TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİNDLİNG UYGULANMIŞ WİSTAR VE GENETİK ABSANS EPİLEPSİLİ SIÇANLARDA NÖROGENEZİN İNCELENMESİ

CANSU KANDEMİR
YÜKSEK LİSANS TEZİ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof.Dr.Serap ŞİRVANCI

2018-İSTANBUL

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Cansu Kandemir

Anabilim Dalı : Histoloji ve Embriyoloji

Tez Sahibi : Cansu KANDEMİR

Tez Başlığı : Kindling Uygulanmış Wister ve Genetik Absans Epilepsili sıçanlarda nörogenezin incelenmesi

Sınav Yeri : Histoloji ve Embriyoloji ABD

Sınav Tarihi : 04.06.2018

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman (Unvan, Adı, Soyadı)	**Kurumu**	**İmza**
Prof. Dr. Serap ŞİRVANCI	Marmara Üniversitesi	
Sınav Jüri Üyeleri (Unvan, Adı, Soyadı		
Doç.Dr.Gözde Erkanlı ŞENTÜRK İ.Ü Cerrahpaşa – Cerrahpaşa Tıp Fakültesi		
Prof. Dr. Feriha ERCAN Marmara Üniversitesi		

Yukarıdaki jüri kararı Enstitü Yönetim Kurulu'nun 07/06/2018 tarih ve 61 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Göksel ŞENER
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

-Sınav evrakları 3 iş günü içinde ıslak imzalı tek kopya halinde Enstitüye teslim edilmelidir.
-Bu form bilgisayar ortamında doldurulacaktır.

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimimin başından beri her konuda sonsuzilgisini ve desteğini gördüğüm, her zaman bilgilerini ve tecrübelerini benimle paylaşan çok sevdiğim değerli danışman hocam, Prof.Dr. Serap Şirvancı'ya,

Eğitimim boyunca her zaman yanımda olan desteklerini ve ilgilerini benden esirgemeyen başta Anabilim Dalı başkanımız Prof.Dr. Feriha Ercan olmak üzere çok kıymetli hocalarım Prof.Dr. Şule Çetinel'e ve Doç.Dr. Dilek Akakın'a,

Tez çalışmam boyunca bilgi ve laboratuvar imkânlarını benimle paylaşan, ilgi destek ve yardımları için değerli Prof.Dr. Filiz Onat'a,

Deneylerimi kendi deneyleriymiş gibi sahiplenerek her konuda bilgilerini benimle paylaşan, büyük ilgi, destek ve yardımlarını gördüğüm sevgili Dr. Melis Yavuz'a, Dr. Özlem Tuğçe Kaya'ya,

Çalışmamın deney ve perfüzyon aşamalarında birlikte çalıştığım Bio. Fatma Bedia Karakaya'ya,

Geçirdiğim tüm bu süre boyunca her zaman ve her konuda sonsuz yardımlarını gördüğüm, gerek manevi destekleri gerekse gösterdikleri içten dostlukla bana güç veren, ailem gibi olan canım arkadaşlarım Uzm.Bio. Ayça Karagöz, Uzm. Bio.Mustafa Kutay Köroğlu,
Uzm.Bio. Damla Anıl, Bio. İrem Hersek, Bio. Büşra Coşkunlu, Dr. Ekin Kuntsal Dertsiz, Dr. Hilal Nişva Levent'e,

Hayatımın her anında yanımda olan, tüm eğitim hayatım boyunca beni sonsuz destekleyen sevgiliaileme,

Desteği, ilgisi ve sonsuz yardımıyla her zorluğu yenmeme yardımcı olan sevgili Korhan Zağralı'ya teşekkür ederim.

Bu tez, Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeler Birimi tarafından SAG-C-YLP-131217-0654 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Haziran 2018

İÇİNDEKİLER **Sayfa No**

1.ÖZET……..... **1**

2.SUMMARY…… **2**

3.GİRİŞ ve AMAÇ…… **3**

4.GENEL BİLGİLER……... **5**

4.1. Hipokampus Anatomisi ve Embriyolojisi…….. 5

4.1.1.Dentat Girus…… 8

4.2.Epilepsi ……..... 9

4.2.1. Epidemiyoloji …….. 9

4.2.2 Mortalite …… 9

4.2.3. Patofizyoloji ……... 10

4.2.4. Deneysel epilepsi modelleri …… 10

4.2.5. Kindling (tutuşma) modeli …… 12

4.2.6. Elektriksel kindling modeli …… 14

4.2.7. PTZ kindling modeli …….. 15

4.2.7.1. PTZ'nin etki mekanizmaları …….. 16

4.3. Nörogenez ……. 18

4.3.1 Hipokampal Nörogenez …….. 19

4.4. Doublecoritn…….. 20

5. Gereç ve Yöntemler…… **22**

5.1. Deney Hayvanları…….. 22

5.2. Deney Grupları …….. 22

5.3.Kimyasal Kindling Uygulaması…… 23

5.4. Işık Mikrokopik Takip ve İmmünfloresan İnceleme …… 24

5.4.1. Perfüzyon Fiksasyonu …….. 24

5.4.2. Işık Mikroskopik Preparasyon ……... 24

5.4.3. İmmünfloresan Boyama ……. 24

5.4.3. İstatistiksel Analiz …… 25

6. BULGULAR …… 26

6.1. Wistar Grubu ……. 26

6.1.1.1.Wistar 7. gün yalancı-opere grubu …….. 26

6.1.1.2.Wistar 14. gün yalancı opere grubu …… 26

6.1.2. Wistar PTZ grubu …… 27

6.1.2.1 Wistar PTZ 7. gün grubu…..... 27

6.1.2.2.Wistar PTZ 14.gün grubu……. 28

6.2. GAERS Grubu…… 29

6.2.1.GAERS yalancı opere grup……. 29

6.2.1.1GAERS yalancı opere 7. gün grubu……..... 29

6.2.1.1 GAERS yalancı opere 14. gün grubu……... 30

6.2.2. GAERS PTZ grubu …….. 30

6.2.2.1.GAERS PTZ 7. gün grubu…… 30

6.2.2.2.GAERS PTZ 14. gün grubu…….. 31

7. TARTIŞMA ve SONUÇ 67

8. Kaynaklar 73

9. Özgeçmiş 84

10. Etik kurul onayı 87

ŞEKİLLER LİSTESİ Sayfa No

Şekil1:İnsan hipokampusu ve deniz atı. **5**

Şekil 2: Erişkin insan beyninde lateral ventrikülün alt koronal bölümünde görülen hipokampusta ilgili yapıların terminolojik analizleri. **7**

