. **Brain Res Dev Brain Res** 1995; 89 (2): 264–269.

Highfield DA, Hu D, Amsel A. Alleviation of x-irradiation-based deficit in memory-based learning by D-amphetamine: Suggestions for attention deficit/hyperactivity disorder. **Proc Natl Acad Sci USA** 1998; 95: 5785–5788.

Himmelstein J, Newcorn JH, Halperin JM: The neurobiology of attention-deficit hyperactivity disorder. **Front Biosci** 2000; 5: D461-D478.

Hökfelt T. “Distributional of tyrosine hydroxylase immunoreactive neurons in the rat brain”, Handbook of Chemical Neuroanatomy. (Classical Transmitters in the CNS, Part I) (Vol. 2) Eds. Björklund A and Hökfelt T, **Elsevier**, New York, 1984, s. 277–379.

Horn JL, Janicki PK, Franks JJ: Diminished brain synaptic plasma membrane Ca(2+)-ATPase activity in spontaneously hypertensive rats: association with reduced anesthetic requirements. **Life Sci** 1995; 56: L427-L432.

Hunziker MHL, Saldana RL, Neuringer A. Behavioral variability in SHR and WKY rats as a function of rearing environment and reinforcement contingency, **J. Exp. Anal. Behav** 1996; 65 (1): 129-144.

Hynd GW, Nieves N, Connor RT, Stone P, Town P, Becker MG, Lahey BB, Lorys AR. Attention deficit disorder with and without hyperactivity: Reaction time and speed of cognitive processing, **J Learn Disabil** 1989; 22 (9): 573-80.

Hynd GW, Hern KL, Novey ES, Eliopoulos D, Marshall R, Gonzalez JJ, Voelle, KK, Attention deficit-hyperactivity disorder and asymmetry of the caudate nucleus. **J Child Neurol** 1993; 8: 339–347.

Ikemoto S. Dopamine reward circuitry: two projection systems from the ventral midbrain to the nucleus accumbens-olfactory tubercle complex. **Brain Res Rev** 2007; 56: 27–78.

Jayaraman A, Nishimori T, Dobner P, Uhl GR Cholecystokinin and neurotensin mRNAs are differentially expressed in subnuclei of the ventral tegmental area. **J Comp Neurol** 1990; 296:291– 302.

Jensen PS, Martin D, Cantwell DP. Comorbidity in ADHD: Implications for research, practice and DSM-V. **J Am Acad Child Adolesc Psychiatry** 1997; 36 (8): 1065-79.

Johansen EB, Killeen PR, Russell VA, Tripp G, Wickens JR, Tannock R, Williams J, Sagvolden T Origins of altered reinforcement effects in ADHD. **Behav Brain Funct** 2009; 18: 5-7.

Johansen EB, Sagvolden T, Kvande G. Effects of delayed reinforcers on the behavior of an animal model of attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD). **Behav Brain Res** 2005; 162: 47–61.

Johansen EB, Fonnum F, Lausund PL, Walaas SI, Baerland NE, Woien G, Sagvolden T. Behavioral changes following PCB 153 exposure in the spontaneously hypertensive rat—an animal model of attention-deficit/hyperactivity disorder. **Behav Brain Funct** 2014; 10: 1-19.

Johansen EB, Killeen PR, Sagvolden T. Behavioral variability, elimination of responses, and delay-of-reinforcement gradients in SHR and WKY rats. **Behav Brain Funct** 2007; 3: 60.

Johansen EB, Sagvolden T, Kvande G. Effects of delayed reinforcers on the behavior of an animal model of attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD). **Behav Brain Res** 2005b; 162: 47–61.

Johnson KA, Wiersema JR, Kuntsi J What would Karl Popper say? Are current psychological theories of ADHD falsifiable? **Behav Brain Funct** 2009; 5-15.

Joshi S, Levatte MA, Dekaban GA; Weaver LC. Identification of spinal interneurons antecedent to adrenal sympathetic preganglionic neurons using trans-synaptic transport of herpes simplex virus type I. **Neuroscience** 1995; 65: 893–903.

Kalivas PW, Nemeroff CB. The mesocorticolimbic dopamine system. New York: **New York Academy of Sciences**, 1988, s.512.

Kawano M, Kawasaki A, Sakata-Haga H, Fukui Y, Kawano H, Nogami H, Hisano S Particular subpopulations of midbrain and hypothalamic dopamine neurons express vesicular glutamate transporter 2 in the rat brain. **J Comp Neurol** 2006; 498: 581–592.

Ke MT, Fujimoto S, Imai T. SeeDB: a simple and morphology-preserving optical clearing agent for neuronal circuit reconstruction, **Nat Neurosci** 2013; 16 (8): 1154-61.

Kessler JW History of minimal brain dysfunctions. In: Rie HE, Rie ED (eds) *Handbook of minimal brain dysfunctions: a critical view*. **Wiley, New York**, pp 18–51, 1980.

Kessler RC, Adler L, Barkley R, Biederman J, Conners CK, Demler O, et al. The prevalence and correlates of adult ADHD in the United States: results from the National Comorbidity Survey Replication. **Am J Psychiatry** 2006; 163 (4): 716–723.

Khalife N, Glover V, Hartikainen A, Taanila A, Ebeling H, Jarvelin M. Prenatal glucocorticoid treatment and later mental health in children and adolescents. **PLoS ONE**, 2012; 8 (11): e81394.

Kooijja MA van der, Glennonb JC. Animal models concerning the role of dopamine in attention-deficit hyperactivity disorder. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews** 2007; 31 597–618.

Kosaka K, Hiraiwa K Zur anatomie der sehnervenbahn und ihrer zentren. **Folia Neurobiol (leipzig)** 1915; 9: 367.

Kosaka T, Kosaka K, Hataguchi Y, Nagatsu I, Wu JY, Ottersen OP, Storm-Mathisen J, Hama K. Catecholaminergic neurons containing GABA-like and/or glutamic acid decarboxylase-like immunoreactivities in various brain regions of the rat. **Exp Brain Res** 1987; 66: 191–210.

Krain AL, Castellanos FX. Brain development and ADHD. **Clin. Psychol. Rev.** 2006; 26 (4): 433–444.