RESİMLER LİSTESİ

Sayfa No

Resim 1. PTZ gruplarında 5 kez evre 5 nöbet oluşturmak için uygulanan enjeksiyon sayısı. ****p<0.0001, WPTZ: Wistar PTZ grupları, GPTZ: GAERS PTZ grupları. 32

Resim 2. Wistar 7. gün yalancı-opere grubu. **(a)** DCX pozitif hücre (ok), **(b)** DAPI pozitif hücre çekirdekleri, **(c)** GFAP pozitif hücreler. Orijinal büyütme: x20 33

Resim 3. Wistar 7. gün yalancı-opere grubu. DCX-DAPI-GFAP boyamaları üçlü işaretlenme. Ok: DCX pozitif hücre. Orijinal büyütme: x20 34

Resim 4. Wistar yalancı-opere7. gün grubu. **(a)** DCX pozitif hücre (ok).**(b)** NeuN pozitif hücreler, **(c)** DCX-NeuN ikili boyama görüntüsü. Ok: DCX pozitif hücre. Orijinal büyütme: x20. 35

Resim 5. Wistar yalancı-opere7. gün grubu. **(a)** DCX pozitif hücre (ok başı) ve hücre uzantıları (ok), **(b)** NeuN pozitif hücreler, **(c)** DCX-NeuN ikili işaretlenmede DCX-NeuN pozitif hücre (ok başı), SGZ'de DCX pozitif hücre uzantıları (ok), granüler tabakada DCX pozitif hücre uzantısı (sarı ok başı). Orijinal büyütme: x20. 36

Resim 6. Wistar 14.gün yalancı-opere grubu.**(a)** DCX pozitif hücre (ok) ve damar etrafında DCX pozitif astrosit uzantıları (ok başı), **(b)** DAPI pozitif hücre çekirdekleri,**(c)** Damar etrafında GFAP pozitif astrosit uzantıları (ok). Orijinal büyütme: x20. 37

Resim 7. Wistar 14. gün yalancı-opere grubu. DCX-DAPI-GFAP üçlü işaretlenme. Ok: SGZ'de DCX pozitif hücre. Orijinal büyütme: x20. 38

Resim 8. Wistar 14. gün yalancı-opere grubu. **(a)** DCX pozitif hücre (ok), **(b)** DAPI pozitif hücre çekirdekleri, **(c)** DCX pozitif, NeuN negatif hücre (ok). Orijinal büyütme: x20. 39

Resim 9. Wistar PTZ 7. gün grubu. DCX-GFAP ikili immünfloresan boyama. **(a)** DCX pozitif hücreler (ok),**(b)** DAPI pozitif hücre çekirdekleri, **(c)** GFAP pozitif hücreler. Orijinal büyütme: x20. 40

Resim 10. Wistar PTZ 7. gün grubu. DCX-DAPI-GFAP üçlü işaretleme. DCX pozitif hücre kümesi (ok). Orijinal büyütme: x20. 41

Resim 11. Wistar PTZ 7. gün grubu. DCX-GFAP ikili immünfloresan boyama. **(a)** DCX pozitif hücreler (ok), **(b)** DAPI pozitif hücre çekirdekleri, **(c)** GFAP pozitif hücreler. 42

Orijinal büyütme: x20.

Resim 12. Wistar PTZ 7. gün grubu. DCX-DAPI-GFAP üçlü işaretleme. DCX pozitif hücreler (ok),DCX-GFAP ile ikili işaretlenmiş hücre (ok başı). Orijinal büyütme: x20. 43

Resim 13. Wistar PTZ 7. gün grubu. **(a)** DCX pozitif hücre (ok),**(b)** NeuN pozitif hücreler,**(c)** DCX-NeuN ikili işaretlenen hücre(ok). Orijinal büyütme: x20. 44

Resim 14. WistarPTZ 7. gün grubu. **(a)** DCX pozitif hücreler (ok ve ok başı), **(b)** NeuN pozitif hücreler, **(c)** DCX-NeuN ikili işaretlenen hücre (ok) ve DCX pozitif, NeuN negatif hücre (ok başı). Orijinal büyütme: x20. 45

Resim 15. Wistar PTZ 14. gün grubu. **(a)** DCX pozitif hücre kümesi (ok), **(b)** DAPI pozitif hücre çekirdekleri, **(c)** GFAP pozitif hücre kümesi (ok). Orijinal büyütme: x20. 46

Resim 16. Wistar 14. gün PTZ grubu. DCX-DAPI-GFAP üçlü işaretlenmede DCX-GFAP pozitif hücre kümesi (ok).Orijinal büyütme: x20. 47

Resim 17. Wistar PTZ 14. gün grubu. **(a)** DCX pozitif hücreler(ok), **(b)** DAPI pozitif hücre çekirdekleri, **(c)** GFAP pozitif hücreler. Orijinal büyütme: x20. 48

Resim 18. Wistar 14. gün PTZ grubu. DCX-DAPI-GFAP üçlü işaretleme. SGZ'de DCX pozitif ve hilusta DCX-GFAP pozitif hücreler. Orijinal büyütme: x20. 49

Resim 19. Wistar PTZ 14. gün grubu. **(a)** DCX pozitif hücreler (ok), **(b)** NeuN pozitif hücreler, **(c)** DCX pozitif, NeuN negatif hücreler (ok). Orijinal büyütme: x20 50

Resim 20. WistarPTZ 14. gün grubu. **(a)** DCX pozitif hücreler(ok), **(b)** NeuN pozitif hücreler, **(c)** DCX-NeuN ikili işaretlenen hücreler (ok). Orijinal büyütme: x20. 51

Resim 21. GAERS 7. gün yalancı-opere grubu, DCX-GFAP ikili immünfloresan boyama. **(a)** DCX pozitif hücre kümesi (ok), **(b)** DAPI pozitif hücre çekirdekleri, **(c)** GFAP pozitif hücreler. Orijinal büyütme: x20. 52

Resim22.GAERS 7.gün yalancı-opere grubu,DCX-DAPI-GFAP üçlü işaretlemede DCX pozitif hücre kümesi ve granüler tabaka ile moleküler tabakada bulunan DCX pozitif dendritik uzantılar. Orijinal büyütme x20 53

Resim 23. GAERS 7.gün yalancı-opere grubu, DCX-NeuN ikili immünfloresan boyama.**(a)** DCX pozitif hücre kümesi (ok), **(b)** NeuN pozitif hücre kümesi (ok), **(c)** DCX-NeuN ikili işaretlenen hücre kümesi (ok). Orijinal büyütme x20 54

Resim 24. GAERS 14. gün yalancı-opere grubu, DCX-GFAP ikili immünfloresan boyama. **(a)** DCX pozitif hücreler (ok), **(b)** DAPI pozitif hücre çekirdekleri, **(c)** GFAP pozitif hücreler. Orijinal büyütme: x20. 55

Resim 25. GAERS 14.gün yalancı-opere grubu, DCX-DAPI-GFAP üçlü işaretlenme. SGZ'de DCX pozitif hücreler (ok). Orijinal büyütmex20. 56

Resim 26. GAERS 14.gün yalancı-opere grubu, DCX-NeuN ikili immünfloresan boyama.**(a)** DCX pozitif hücreler (ok), **(b)** NeuN pozitif hücreler (ok), **(c)** HilustaDCX-NeuN ikili işaretlenen hücreler (ok). Orijinal büyütme x20. 57

Resim 27. GAERS 14.gün yalancı-opere grubu, DCX-NeuN ikili immünfloresan boyama.**(a)** DCX pozitif hücre(ok), **(b)** NeuN pozitif hücre (ok), **(c)**SGZ'de DCX-NeuN ikili işaretlenen hücre (ok). Orijinal büyütme x20. 58

Resim 28.GAERS 7. gün PTZ grubu DCX-GFAP ikili immünfloresan boyama. **(a)** DCX pozitif hücre kümeleri (ok), **(b)** DAPI pozitif hücre çekirdekleri, **(c)** GFAP pozitif hücreler. Orijinal büyütme: x20. 59

Resim 29. GAERS 7.gün PTZ grubu, DCX-DAPI-GFAP üçlü işaretlenme. DCX pozitif, GFAP negatif hücre kümeleri (ok). Orijinal büyütme x20. 60

Resim 30.GAERS 7. gün PTZ grubu, DCX-GFAP ikili immünfloresan boyama. **(a)** DCX pozitif hücre kümesi (ok başı) ve hücre uzantısı (ok),**(b)** DAPI pozitif hücre çekirdekleri, **(c)** GFAP pozitif hücreler. Orijinal büyütme: x20. 61

Resim 31.GAERS 7.gün PTZ grubu, DCX-DAPI-GFAP üçlü işaretlenme. Moleküler tabakaya uzanan DCX pozitif, GFAP negatif dendritik uzantı (ok) ve DCX pozitif GFAP negatif hücre kümesi (ok başı). Orijinal büyütme x20. 62

Resim 32. GAERS 7.gün PTZ grubu, DCX-NeuN ikili immünfloresan boyama.**(a)** DCX pozitif hücreler (ok), **(b)** NeuN pozitif hücreler (ok), **(c)** DCX-NeuN ikili işaretlenen hücreler (ok). Orijinal büyütme x20. 63

Resim 33. GAERS 14.gün PTZ grubu, DCX-GFAP ikili immünfloresan boyama. **(a)** DCX pozitif hücre uzantıları (ok) ve hücreler (ok). Sarı ok başı: Resim c'de işaretlenen GFAP pozitif ve DCX pozitif hücre uzantısı.**(b)** DAPI pozitif hücre çekirdekleri, **(c)** GFAP pozitif hücreler (beyaz ok başı). Sarı ok başı: GFAP pozitif hücre uzantısı. Orijinal büyütme: x20. 64

Resim 34.GAERS 14.gün PTZ grubu, DCX-DAPI-GFAP üçlü işaretlenme. Moleküler tabakaya uzanan DCX pozitif ve GFAP negatif dendritik uzantı (ok), DCX ve GFAP ikili işaretlenen hücreler (beyaz ok başı) ve DCX-GFAP ikili işaretlenen hücre uzantıları (sarı ok başı). Orijinal büyütme x20. 65

Resim35. GAERS 14. gün PTZ grubu, DCX-NeuN ikili immünfloresan boyama. **(a)** DCX pozitif hücre kümesi (ok) ve hücre uzantısı (sarı ok başı). Beyaz ok başı: Resim c'de DCX ve NeuN ikili işaretlenen DCX pozitif hücre. **(b)** NeuN pozitif hücre kümesi (ok) ve hücre (ok başı). **(c)** Sitoplazmada DCX-NeuN ikili işaretlenen hücre (beyaz ok başı). Sarı ok başı: Moleküler tabakaya uzanan DCX pozitif, NeuN negatif hücre uzantısı, ok: DCX pozitif, NeuN negatif hücre kümesi. Orijinal büyütme x20. 66

KISALTMALAR

AMPA:α-amino-3-hidroksi-5-metilosokzasole- 4-propionat

AEİ: Antiepleptik ilaç

CA: Cornu Ammonis

DCX: Doublecortin

DG: Dentat Girus

DEHAMER: Deney Hayvanları Araştırma Merkezi

DAPI: 4',6-Diamidino-2-phenylindole dihidroklorid

EEG: Elektroensefalografi

GAERS: Genetik absans epilepsili sıçanlar – Strazburg

GABA: Gama-aminobütirik asit

GFAP: Glial fibriller asidik protein

GluR2: Glutamat reseptörü 2

GluR3: Glutamat reseptörü 3

ILAE: Uluslararası epilepsi ile savaş derneği

MSS: Merkezi sinir sistemi

MES: Maksimal elektroşok

NKH: Nöral Kök Hücre

NeuN: Nöronal nüklear antijen

NMDA: N-metil-D-aspartat

MSS: Merkezi sinir sistemi

PTZ: Pentilentetrazol

SVZ: Subventriküler zon

SGZ: Subgranüler zon

TLE: Temporal lob epilepsisi

TABLOLAR LİSTESİ SAYFA NO

Tablo 1. Çalışmada kullanılan deney grupları ve hayvan sayıları. **21**

1.ÖZET

Kindling Uygulanmış Wistar ve Genetik Absans Epilepsili Sıçanlarda Nörogenezin İncelenmesi