Krettek JE, Price JL. The cortical projections of the mediodorsal nucleus and adjacent thalamic nuclei in the rat. **J Comp Neurol**, 1977; 171:157–92.

Kuczenski R, Segal DS. Differential effects of D- and L-amphetamine and methylphenidate on rat striatal dopamine biosynthesis. **Eur J Pharmacol.** 1975 Feb; 30(2):244-51.

LaHoste GJ, Swanson JM, Wigal SB, Glabe C, Wigal T, King N. Dopamine D4 receptor gene polymorphism is associated with attention deficit hyperactivity disorder. **Mol Psychiatry** 1996; 1: 128–131.

Lammel S, Hetzel A, Hackel O, Jones I, Liss B, Roeper J. Unique properties of mesoprefrontal neurons within a dual mesocorticolimbic dopamine system. **Neuron** 2008; 57: 760–773.

Lammel S, Ion DI, Roeper J, Malenka RC Projection-specific modulation of dopamine neuron synapses by aversive and rewarding stimuli. **Neuron** 2011; 70: 855–862.

Lehohla M, Kellaway L, Russell V. NMDA receptor function in the prefrontal cortex of a rat model for attention-deficit/hyperactivity disorder. **Metab Brain Dis** 2004; 19: 35– 42.

Leo D, Sorrentino E, Volpicelli F. Altered midbrain dopaminergic neurotransmission during development in an animal model of ADHD. **Neurosci Biobehav Rev** 2003; 27 (7): 661–669.

Leo D, Sorrentino E, Volpicelli F, Eyman M, Greco D, Viggiano D. Altered midbrain dopaminergic neurotransmission during development in an animal model of ADHD. **Neurosci Biobehav Rev** 2003; 27: 661– 669.

Leonard BE, McCartan D, White J, King DJ Methylphenidate: a review of its neuropharmacological, neuropsychological and adverse clinical effects. **Hum Psychopharmacol Clin Exp** 2004; 19: 151–180.

Leung AK, Lun Hon K. Attention-Deficit/ Hyperactivity Disorder. **Adv Pediatr.** 2016; 63: 255–280.

Levin, P. M. Restlessness in children. **Archives of Neurology and Psychiatry**, 1938; 39, 764–770.

Levy F. Dopamine vs noradrenaline: inverted-U effects and ADHD theories. *Aust NZ J Psychiatry*, 2009; 43: 101–8.

Lewis DA, Campbell MJ, Foote SL, Goldstein M, Morrison JH. The distribution of tyrosine hydroxylase-immunoreactive fibers in primate neocortex is widespread but regionally specific. *J Neurosci* 1987; 7: 279–290.

Lewis DA, Foote SL, Goldstein M, Morrison JH. The dopaminergic innervation of monkey prefrontal cortex: a tyrosine hydroxylase immunocytochemical study. *Brain Res* 1988; 449: 225–243.

Lewis DA, Sesack SR, Levey AI, Rosenberg DR. Dopamine axons in primate prefrontal cortex: specificity of distribution, synaptic targets, and development. *Adv Pharmacol* 1988; 42: 703-706.

Lewis DA. and Sesack SR. Dopamine systems in the primate brain. *In Handbook of Chemical Neuroanatomy. (The Primate Nervous System, Part I) (Vol. 13) (Bloom FE, Björklund A. and Hökfelt T eds) pp. 263–375, Elsevier, 1997.*

Li Q, Lu G, Antonio GE, Mak YT, Rudd JA, Fan M, Yew DT. The usefulness of the spontaneously hypertensive rat to model attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) may be explained by the differential expression of dopamine-related genes in the brain. *Neurochem Int* 2007; 50: 848–857.

Li W, Quantitative unit classification of ventral tegmental area neurons in vivo. *J. Neurophysiol* 2012; 107 (10): 2808–2820.

Lindvall O, Björklund A. General organization of cortical monoamine systems”, *Monoamine Inttewution of the Cerebral Cortex*, Eds.Descarries L, Reader TR, Jasper HH, Liss AR, *New York*, 1984, s.9-40.

Lindvall O, Björklund A. The organisation of the ascending catecholamine neuron system in the rat brain as revealed by the glyoxylic acid fluorescence method. *Acta Physiol Scand Suppl* 1974; 412: 1–48.

Lindvall O, Björklund A, Divac I. Organization of mesencephalic dopamine neurons projecting to neocortex and septum. *Adv Biochem Psychopharmacol* 1977,16: 39–46
Lammel S, Hetzel A, Hackel O, Jones I, Liss B, Roeper J. Unique properties of mesoprefrontal neurons within a dual mesocorticolimbic dopamine system. *Neuron* 2008; 57 (5): 760–773.

Loewy AD. Viruses as transneuronal tracers for defining neural circuits. *Neurosci. Biobehav Rev* 1988, 22: 679–684.

Loughlin SE, Fallon JH. Substantia nigra and ventral tegmental area projections to cortex: topography and collateralization. *Neuroscience* 1984; 11 (2): 425–435.

Lynd-Balta E. Haber SN. The organization of midbrain projections to the striatum in the primate: sensorimotor-related striatum versus ventral striatum. *Neuroscience* 1994; 59: 625–640.

Umehara M, Ago Y, Kawanai Y, Fujita K, Hiramatsu N, Takuma K, Matsuda T. Methylphenidate and venlafaxine attenuate locomotion in spontaneously hypertensive rats, an animal model of attention-deficit/hyperactivity disorder, through alpha2-adrenoceptor activation *Behav Pharmacol* 2013; 24 (4): 328-331.

Wang M, Ramos BP, Paspalas CD, Shu Y, Simen A, Duque A. Alpha2A-adrenoceptors strengthen working memory networks by inhibiting cAMP-HCN channel signaling in prefrontal cortex **Cell** 2007; 129 (29): 397-410.

Magara F, Ricceri L, Wolfer DP, Lipp HP. The acallosal mouse strain I/LnJ: a putative model of ADHD? **Neurosci Biobehav Rev** 2000; 24 45–50.

Malenka RC, Nestler EJ, Hyman SE Molecular Neuropharmacology: A Foundation for Clinical Neuroscience. **McGraw-Hill Medical**, New York, 2009, s.452.

Marcil J, Thibault C, Anand-Srivastava MB. Enhanced expression of Gi-protein precedes the development of blood pressure in spontaneously hypertensive rats. **J Mol Cell Cardiol** 1997; 29: 1009 –1022.

Margolis EB, Hjelmstad GO, Bonci A, Fields HL Kappa-opioid agonists directly inhibit midbrain dopaminergic neurons. **J Neurosci** 2003; 23(31): 9981–9986.

Margolis EB, Lock H, Hjelmstad GO, Fields HL The ventral tegmental area revisited: is there an electrophysiological marker for dopaminergic neurons? **J Physiol** 2006; 577 (3): 907–924.

Marin F, Herrero MT, Vyas S, Puelles L. Ontogeny of tyrosine hydroxylase mRNA expression in Mid- and forebrain: Neuromeric pattern and novel positive regions. **Dev. Dyn.** 2005; 234 (3): 709–717

Matsumoto M, Hikosaka O. Two types of dopamine neuron distinctly convey positive and negative motivational signals. **Nature** 2009; 459:837–41.

Matthews M, Nigg JT, Fair DA Attention Deficit Hyperactivity Disorder Curr Top **Behav Neurosci** 2014; 16: 235–266.

Mazur GJ, Wood-Isenberg G, Watterson E, Sanabria F. Detrimental effects of acute nicotine on the response-withholding performance of spontaneously hypertensive and Wistar Kyoto rats. **Psychopharm** 2014; 231: 2471-2482

McCraeken. Attention deficit disorder. In: Sadock Bj, Sadock VA, editors. Comprehensive Textbook of Psychiatry 7th. Edition **Lippincott Williams&Wilkins, Philadelphia, USA:** 2000; s.2679- 2692.

McGeer EG, McGeer PL, Wada JA. Distribution of tyrosine hydroxylase in human and animal brain. **J Neurochem** 1971; 18: 1647–1658.

McKinney W. Jr, Bunney WE Jr. Animal model of depression. I. Review of evidence: Implications for research. **Arch Gen Psychiatry** 1969; 21: 240-248.

Meyer E, Byers RK. Measles encephalitis: A follow-up study of sixteen patients. **American Journal of Diseases of Children**, 1952; 84: 543–579.

Mignini, F., Vitaioli, L., Sabbatini, M., Tomassoni, D., and Amenta, F. The cerebral cortex of spontaneously hypertensive rats: A quantitative microanatomical study. **Clin Exp Hypertens** 2004; 26: 287-303.

Mill J, Sagvolden T, Asherson P. Sequence analysis of Drd2, Drd4, and Dat1 in SHR and WKY rat strains. **Behavioral and Brain Functions** 2005; 1: 24.

Miner LH, Schroeter S, Blakely RD, Sesack SR. Ultrastructural localization of the norepinephrine transporter in superficial and deep layers of the rat prelimbic prefrontal cortex and its spatial relationship to probable dopamine terminals. **J Comp Neurol** 2003; 466(4):478-94.

Molitch M, Eccles AK. Effect of benzedrine sulphate on intelligence scores of children. **American Journal of Psychiatry** 1937; 94: 587–590.

Morales M ve Margolis EB. Ventral tegmental area: cellular heterogeneity, connectivity and behaviour. **Nat Rev Neurosci** 2017; 18 (2): 73-85.

Morton WA, Stockton GG Methylphenidate abuse and psychiatric side effects. Prim Care Companion **J Clin Psychiatry** 2000; 2: 159–164.

Myers MM, Musty RE, Hendley ED. Attenuation of hyperactivity in the spontaneously hypertensive rat by amphetamine **Behav Neural Biol** 1982; 3: 42–54

Myers MM, Musty RE, Hendley ED. Attenuation of hyperactivity in the spontaneously hypertensive rat by amphetamine. **Behav Neural Biol.** 1982; 34 (1):42–54

Nakano M, and Mizuno T. Age-related changes in the metabolism of neurotransmitters in rat striatum: a microdialysis study. **Mech Ageing Dev** 86 (2): 95–104.

Nauta WJH. Hippocampal projections and related neural pathways to the midbrain in the cat. **Brain** 1958; 81 (3): 319-340.

NICE. Attention deficit hyperactivity disorder. Diagnosis and management of ADHD in children, young people and adults. **National Clinical Practice Guideline Number 72** (03.03.2013)

Nigg JT, Casey BJ. An integrative theory of attention-deficit/ hyperactivity disorder based on the cognitive and affective neurosciences. **Dev Psychopathol.** 2005; 17 (3): 785-806.

Noack HJ, Lewis DA. Antibodies directed against tyrosine hydroxylase differentially recognize noradrenergic axons in monkey neocortex. **Brain Res** 1989; 500: 313–324.

Norgren Jr, RB, Lehman MN. Herpes simplex virus as a transneuronal tracer. **Neurosci. Biobehav. Rev** 1998; 22 (6): 695-708.

Nwaneshiudu A, Kuschal C, Sakamoto FH, Anderson RR, Schwarzenberger K, Roger C. Introduction to Confocal Microscopy. **J Invest Dermatol** 2012; 132 (12): e3.

Okamoto K, Aoki K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. **Jpn Circ J** 1963; 27: 282–293.

Omelchenko N, Sesack SR (2006) Cholinergic axons in the rat ventral tegmental area synapse preferentially onto mesoaccumbens dopamine neurons. **J Comp Neurol** 494: 863–875

Orduna, V. Impulsivity and sensitivity to amount and delay of reinforcement in an animal model of ADHD. **Behav. Brain Res** 2015, 294: 62-71.

Palmer ED and Finger S. An early description of ADHD (inattentive subtype): Dr. Alexander Crichton and “Mental Restlessness” (1798). *Child Psych and Psychiatry Review*, 2001; 6 (2): 66–73.

Panizzon L. La preparazione di piridil-e piperidil-arilacetoni-trili e di alcuni prodotti di trasformazione (Parte I) *Chimica Acta*. 1944; 27: 1748–1757.

Papa M, Berger DF., Sagvolden T, Sergeant JA, Sadile AG. A quantitative cytochrome oxidase mapping study, cross-regional and neurobehavioural correlations in the anterior forebrain of an animal model of attention deficit hyperactivity disorder. *Behav Brain Res*, 1998; 94: 197–211.