Cansu Kandemir
Prof.Dr. Serap Şirvancı
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Amaç: Dünyada yaklaşık 50 milyon kişiyi etkileyen epilepsinin en sık görülen tipi temporal lob epilepsisidir (TLE). Hayvanlarda uygulanan kimyasal ve elektriksel kindling yöntemleriile TLE modeli oluşturulabilmektedir. Bu çalışmada pentilentetrazol (PTZ) uygulanmış erişkin Wistar ve GAERS sıçanların hipokampusunda immünfloresan yöntemlerle nörogenezin incelenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem:250-300 gr ağırlığında erişkin Wistar ve GAERS albino suşu sıçanlara kimyasal kindling oluşturmak amacıyla gün aşırı subkutan yol ile PTZ (35 mg/kg) uygulandı. Ardı ardına 5 kez evre 5 nöbet geçiren hayvanlar kindled olarak kabul edildi. Son evre 5 nöbetten sonra 7. ve 14. günlerde derin anestezi altında intrakardiyak perfüzyon fiksasyonu yapıldı.İmmünfloresan metodlarla yeni oluşan nöronları göstermek amacıyla anti-doublecortin (DCX), astroglial hücreleri göstermek için anti-glial fibriller asidik protein (GFAP), olgun nöronları göstermek için anti-nöronal nüklear antijen (NeuN)primer antikorlarıyla boyamalar yapıldı ve kesitler floresan mikroskobunda incelendi.

Bulgular ve Sonuç: GAERS kontrol grubunda Wistar kontrol grubuna göre, Wistar PTZ gruplarında kendi kontrollerine göre daha fazla DCX pozitif hücre olduğu saptandı. Bu çalışmanın bulguları GAERS sıçanların daha önceki çalışmalarda saptanan elektriksel kindlinge olan dirençlerinin nörogenez artışıyla ilişkili olabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: Doublecortin, hipokampus, kindling, nörogenez

2.SUMMARY

Investigation of Neurogenesis in Kindled Wistar and Genetic Absence Epileptic Rats

Cansu Kandemir

Prof. Dr. Serap Şirvancı

Department of Histology and Embriyology

Aim: The most common type of epilepsy affecting about 50 million people worldwide is temporal lobe epilepsy (TLE). Chemical and electrical kindling methods in animals can be used to form TLE model. In the present study, it was aimed to investigate neurogenesis in the hippocampus of adult kindled Wistar and GAERS rats by immunofluorescence methods.

Materials and Method: Adult Wistar and GAERS albino rats weighing 250-300 gr were injected PTZ (35 mg/kg) subcutaneously every other day to produce chemical kindling. Animals having 5 times grade 5 seizures were considered to be kindled. Intracardiac perfusion was performed under deep anesthesia on the 7th and 14th days after the last grade 5 seizure. Immunofluorescence methods were used to demonstrate newly formed neurons, astroglial cells, and mature neurons, by usinganti-doublecortin (DCX),anti-glial fibrillary acidic protein (GFAP), and anti-neuronal nuclear antigen (NeuN)primary antibodies, respectively. Sectons were then examined under fluorescence microscope.

Results and Conclusion: DCX positive cells were found to be increased in GAERS control group compared to the Wistar control group; and in Wistar PTZ group compared to the Wistar control group. The findings of the present study suggest that the resistance to electrical kindling of GAERS reported in previous studies might be related to the increased neurogenesis in this strain.

Key Words: Doublecortin, hippocampus, kindling, neurogenesis

3.GİRİŞ ve AMAÇ

Genetik absans epilepsili sıçanlar (Genetic Absence Epilepsy Rats from Strasbourg,GAERS) absans epilepsinin iyi bilinen bir genetik modelidir. 1980'li yılların başlarında Strazburg'da araştırmacılar kontrol Wistar sıçanlarda EEG kaydı yaparken, hayvanların yaklaşık %30'unda kortekste bilateral senkronize, spontan diken-dalga deşarjları olduğunu saptamışlar ve kendi aralarında çiftleştirerek ürettikleri bu suşa GAERS adını vermişlerdir(Kruba ve ark., 2009).

Dünyada yaklaşık 50 milyon kişiyi etkileyen epilepsinin en sık görülen tipi temporal lob epilepsidir (TLE) (Engel ve ark., 2001; Meldrum ve ark., 1994). Nonkonvülzif nöbetlerin aksine, spontan rekürran jeneralize konvülzif nöbetlerin patogenezinde glutamat ile yönlendirilen eksitatör sinaptik mekanizmalar rol oynamaktadır (Bertram ve ark.,2009). Hayvanlarda uygulanan kimyasal kindling (kainik asit, pilokarpin, pentilentetrazol, vb.) ve elektriksel kindling yolu ile TLE modeli oluşturulabilmektedir (Geller ve ark., 1995).

Aynı hastada idiyopatik jeneralize absans ve parsiyel TLE seyrek görülmektedir (Koutroumanidis ve ark., 1999; Eşkazan ve ark., 2002). Bunun nedeni tam olarak anlaşılamamıştır. Eşkazan ve ark. çalışmalarında Wistar kontrollerin 5. derece nöbet geçirmelerine rağmen, GAERS suşu sıçanların ancak 2. derece nöbet geçirdiğini gözlemişlerdir (Eşkazan ve ark., 2002). Aynı çalışmada jeneralize absans nöbetlerinin altta yatan mekanizmalarının limbik nöbetlerin sekonder jeneralizasyonuna direncin sorumlusu olabileceği öne sürülmüştür.