Paule MG, Rowland AS, Ferguson SA, Chelonis JJ, Tannock R, Swanson JM, Castellanos FX. Attention deficit/hyperactivity disorder: characteristics, interventions, and models. *Neurotoxicol and Teratol* 2000; 22: 631-651.

Pauly V, Frauger E, Lepelley M, Mallaret M, Boucherie Q, Micallef J. Patterns and profiles of methylphenidate use both in children and adults. *Br J Clin Pharmacol*. 2018 doi: 10.1111 /bcp.13544. [Epub ahead of print]

Pennington BF, Ozonoff S. Executive functions and developmental psychopathology. *J Child Psychol Psychiatry* 1996; 37: 51– 87

Perlov E, Philipsen AI. Spectroscopic findings in attention-deficit/ hyperactivity disorder: review and meta-analysis. *World J Biol Psychiatry* 2009; 10: 355–365.

Perogamvrosa L ve Schwartz S. The roles of the reward system in sleep and dreaming. *Neurosci Biobehav Rev*. 2012; 36 (8): 1934–1951.

Petrovic P and Castellanos FX Top-Down Dysregulation—From ADHD to Emotional Instability. *Front. Behav. Neurosci* 2016; 10: 70.

Phillipson OT A Golgi study of the ventral tegmental area of Tsai and interfascicular nucleus in the rat. *J Comp Neurol* 1979a; 187: 99–115.

Phillipson OT. The cytoarchitecture of the interfascicular nucleus and ventral tegmental area of Tsai in the rat. *J Comp Neurol* 1979b; 187: 85–98.

Phillipson O. Afferent projections to the ventral tegmental area of Tsai and interfascicular nucleus: a horseradish peroxidase study in the rat. *J Comp Neurol* 1979c; 187: 117–143.

Pirot S, Godbout R, Mantz J, Tassin JP, Glowinski J, Thierry AM. Inhibitory effects of ventral tegmental area stimulation on the activity of prefrontal cortical neurons: evidence for the involvement of both dopaminergic and GABAergic components. *Neuroscience* 1992; 49 (4): 857-65.

Pistis M, Perra S, Pillolla G, Melis M, Muntoni AL, Gessa GL. Adolescent exposure to cannabinoids induces longlasting changes in the response to drugs of abuse of rat midbrain dopamine neurons. *Biol Psychiatry* 2004; 56: 86–94.

Pliszka SR, McCracken JT, Maas JW. Catecholamines in attention deficit hyperactivity disorder: Current perspectives. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 1996; 35, 264–272.

Polanczy GV, Willcutt EG, Salum GA, Kieling C, Rohde LA. ADHD prevalence estimates across three decades: an updated systematic review and meta-regression analysis. *Int J Epidemiol* 2014; 43 (2): 434–442.

Polanczyk G, de Lima MS, Horta BL, Biederman J, Rohde LA. The worldwide prevalence of ADHD: a systematic review and metaregression analysis. *Am J Psychiatry* 2007; 164: 942–948.

Polanczyk G, Jensen PS, Epidemiologic Considerations in Attention Deficit Hyperactivity Disorder: A Review and Update *Child Adolesc Psychiatr Clin N Am* 2008; 17 (2): 245–260.

Prensa L, Parent A. The nigrostriatal pathway in the rat: a single-axon study of the relationship between dorsal and ventral tier nigral neurons and the striosome/matrix striatal compartments. *J Neurosci* 2001; 21 (18): 7247–7260.

Rafalovich A. The conceptual history of attention deficit hyperactivity disorder: idiocy, imbecility, encephalitis and the child deviant, 1877–1929. *Deviant Behav* 2001; 22: 93–115.

Rapp PR, Gallagher M. Preserved neuron number in the hippocampus of aged rats with spatial learning deficits. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 9926–30.

Riccardi P, Baldwin R, Salomon R, Anderson S, Ansari MS, Li R. Estimation of baseline dopamine D(2) receptor occupancy in striatum and extrastriatal regions in humans with positron emission tomography with [(18)F] fallypride. *Biol Psychiatry* 2008; 63, 241–244.

Riggs NR, Huh J, Chou CP, Spruijt-Metz D, Pentz MA. Executive function and latent classes of childhood obesity risk. *J Behav Med* 2012; 35 (6): 642-50.

Robbins TW, Arnsten AF. The neuropsychopharmacology of fronto-executive function: monoaminergic modulation. *Annu Rev Neurosci* 2009; 32: 267-87.

Roberts W, Milich R, Barkley RA. “Primary symptoms, diagnostic criteria, subtyping and prevalence of ADHD”, Attention-Deficit Hyperactivity Disorder: A Handbook for Diagnosis and Treatment, Eds. Barkley, RA, *The Guilford Press*, New York, s.51-80.

Roeper J. Dissecting the diversity of midbrain dopamine neurons. *Trends Neurosci* 2013; 36 (6): 336-342.

Roessner V, Sagvolden T, Dasbanerjee T, Middleton FA, Faraone SV, Walaas SI. Methylphenidate normalizes elevated dopamine transporter densities in an animal model of the attention-deficit/hyperactivity disorder combined type, but not to the same extent in one of the attention-deficit/hyperactivity disorder inattentive type. *Neuroscience* 2011; 167, 1183–1191.

Ross DM, Ross SA. Hyperactivity: research, theory and action. *Jon Wiley & Sons*, New York, 1976, s.385.

Russell V, de Villiers A, Sagvolden T, Lamm M, Taljaard J. Altered dopaminergic function in the prefrontal cortex, nucleus accumbens and caudate-putamen of an animal model of attention-deficit/hyperactivity disorder—the spontaneously hypertensive rat. *Brain Res.* 1995; 676 (2): 343-51.

Russell V, de Villiers A, Sagvolden T, Lamm M, Taljaard J. Differences between electrically- ritalin- and D-amphetamine-stimulated release of [3 H]dopamine from brain slices suggest impaired vesicular storage of dopamine in an animal model of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. **Behav Brain Res** 1998; 94: 163–171.

Russell VA, Sagvolden T, Johansen EB. Animal models of attention-deficit hyperactivity disorder. **Behav Brain Funct** 2005; 1-9.