Yetişkin beyninde nörogenez iki ana bölgede meydana gelir. Bunlardan biri subventriküler zon (SVZ), diğeri ise hipokampusun dentat girus (DG) subgranüler zonudur (SGZ) (Altman ve ark.,1969). Yapılan çalışmalarda göç eden hücrelerin hipokampal döngüye entegre oldukları ve olgun, fonksiyonel nöronlar haline geldikleri gösterilmiştir (Praag ve ark., 2002; Parent ve ark.,2006). Nörogenez sonucu oluşan hücrelerin astrositlere de farklandığı bildirilmiştir (Cameron ve ark., 2001). Son yıllarda anormal hipokampal nörogenezin TLE patofizyolojisinde önemli rol oynadığı belirtilmiştir (Avanzini ve ark., 2003; Scharfman ve ark., 2002;

Bengzon ve ark., 1997). Epileptik nöbetlerin seçici hücre ölümüne neden olarak, nörogenezi etkilediğini göstermiştir. Akut nöbetlerin veya limbik epileptogenezin hayvan deneylerinde, nörogenezin uyarıldığı görülmüştür (Cameron ve ark., 2001; Clark ve ark., 2010). Nöbetler nörogenezi etkileyerek bazı nörojenik hücrelerin göçüne de neden olmaktadır (Cameron ve ark., 2001). Çalışmalar anormal hücre göçü yapan bu nöronların epileptojenik hipokampal döngüyü tetiklemede rol oynadığını göstermiştir (Avanzini ve ark.,2003). Kindling uygulanmış hayvanlarda DGSGZ'de önemli derecede yeni hücre/nöron oluşumu belirlenmiştir (Avanzinive ark., 2003; Clark ve ark.,2010).

Bu çalışmada kindling uygulanmış GAERS ve WİSTAR albino suşu sıçanlarda nörogenez varlığı ışık miroskopik yöntemlerle incelenmiştir.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Hipokampus Anatomisi ve Embriyolojisi

Hipokampusun ilk tanımı 1587'de Arantius tarafından yazılmış olup, temporal boynuzun tabanındaki çıkıntıyı Latince deniz atı anlamına gelen "hipokampus"a benzetmiştir (Henry, D., ed. The Human Hipocampus,3. baskı) (Şekil 1). Hipokampus, hipokampal oluşumu içeren beyin bölgelerine işlevsel olarak bağlıdır.



Şekil 1. İnsan hipokampusu ve deniz atı (Laszlo Serez, 1980).

Hipokampus dentat girus (DG) ve Cornu Ammonis (CA) içeren bölgelere ayrılmıştır. DG fasya dentata ve hilusu içerir; CA ise histolojik farklılıklar gösteren CA1, CA2 ve CA3 alt bölgelerine ayrılır. Hipokampal oluşumun diğer bölgeleri subikulum, presubikulum, parasubikulum ve entorinal korteksi içerir (Manns ve ark.,2007). Hipokampal formasyon; DG, hipokampus ve subikulumun oluşturduğu

parahipokampal girus tarafından çevrelenen temel limbik sistem bölgeleriyle sayısız indirekt bağlantılar gösteren, pirimitif bir kortikal yapıdır. Bu bağlantılar sayesinde hipokampus, dikkat, uyanıklık, kısa dönem hafıza, davranış ve endokrin fonksiyonlar üzerinde önemli roller oynar; bilgileri işleme ve yer yön ile ilişkilidir (Afifi A.K. ve Bergman R.A., Functional Neuroanatomy, Text and Atlas. 2. baskı,2005; Khalaf-Nazzal ve Francis, 2013). Öğrenme süreci bilginin kısa dönem belleğe kaydedilmesi ile başlar. Bilginin kalıcı hale getirilebilmesi için uzun dönem belleğe işlenmeleri gerekir (Tulving E., 2002). Hipokampal gelişim sırasında, CA1'den CA3'e morfolojik ve moleküler geçiş, bir büyük piramidal hücre tipinden diğerine bir değişiklikle işaretlenir (Wyszynski ve ark., 1997).

Hipokampus telensefalonun dorso-medyal bölgesinde oluşur. Dorsal orta hat bölgesi, telensefalik vezikülleri oluşturmak üzere invaze olur. Kortikal hem ve koroid pleksus, ortaya çıkan medyal duvarda oluşan iki önemli yapıdır(Subramanian ve Tole,2009). Telensefalik yapıları çevreleyen nöroepitelyum kortikal hem bölgesini karakterize eder ve telensefalik pronöral 1 ve 2 gibi genleri eksprese eder (Sommer ve ark., 1996; Imayoshi ve ark., 2008).

Hipokampusun mikroskobik yapısı incelendiğinde, ventriküler yüzeyden derine doğru toplam yedi tabakadan meydana geldiği görülür (Şekil 2).

Alveus hipokampi

Alveus, hipokampusta afferent ve efferent liflerin subependimal tabakasıdır.

1. Stratum oriens

Stratum oriens, hipokampusa giren ve çıkan liflerin aksonları ve kollateral dalları ile birleşir; bitişik tabakanın büyük piramidal hücreleri bazal dendritlerden bazılarına nüfuz eder ve bazıları basket hücresi olarak adlandırılan nispeten küçük, düzensiz şekilli nöronların hücre dendritlerini içerir.

2. Stratum piramidalis

Bu katmanda piramidal hücrelerin bazal dendritleri ve internöronlar yerleşmiştir. Hücre aksonlarının çoğu bu tabakada bulunan alveus liflerine katılırken, bir kısmı da en derinde yer alan moleküler tabakaya uzanmaktadır.

3. Stratum lusidum

Bu tabaka sadece CA3 alanında bulunan, yosunsu liflerden (mossy lifleri) zengindir. Bu lifler piramidal hücreler ile bağlantıyı sağlar.