Russell VA. Hypodopaminergic and hypernoradrenergic activity in prefrontal cortex slices of an animal model for attentiondeficit hyperactivity disorder the spontaneously hypertensive rat. **Behav Brain Res**, 2002; 130 (1-2) :191-196.

Russell VA. Dopamine hypofunction possibly results from a defect in glutamate-stimulated release of dopamine in the nucleus accumbens shell of a rat model for attention deficit hyperactivity disorder—the spontaneously hypertensive rat. **Neurosci Biobehav Rev** 2003; 27: 671– 682.

Rutter, M. Genes and behavior: Nature-nurture interplay explained. Genes, Brain, and Behavior, **Wiley-Blackwell**, Oxford, 2006, s.290.

Sabbatini M, Strocchi P, Vitaioli L, Amenta F. The hippocampus in spontaneously hypertensive rats: A quantitative microanatomical study. **Neuroscience** 2000; 100: 251-258.

Safe SH. Polychlorinated biphenyls (PCBs): environmental im pact, biochemical and toxic responses, and implications for risk assessment. **Crit Rev Toxicol** 1994; 24 (2): 87–149.

Sagvolden T, Aase H, Zeiner P, Berger D. Altered reinforcement mechanisms in attention-deficit/hyperactivity disorder **Behav Brain Res** 1998; 94: 61–71

Sagvolden T, Archer T. “Future perspectives on ADD research – an irresistible challenge”, Attention deficit disorder: clinical and basic research, Eds. Sagvolden T, Archer T **Lawrence Erlbaum Associates**, NJ, 1989, s.369–389.

Sagvolden T, Metzger MA, Schiorbeck HK, Rugland AL, Spinnangr I, Sagvolden G. The spontaneously hypertensive rat (SHR) as an animal model of childhood hyperactivity (ADHD): changed reactivity to reinforcers and to psychomotor stimulants **Behav Neural Biol** 1992; 58 (2): 103–112

Sagvolden T, Johansen EB, Aase H, Russell VA. A dynamic developmental theory of attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) predominantly hyperactive/impulsive and combined subtypes. **Behav Brain Sci** 2005b, 28 (3): 397-419.

Sagvolden T, Johansen EB, Wøien G, Walaas SI, Storm-Mathisen J, Bergersen LH, Hvalby O, Jensen V, Aase H, Russell VA, Killeen PR, Dasbanerjee T, Middleton FA, Faraone SV. The spontaneously hypertensive rat model of ADHD--the importance of selecting the appropriate reference strain. **Neuropharmacology** 2009; 57 (7-8): 619-626.

Sagvolden T, Johansen EB. Rat models of ADHD. **Curr Top Behav Neurosci** 2012; 9: 301-15.

Sagvolden T, Russell VA, Aase H, Johansen EB, Farshbaf M. Rodent models of attention- deficit/hyperactivity disorder. **Biol. Psychiatry** 2005a; 57: 1239-1247.

Sagvolden, T. Behavioral validation of the spontaneously hypertensive rat (SHR) as an animal model of attention-deficit/hyperactivity disorder (AD/HD). *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2000; 24:31- 39.

Sagvolden T, Johansen EB, Wøien G, Walaas SI, Storm-Mathisen J, Bergersen LH, Hvalby O, Jensen V, Aase H, Russell VA, Killeen PR, Dasbanerjee T, Middleton FA, Faraone SV. The spontaneously hypertensive rat model of ADHD—The importance of selecting the appropriate reference strain. *Neuropharm.* 2009; 57 (7-8): 619-626.

Sanchez-Catalan MJ, Kaufling J, Georges F, Veinante P, Barrot M. The antero-posterior heterogeneity of the ventral tegmental area. *Neuroscience* 2014; 12 (282): 198-216.

Saper CB. Any way you cut it: a new journal policy for the use of unbiased counting methods. *J Comp Neurol* 1996; 364: 5.

Sarter M, Hagan J, Dudchenko P Behavioral screening for cognition enhancers: From indiscriminate to valid testing: Part I. *Psychopharmacology* 1992; 107: 144–159.

Satterfield JH, Dawson ME: Electrodermal correlates of hyperactivity in children. *Psychophysiology* 1971; 8: 191–197.

Scassellati C, Bonvicini C, Faraone SV, Gennarelli M. Biomarkers and ADHD: a systematic review and meta-analyses. *J Am Acad Child Adol Psychiatry* 2012; 51: 1003–1019.

Schachar R, Mota VL, Logan GD, Tannock R, Klim P. Confirmation of an inhibitory control deficit in attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Abnorm Child Psychol* 2000; 28: 227–235.

Schiemann J, Schlaudraff F, Klose V, Bingmer M, Seino S, Magill PJ, Zaghloul KA, Schneider G, Liss B, Roeper J. K-ATP channels in dopamine substantia nigra neurons control bursting and novelty-induced exploration. *Nat Neurosci* 2012; 15 (9): 1272–1280.

Seroogy KB, Lundgren KH, Tran TM, Guthrie KM, Isackson PJ, Gall CM Dopaminergic neurons in rat ventral midbrain express brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNAs. *J Comp Neurol* 1994; 342: 321–334.

Sesack SR, Bunney BS. Pharmacological characterization of the receptor mediating electrophysiological responses to dopamine in the rat medial prefrontal cortex: a microiontophoretic study. *J Pharmacol Exp Ther* 1989; 248, 1323-1333.

Sesack SR, Deutch AY, Roth RH, Bunney BS. Topographical organization of the efferent projections of the medial prefrontal cortex in the rat: an anterograde tract-tracing study using Phaseolus vulgaris leucoagglutinin. *J Comp Neurol* 1989; 290: 213–42.

Sesack SR, Grace AA Cortico-Basal Ganglia reward network: microcircuitry. *Neuropsychopharmacology* 2010; 35 (1): 27–47.

Sesack SR, Snyder CL, Lewis DA. Axon terminals immunolabeled for dopamine or tyrosine hydroxylase synapse on GABA-immunoreactive dendrites in rat and monkey cortex. *J Comp Neurol* 1995; 363:264–280.

Shaywitz BA, Yager RD, Klopfer JH. Selective brain dopamine depletion in developing rats: an experimental model of minimal brain dysfunction. **Science** 1976; 191 (4224): 305-8.

Shaywitz SE, Shaywitz BA, Cohen DJ, Young JG. Monoaminergic mechanisms in hyperactivity", *Developmental neuropsychiatry*, Eds. Rutter M, **Guilford Press**, New York, 1983, s.330–347.

Shaywitz SE, Shaywitz BA, Jatlow PR, Sebrechts M, Anderson GM, Cohen DJ. Biological differentiation of attention deficit disorder with and without hyperactivity: A preliminary report. **Annals of Neurology** 1986; 21: 363.

Shaw P, Eckstrand K, Sharp W et al. Attention-deficit/hyperactivity disorder is characterized by a delay in cortical maturation. **Proc Natl Acad Sci** 2007;104 (49): 19649–19654.

Shirley M. A behavior syndrome characterizing prematurely born children. **Child Development** 1939; 10: 115–128.

Siesser WB, Zhao J, Miller LR, Cheng SY, McDonald MP. Transgenic mice expressing a human mutant beta1 thyroid receptor are hyperactive, impulsive, and inattentive. **Genes Brain Behav** 2006; 5 (3): 282–297

Smidt MP, Burbach JP How to make a mesodiencephalic dopaminergic neuron. **Nat Rev Neurosci** 2007; 8: 21–32.

Smidt M, van Schaick H, Lanctot C, Tremblay J, Cox J, van der Kleij A, Wolterink G, Drouin J, Burbach J. A homeodomain gene Ptx3 has highly restricted brain expression in mesencephalic dopaminergic neurons. **Proc Natl Acad Sci** 1997; 94: 13305–13310.

Smits SM, Burbach JPH, Smidt MP Developmental origin and fate of meso-diencephalic dopamine neurons. **Prog Neurobiol** 2006; 78: 1–16

Solanto MV. Dopamine dysfunction in AD/HD: integrating clinical and basic neuroscience research **Behav Brain Res** 2002; 130 (1-2): 65-71.

Solanto MV: Neuropsychopharmacological mechanisms of stimulant drug action in attention-deficit hyperactivity disorder: A review and integration. **Behav Brain Res** 1998, 94: 127-152.

Somkuwar SS, Katak KM, Bardo MT, Dwoskin LP. Adolescent methylphenidate treatment differentially alters adult impulsivity and hyperactivity in the Spontaneously Hypertensive Rat model of ADHD. **Pharmacol Biochem Behav** 2016; 141: 66-77.

Sonuga-Barke EJ. The dual pathway model of AD/HD: an elaboration of neurodevelopmental characteristics. **Neurosci Biobehav Rev** 2003; 27: 593–604

Sonuga-Barke EJS. Psychological heterogeneity in AD/ HD: A dual pathway model of behaviour and cognition. **Behav Brain Res** 2002; 130; 29–36.

Spencer TJ, Biederman J, Madras BK, Faraone SV, Dougherty DD, Bonab AA, Fischman AJ. In vivo neuroreceptor imaging in attention-deficit/hyperactivity disorder: a focus on the dopamine transporter. **Biol Psychiatry** 2005; 57: 1293–1300.

Spencer T, Biederman J, Ciccone P, Madras B, Dougherty D, Bonab A. A PET study examining pharmacokinetics, detection and likeability, and dopamine transporter receptor occupancy of short and long-acting orally administered formulations of methylphenidate in adults. *Amer Jour Psychiatry* 2006; 163: 387–395.

Sponauglea AE, Badanicha KA, Kirstein CL. Localization of stereotaxic coordinates for the ventral tegmental area in early adolescent, mid-adolescent and adult rats *Brain Res* 2008; 1218: 215-23.

Stanley A, Chavda K, Subramanian A, Prabhu SV, Ashavaid TF. DRD4 and DAT1 VNTR Genotyping in Children with Attention Deficit Hyperactivity Disorder. *Indian J Clin Biochem* 2017; 32 (2): 239-242

Steffensen SC, Henriksen SJ, Wilson MC Transgenic rescue of SNAP-25 restores dopamine-modulated synaptic transmission in the coloboma mutant *Brain Res* 1999; 20; 847 (2):186-95.

Still GF Some abnormal psychical conditions in children: the Goulstonian lectures. *Lancet* 1902; 1: 1008–1012

Sulzer D. Multiple hit hypotheses for dopamine neuron loss in Parkinson's disease. *Trends Neurosci* 2007; 30: 244–250.

Swanson LW. The projections of the ventral tegmental area and adjacent regions: A combined fluorescent retrograde tracer and immunofluorescence study in the rat. *Brain Res Bull* 1982; 9: 321–353.

Swanson JM, Baler RD, Volkow ND. Understanding the effects of stimulant medications on cognition in individuals with attention-deficit hyperactivity disorder: A decade of progress. *Neuropsychopharmacol* 2011; 36 (1): 207–226.

Swanson, LW. The projections of the ventral tegmental area and adjacent regions: a combined fluorescent retrograde tracer and immunofluorescence study in the rat. *Brain Res Bull* 1982; 9 (1-6): 321–353.

Szatmari P, Saigal S, Rosenbaum P, Campbell D. Psychopathology and adaptive functioning among extremely low birthweight children at eight years of age. *Dev Psychopathol* 1993; 5: 345–357.

Tan Y, Brog JS, Williams ES, Zahm DS. Morphometric analysis of ventral mesencephalic neurons retrogradely labeled with fluoro-gold following injections in the shell, core and rostral pole of the rat nucleus accumbens. *Brain Res* 1995; 689: 151–156.

Tansey EM. The Life and Works of Sir Alexander Crichton, F.R.S. (1763–1856): a Scottish physician to the imperial Russian Court. *Notes Rec R Soc Lond* 1984; 38: 241–259.

Tassin JP, Stinus L, Simon H, Blanc G, Thierry AM, Le Moal M, Cardo B, Glowinski J. Relationship between the locomotor hyperactivity induced by A10 lesions and destruction of the frontocortical dopaminergic innervation in the rat. *Brain Res* 1978; 141: (2): 267–281.

Taylor E. Clinical foundations of hyperactivity research. *Behav Brain Res* 1998; 94: 11–24.