4. Stratum radiatum

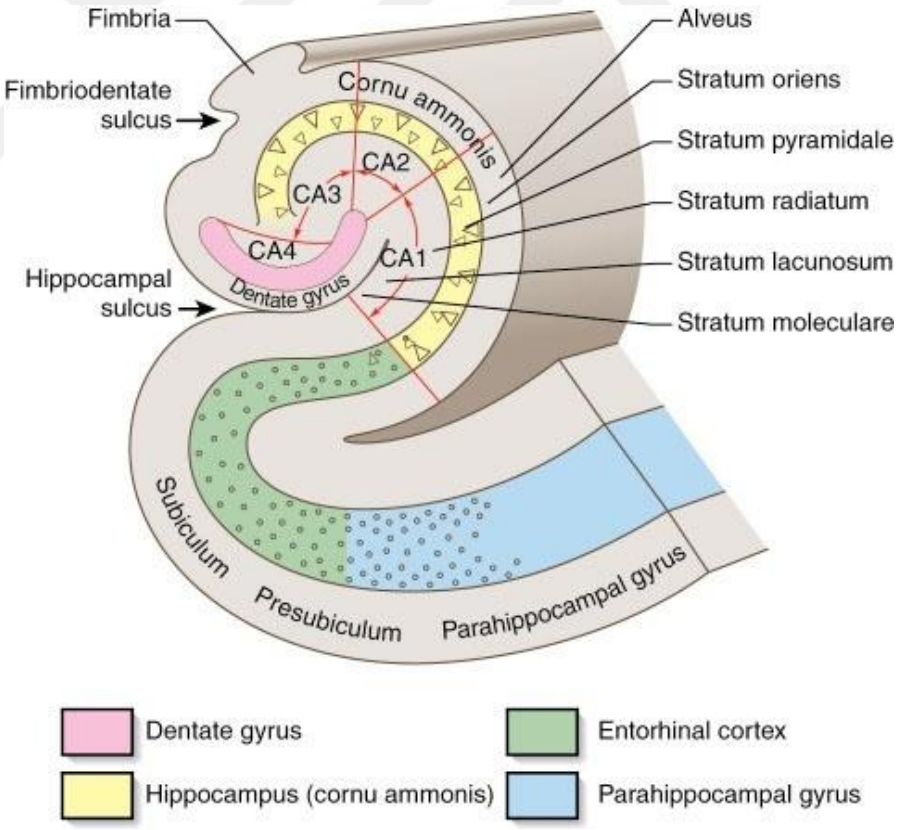
Bu tabaka ışınsal dallara sahip geniş bir ağ yapısındadır.

6.Stratum lakunozum

Area entorinalisten gelen önemli afferent liflerin sonlandığı tabakadır (Peter ve Roger, 1980).

7. Stratum molekülare

Hipokampusun son üç tabakası "stratum molekülare" adı altında tek bir katman olarak da kabul edilmektedir. Çok az miktarda nöron ve sinir lifi içermektedir. Bazı kaynaklarda ise son iki tabaka "stratum lakünozum-molekülare" ismiyle ifade edilmektedir(Vida ve Frotscher, 2000).



Şekil 2. Erişkin insan beyninde lateral ventrikülün alt koronal bölümünde görülen hipokampusta ilgili yapıların ve ana topografik bölgelerin terminolojilerinin analizi (Peter ve Roger,1980)

4.1.1. Dentat girus

DG, ‘V’ ya da ‘U’ şekli ile tanınan, yetişkin beyninde devam eden nöron üretiminin iki bölgesinden biridir. DG nörogenezi granül hücre tabakası, hilus ve SGZ sınırında özel bir kök hücre nişi tarafından düzenlenir (Kempermann ve ark., 2004). DG'deki erişkin nöral kök hücreler,subpallium bölgesinde bulunan embriyonik germinal zondaki kök hücrelerden üretilir(Rolando ve Taylor, 2014). Bu hücrelerin hilusa ulaşıp granül hücre tabakasına girmeye başlamaları oluştuktan yaklaşık 72 saat sonra olur ve 92 saat sonra da bu tabakaya yerleşmiş olurlar (Nakahira ve Yuasa, 2005).

Hipokampal sulkustan derine uzandığı kadarı ile DG, 3 tabakalı kortikal bir yapı olarak değerlendirilir. Bu katmanlar şunlardır:

1-Süperfisial moleküler katman

2-Orta granüler katman

3-Derin polimorfik katman

Komşu nöronlar bazı hipokampal ekstrinsik kaynaklardan sinaptik terminaller alır. Diğerleri daha uzun aksonlara sahiptir ve fimbriadaki efferent lifler ile kollaterallerin dallarını verdikten sonra birleşirler. Bazı hücreler ise Golgi tip2 nöronlardır. Granüler katmandaki birçok hücreden köken alanlar ise yosunsu lifler olarak bilinirler(Peter ve Roger,1980).

4.2. Epilepsi

Epilepsi, epileptik nöbetler ile ilişkili bilişsel, psikolojik ve sosyal etkileri olan, kalıcı bir yatkınlık ile karakterize nörolojik bir bozukluktur (ILAE, 2014). Epileptik nöbet beyinde anormal, aşırı veya senkronize nöral aktiviteden kaynaklanan kısa süreli davranış değişiklikleri olarak tanımlanır(Devinsky ve ark., 2018).

ILAE'nin sınıflandırmasına göre (2017) nöbet başlangıcı fokal (anormal nöronal aktivite bir veya daha fazla lokalize beyin bölgesinde veya hemisferde ortaya çıkar), jeneralize (anormal nöronal aktivite her iki hemisfer üzerinde yaygın bir dağılımda başladığı zaman) veya bilinmeyen başlangıçta (eğer mevcut klinik ve laboratuvar verileri yoksa) olabilir (Devinsky ve ark., 2018).

4.2.1. Epidemiyoloji

Epilepsi dünya çapında 65 milyon insanı etkilemektedir (Ngugi ve ark., 2010). İnsanların yaklaşık %10'u hayatları boyunca bir kez nöbet geçirebilirler (Hauser ve Beghi, 2008). Uluslararası çalışmaların meta-analizine göre, epilepsi prevalansı 1000 kişi başına 6.4 vakadır ve yıllık insidans 100,000 kişi/yıl başına 67.8 vakadır (Hauser ve Beghi, 2008).

4.2.2. Mortalite

Epilepsi, nöbetlerin doğrudan etkilerinden (örneğin, epilepside ani beklenmedik ölüm, status epileptikus, boğulma, motorlu taşıt kazaları, düşmeler ve yanıklar) veya nöbetlerin dolaylı etkilerinden (örneğin aspirasyon pnömonisi) ölümcül olabilmektedir (Devinsky ve ark., 2016).

4.2.3. Patofizyoloji

Epilepsinin patofizyolojisi ile ilgili çoğu çalışma, insan epilepsisini veya insan beyin örneklerini ve EEG'si çekilen hayvan modellerini kullanmaktadır. Epileptogenez çalışmaları, aktif bir epileptik duruma yol açan patogenetik olayların neden olduğu hücresel ve moleküler değişikliklere odaklanır.Bu olaylar beyin yaralanmaları ve genetik değişiklikleri de içerebilir.