Thapar A, Cooper M, Eyre O, Langley K. Practitioner Review: What have we learnt about the causes of ADHD? *J Child Psychol Psychiatry* 2013; 54: (1) 3–16.

Thapar A, Fowler T, Rice F, Scourfield J, van den BM, Thomas H, Harold G, Hay D. Maternal smoking during pregnancy and attention deficit hyperactivity disorder symptoms in offspring. *Am J Psychiatry* 2003; 160: 1985-1989.

Polanczyk G, de Lima MS, Horta BL, Biederman J, Rohde LA The worldwide prevalence of ADHD: a systematic review and metaregression analysis. *Am J Psychiatry* 2007; 164(6): 942-8.

Thierry AM, Blanc G, Sobel A, Stinus L, Glowinski J. Dopaminergic terminals in the rat cortex. *Science* 1973; 182: 499–501.

Torack RM, Morris JC. Tyrosine hydroxylase-like (TH) immunoreactivity in human mesolimbic system. *Neurosci Lett* 1990; 116: c75–80.

Tredgold AK. *Mental deficiency (amentia)*. 1st edn. *Wood*, New York. 1908, s.478.

Trinh JV, Nehrenberg DL, Jacobsen JPR, Caron MG, Wetsel WC. Differential psychostimulant-induced activation of neural circuits in dopamine transporter knockout and wild type mice. *Neuroscience* 2003; 118: 297–310.

Tripp G, Wickens JR. Neurobiology of ADHD. *Neuropharmacology* 2009; 57: 579–589.

Tripp G, Wickens JR. Research review: dopamine transfer deficit: A neurobiological theory of altered reinforcement mechanisms in ADHD. *J Child Psychol Psychiatry*. 2008; 49: 691–704.

Tsai C. The optic tracts and centers of the opossum. *Didelphis virginiana*. *J Comp Neurol*. 1925; 39(2): 173-216.

Tsai PS, Kaufhold JP, Blinder P, Friedman B, Drew PJ, Karten HJ, Lyden PD, Kleinfeld D. Correlations of Neuronal and Microvascular Densities in Murine Cortex Revealed by Direct Counting and Colocalization of Nuclei and Vessels, *J Neurosci* 2009; 29 (46): 14553–14570.

Tye KM, Mirzabekov JJ, Warden MR, Ferenczi EA, Tsai HC, Finkelstein J, Kim SY, Adhikari A, Thompson KR, Andalman AS. Dopamine neurons modulate neural encoding and expression of depression-related behaviour. *Nature* 2013; 493: 537–541.

Tzschentke TM, Schmidt WJ. Functional relationship among medial prefrontal cortex, nucleus accumbens, and ventral tegmental area in locomotion and reward. *Crit Rev Neurobiol* 2000; 14: 131–142.

Ustione A, Piston DW. A simple introduction to multiphoton microscopy. *Journal of microscopy*. *J Microsc*. 2011; 243 (3): 221-6.

Uylings HMB, Van Eden CG. Qualitative and quantitative comparison of the prefrontal cortex in the rat and in primates, including humans. *Prog Brain Res*. 1990; 85: 31–62.

V. Russell, S. Allie, T. Wiggins Increased noradrenergic activity in prefrontal cortex slices of an animal model for attention-deficit hyperactivity disorder—the spontaneously hypertensive rat. *Behav Brain Res*. 2000; 117: 69-74.

Valenstein T, Case B, Valenstein ES. Stereotaxic atlas of the infant rat hypothalamus **Developmental Psychobiology**. 1969; 2(2): 75-80.

Valera, E.M., Faraone, S.V., Murray, K.E., Seidman, L.J. Meta-analysis of structural imaging findings in attention-deficit/hyperactivity disorder. **Biol. Psychiatry**. 2007; 61: 1361–1369.

Van Den Buuse M, De Jong W. Differential effects of dopaminergic drugs on open - field behavior of spontaneously hypertensive rats and normotensive Wistar \pm Kyoto rats. **J Pharmacol Exp Ther** 1989; 248: 1189-1196.

Van den Heuvel, D.M. and Pasterkamp, R.J. Getting connected in the dopamine system. **Prog. Neurobiol** 2008; 85: 75–93

Van der Burg JW, Jensen ET, van de Bor M, Joseph RM, O'Shea TM, Kuban K, Allred EN, Scott M, Hunter S, Hooper SR, Dammann O, Leviton A. Maternal obesity and attention-related symptoms in the preterm offspring. **Early Hum Dev** 2017; 17: 115-9-15.

Van Eden CG, Hoorneman EM, Buijs RM, Matthijssen MA, Geffard M, Uylings HB. Immunocytochemical localization of dopamine in the prefrontal cortex of the rat at the light and electron microscopical level. **Neuroscience** 1987; 22: 849–62.

Van Eden CG, Uylings HBM. Cytoarchitectonic development of the prefrontal cortex in the rat. **J Comp Neurol** 1985; 241: 253–67.

Verney C, Zecevic N, Nikolic B, Alvarez C, Berger B. Early evidence of catecholaminergic cell groups in 5- and 6-week-old human embryos using tyrosine hydroxylase and dopamine- β -hydroxylase immunocytochemistry. **Neurosci Lett** 1991; 131: 121–124.

Viggiano D, Vallone D, Welzl H, Sadile AG. The Naples High- and Low-Excitability rats: Selective breeding, behavioral profile, morphometry, and molecular biology of the mesocortical dopamine system. **Behav Genet**. 2002; 32: 315–333.

Volkmar FR. Changing perspectives on ADHD. **Am J Psychiatry** 2003; 160: 1025–1027.

Volkow ND, Wang GJ, Fowler JS, Telang F, Maynard L, Logan J, Gatley SJ, Pappas N, Wong C, Vaska P, Zhu W, Swanson JM. Evidence that methylphenidate enhances the saliency of a mathematical task by increasing dopamine in the human brain. **Am J Psychiatry**. 2004; 161 (7): 1173-80.

Volkow ND, Wang GJ, Kollins SH, Wigal TL, Newcorn JH, Telang F, Fowler JS, Zhu W, Logan J, Ma Y, Pradhan K, Wong C, Swanson JM. Evaluating dopamine reward pathway in ADHD: clinical implications. **JAMA** 2009; 302 (10): 1084-91.