4.2.4. Deneysel epilepsi modelleri

Değişik hayvan modelleri sayesinde insanlarda görülen farklı epilepsi biçimleri oluşturulabilmektedir. Örneğin PTZ ile uyarılmış konvülziyonlar, petit mal ya da absans nöbetleri taklit ederken, maksimal elektroşok (MES) ile uyarılmış nöbetler tonik-klonik nöbetlerepilepsisini ortaya koymaktadır. Bu hayvan modellerinde ölçülen parametreler, bu modellerin, farklı evrelerde konvülziyonları ve farklı nöbet sürelerini ortaya çıkardığını göstermektedir (Dhir, 2012).Bu evrelerin eşik değerlerini değiştiren moleküller (bunların antiepileptik olduğu düşünülmektedir), 1993'ten bu yana tanıtılan ikinci jenerasyon tüm antiepileptik ilaçların (AEİ) geliştirilmesinde önemli rol oynamaktadır ve epilepsi hastalarında nöbetin kontrolüne katkı sağlamaktadır (White, 2003).

Deneysel epilepsi modelleri akut modeller ve kronik modeller olmak üzere iki grupta toplanabilir. Akut modeller tepkisel epileptik nöbet modelleridir. Konvülzan maddelerin sistemik ya da topikal uygulanmasıyla veya elektriksel uyarım gibi ani biçimde gelişen nöbetlerden oluşur. Akut modeller, epileptik nöbet gelişimi, sürdürülmesi ve bitişi hakkında, ayrıca nöbet sonrası bozukluklar hakkında bilgi edinmek istenildiğinde tercih edilen epilepsi modelleridir. Akut modellerin dezavantajları şunlardır: Nöbetler normal, sağlıklı beynin yapay olarak uyarılmasıyla oluşturulduğu için spontan nöbet oluşum mekanizmaları (iktogenez) veya nöbetler arası epileptojenik anomalileri (interiktal) araştırmak için uygun değildirler. Kronik modeller ise nöbetler arası epileptojenik anomalilerin sürekli incelenebilmesine ve epilepsinin tanımlanmasına olanak sağlayan modellerdir. Kronik modeller epilepsi gelişimi (epileptogenez), interiktal dönemdeki nöronal

düzensizlikler ve spontan iktogenez hakkında araştırmacıya fikir sunan modellerdir (Engel, 2013).

Deneysel epilepsinin hayvan modelleri üç gruba ayrılmaktadır:

I. Konvülzan kimyasal maddeler veya elektrik akımıyla oluşturulanlar

II. Refleks epilepsi modelleri

III. İdiyopatik modeller

Model seçimi çalışmanın amacına göre yapılmaktadır. Genellikle deneysel epilepsi çalışmaları üç amaçla yapılır:

I. İlaç geliştirme

II. Mekanizmayı aydınlatma

III. Temel olaylar arasındaki ilişkileri ve olayların gelişimini belirleme (Marangoz, 1997).

Tüm kriterleri karşılayacak tek bir model maalesef bulunmamaktadır. İdeal bir epilepsi modeli şu özelliklere sahip olmalıdır:

- Spontan olarak tekrarlayan nöbetleri olmalı
- Nöbetler insan epilepsisindekine benzemeli
- Modeldeki EEG'nin biçimi, ilgili epilepsi çeşidindekine benzemeli
- Nöbetlerin frekansı ilaçların etkisini akut veya kronik olarak test etmeye yetecek ölçüde olmalı
- Antiepileptik ilaçların farmakokinetiği insandakine benzer olmalı
- Antiepileptiklerin etkili oldukları plazma ve beyin seviyeleri insanda ilgili nöbeti önleyen seviye kadar olmalı (Marangoz, 1997).

Epilepsi ve nöbet için oluşturulan hayvan modelleri epileptogenezin altında yatan temel mekanizmaları kavrayışımızı ilerleten temel bir rol oynamasının yanı sıra bu modeller, yeni antiepileptik ilaçların geliştirilmesi ve keşfinde de faydalıdırlar (Löscher, 2011). Yeni antiepileptik ilaçların gelişimi ve keşfinde nöbet ve epilepsinin hayvan modelleri çeşitli amaçlara hizmet etmektedir:

• Yeni AEİ'lerin keşfi

• Yeni AEİ'lerin antikonvülzan aktivitelerinin spektrumunun tanımlanması

• İlaca dirençli nöbetler için spesifik modeller

• Yeni AEİ'lerin etkinliğinin kronik tedavi sürecinde değişip değişmediğinin değerlendirilmesi

• Yeni AEİ'lerin olumsuz etkilerinin epileptik ve epileptik olmayan hayvanlarda karşılaştırılması

• İlk klinik araştırmalar için yeni AEİ'lerin etkin plazma konsantrasyonlarının yorumlanması

• Antiepileptojenik veya hastalığı hafifleten tedavilerin keşfi (Löscher, 2011).

Bu amaçla yapılan çalışmalarda en az üç önemli hedef bulunmaktadır:

I. Epilepsiye yol açan süreçlerin temelinde yatan mekanizmaları daha iyi anlamak, bu sayede epilepsi için risk grubunda olan hastaları koruyucu tedaviler oluşturmak
II. İlaca karşı direncin biyolojik mekanizmasını kavrayışımızı geliştirmek ve bu sayede dirence karşı korunma sağlayan ya da süreci tersine çeviren ilaçlar geliştirmek
III. Epilepsinin ilerlemesini engelleyici, hastalığı hafifletici tedaviler geliştirmek

Yukarıda açıklanan bütün bu amaçlara ulaşmak için, epilepsinin hayvan modelleri en önemli ön koşuldur (Löscher, 2002)

4.2.5. Kindling (tutuşma) modeli

Kindling elektriksel ya da kimyasal subkonvülzif uyaranların tekrar tekrar uygulanmasıyla, konvülziyon aktivitesinde progresif yoğunlaşma ile sonuçlanan bir fenomendir. Kindling deneysel bir epilepsi modeli olmasının yanı sıra, beynin "patolojik bir plastisite" modeli olarak da tanımlanmaktadır (Pavlova ve ark., 2004). Kindling, tekrarlayan fokal nöbet deşarjlarının uyarılması sonucu, uyaran ajana (genellikle elektriksel stimulasyon) karşı verilen epileptik yanıtta ilerleyen,

büyük ölçüde güvenilir, daimi artış oluşturan bir fenomendir (Morimoto ve ark., 2004).