Volkow ND, Wang GJ, Tomasi D, Kollins SH, Wigal TL, Newcorn JH. Methylphenidate-elicited dopamine increases in ventral striatum are associated with long-term symptom improvement in adults with attention deficit hyperactivity disorder. **J Neurosci** 2012; 32 (3): 841–849.

Wang HL, Morales M. Corticotropin-releasing factor binding protein within the ventral tegmental area is expressed in a subset of dopaminergic neurons. **J Comp Neurol** 2008; 509: 302–318

Wang M, Ramos BP, Paspalas CD, Shu Y, Simen A, Duque A. Alpha2Adrenoceptors strengthen working memory networks by inhibiting cAMP-HCN channel signaling in prefrontal cortex. **Cell** 2007; 129: 397–410.

Ward S, Thomson N, White JG, Brenner S. Electron microscopical reconstruction of the anterior sensory anatomy of the nematode *Caenorhabditis elegans*. **J Comp Neurol** 1975; 160:313–337.

Ware R.W Three-dimensional reconstruction from serial sections. **Int Rev Cytol** 1975; 40: 325-440.

Watanabe Y, Fujita M, Ito Y, Okada T, Kusuoka H, Nishimura T. Brain dopamine transporter in spontaneously hypertensive rats. **J Nucl Med** 1997; 38:470 – 474.

Webster MJ, Bachevalier J, Ungerleider LG. Connections of inferior temporal areas TEO and TE with parietal and frontal cortex in macaque monkeys. **Cereb Cortex** 1994; 4: 470–483.

Wender PH A possible monoaminergic basis for minimal brain dysfunction. **Psychopharmacol Bull** 1975; 11 (3): 36-7.

Werner H, Strauss AA. Pathology of figure–ground relation in the child. **J Abnorm Soc Psychol** 1941; 36 (2): 236–248.

West MJ, Slomianka L, Gundersen H.J., Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator. **Anat Rec** 1991; 231 (4): 482-97.

West MJ, Gundersen HJG. Unbiased stereological estimation of the number of neurons in the human hippocampus. **J Comp Neurol** 1990; 296: 1-22.

West MJ, Slomianka L, Gundersen HJG. Unbiased Stereological Estimation of the Total Number of Neurons in the Subdivisions of the Rat Hippocampus Using the Optical Fractionator. **Anat Rec** 1991; 231: 482-497.

Wigal SB, Childress A, Berry SA, Belden HW, Chappell P, Wajsbrot DB, Nagraj P, Abbas R, Palumbo D. Optimization of Methylphenidate Extended-Release Chewable Tablet Dose in Children with ADHD: Open-Label Dose Optimization in a Laboratory Classroom Study. **J Child Adolesc Psychopharmacol** 2018; [Epub ahead of print]

Willcutt EG. The prevalence of DSM-IV attention-deficit/hyperactivity disorder: a meta-analytic review *Neurotherapeutics*. 2012; 9 (3): 490-9.

Willcutt, E.G., Doyle, A. E., Nigg, J. T., Faraone, S.V., & Pennington, B. F. Validity of executive function theory and attention deficit/hyperactivity disorder: A meta-analytic review. **Biological Psychiatry**. 2005; 57 (11): 1336-1346.

Williams RW, Rakic P. Three-dimensional counting: an accurate and direct method to estimate numbers of cells in sectioned material. **J Comp Neurol** 1988; 278: 344–352.

Williams SM, Goldman-Rakic PS. Widespread origin of the primate mesofrontal dopamine system. **Cereb Cortex** 1998; 8 (4): 321–345.

Willner P. Validation criteria for animal models of human mental disorders: Learned helplessness as a paradigm case. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 1986; 10 (6): 677-690.

Winterer G, Weinberger DR. Genes, dopamine and cortical signal-to-noise ratio in schizophrenia. *Trends Neurosci* 2004; 27: 683–690.

Wultz B, Sagvolden T, Moser EI, Moser MB, The spontaneously hypertensive rat as an animal model of attention - deficit hyperactivity disorder: Effects of methylphenidate on exploratory behavior. *Behav. Neural Biol.* 1990; 53: 88-102.

Wultz B, Sagvolden T. The hyperactive spontaneously hypertensive rats learns to sit still, but not to stop bursts of responses with short interresponse times, *Behav Genet* 1992; 22: 415-433.

Yamaguchi T, Wang HL, Li X, Ng TH, Morales M. Mesocorticolimbic glutamatergic pathway. *J Neurosci* 2011; 31: 8476–8490.

Yamaguchi, T, Sheen, W, Morales, M. Glutamatergic neurons are present in the rat ventral tegmental area. *Eur. J. Neurosci* 2007; 25: 106–118.

Zametkin AJ and Rapoport JL. “The pathophysiology of attention deficit disorder with hyperactivity: A review”, *Advances in clinical child psychology*, Eds. Lahey BB, Kazdin AE, *Plenum Press*, New York, 1986; s.177–216.

Zecevic N, Verney C. Development of the catecholamine neurons in human embryos and fetuses, with special emphasis on the innervation of the cerebral cortex. *J Comp Neurol* 1995; 351: 509–535.

8. ÖZGEÇMİŞ

02.03.1987 tarihinde Denizli’de dünyaya gelen Ayşegül GÜNGÖR AYDIN ilköğrenimini Gazi İlkokulu’nda, orta öğrenimini Özel Servergazi Koleji’nde, lise öğrenimini ise Türk Eğitim Vakfı Anadolu Lisesi’nde tamamlamıştır. 2009 yılında Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Bölümü’nden mezun olmuştur 2012 yılında Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyofizik Ana Bilim Dalı’nda yüksek lisansını tamamlamıştır. 2012 yılının eylül ayında Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Sinirbilim Anabilim Dalı’nda doktora eğitimine, 2013 yılının eylül ayında ise Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Anatomi Anabilim Dalı’nda yüksek lisans eğitimine başlamıştır. 2016 yılında Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Anatomi Anabilim Dalı’nda yüksek lisansını tamamlamıştır. Halen Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Sinirbilim Anabilim Dalı’nda doktora eğitimine devam etmektedir.