Deney hayvanında uyaran, jeneralize konvülziyon oluşturuyor ise kindling tamamlanmış ve bundan sonra bu anormal uyarılabilir durum kalıcı hale gelmiş demektir (Erdoğan ve ark., 2006). Kindling modeli psikomotor epilepsiye benzer. Beyinde büyük bir nöron topluluğu birlikte ve anormal biçimde deşarj yapmaya başlayınca epileptik nöbetler görülür (Marangoz, 1997).

Kindling, elektriksel veya kimyasal olarak oluşturulabilmektedir. Elektriksel kindling kompleks parsiyel epilepsi modeli olarak kabul edilirken, kimyasal kindling ise primer jeneralize epilepsi modeli olarak kabul edilmektedir (Shandra ve Godlevsky, 2005). Örneğin, PTZ ile uyarılmış konvülziyonlar absans nöbetleri taklit ederken, MES ile indüklenmiş nöbetler, insan grand mal tipi epilepsiyi (tonik, klonik nöbetler) betimler (Dhir, 2012).

Kindling modeli, Goddard tarafından 1967'de (Goddard, 1967) keşfedildiğinden bu yana TLE'nin kronik bir hayvan modeli olarak yaygın biçimde kullanılmaktadır. Goddard, sıçanlarda yaptığı çalışmada beyinde farklı subkortikal bölgelere bipolar elektrotları implante ederek, değişken akım şiddetleri ile bu bölgeleri uyarmıştır. Goddard başta yaptığı sub-konvülzif uyarılara yanıt olarak herhangi bir davranışsal ya da elektrografik yanıt alamazken, bu subkonvülzif dozları tekrarlayarak sıçanlara uyguladığında,belirli uyarılardan sonra tam gelişmiş konvülziyonlar oluştuğunu bulmuştur.Ayrıca, kindlingin beyinde oluşturduğu kalıcı değişiklikler sayesinde, bir defa tutuşma aşamasına gelmiş hayvanlara, aylarca subkonvülzif uyarı vermeden bekledikten sonra bile, tekrar subkonvülzif uyarı sonucu hayvanların hâlâ tutuşma gösterebildiklerini tespit etmiştir. Goddard beyindeki bu tür progresif değişiklikler için "kindling" (tutuşma) tanımını üretmiştir. Farklı beyin bölgelerinin elektriksel uyarılara farklı yanıtlar ürettiğini de (amigdala gibi bazı bölgelerin diğerlerine göre uyarıya çok daha hassas olduğunu) göstermiştir (Dhir, 2012).Birkaç istisna hariç, kindling genellikle, diğer birçok epilepsi modelinde de görüldüğü üzere büyük morfolojik hasar yokluğunda nöronal yanıtta değişimin geliştiği bir fonksiyonel epilepsi modeli olarak kabul

edilmektedir. Epilepsi mekanizmalarının araştırılmasına, uygulanmasına ek olarak, kindling antiepileptik ilaçların preklinik değerlendirilmesi için de kullanılmaktadır (Morimoto ve ark., 2004).

Kindlingin erken aşamalarında tek davranışsal yanıt, iktal deşarj süresince bir donma yanıtıdır. Tekrarlanan aktivasyonla, nöbet yanıtı jeneralize hale gelir ve bilateral klonik nöbete dönüşür ve bu aşama tipik olarak evre 5 olarak adlandırılır. Bir kez jeneralize kindling nöbetleri oluşturulduğunda (evre 5), bu değişimler aylar, hatta yıllarca devam eder (Morimoto ve ark.,2004).Kimyasal kindling belli kimyasal konvülzan maddelerin sistemik olarak uygulanmasını gerektirir. Farklı konvülzan maddeler; örneğin $GABA_A$ reseptör antagonistleri (PTZ, pikrotoksin ve bikukulin) ve N-metil-D-aspartat kemirgenlerde kimyasal kindling oluşturmak için kullanılabilir. Bu modeller arasında PTZ ile oluşturulan kindling, yeni antiepileptik moleküllerin etkilerini çalışmak için yaygın biçimde kullanılan bir hayvan modelidir (Dhir, 2012).

Kimyasal kindling modelinin avantajları aşağıdaki şekilde sıralanabilir:

- Kimyasal kindling elektriksele göre daha kolaydır ve daha az zaman alır.
- Beyin cerrahisi gerektirmez (Dhir, 2012).
- Elektrotların beyne implante edilmesini gerektirmez.
- Laboratuvar donanımını oluşturmak kolaydır.
- Kindling protokolü, laboratuvarlar ve türler arasında kolaylıkla tekrarlanabilen bir protokoldür.
- Mortalite oranı düşüktür ve hayvanların büyük bir bölümü jeneralize motor nöbetleri sürdürürler (Pitkanen ve ark., 2005).
- PTZ kindling de elektriksel kindling gibi kompleks parsiyel epilepsi hastalığının bir modelidir (Ali ve ark., 2005).

4.2.6. Elektriksel kindling modeli

Maksimal elektroşok testi 60 yıl önce Toman ve arkadaşlarınca geliştirilmiştir. Grand mal tipi jeneralize tonik klonik nöbetlere karşı etkin ilaçları öngörmede muhtemelen en iyi doğrulanmış klinik öncesi testtir. Bu test bir maddenin, nöral dokuya nöbet yayılımını engelleme yeteneğinin değerlendirilmesine olanak sağlar (Castel-Branco ve ark., 2009).

Kindling, amigdala veya hipokampus gibi limbik beyin bölgelerine tekrar tekrar kısa elektriksel stimulasyonlar sonucunda oluşan elektrografik ve davranışsal nöbet aktivitesinde ilerleyici bir artıştır. Bu nöbetlerin farmakolojisi ve kompleks parsiyel ve ikincil jeneralize klinik fenomenolojisi TLE'nin klinik durumuna oldukça benzerdir ve bu nedenle yaygın bir biçimde TLE modeli olarak kullanılmaktadır (Löscher, 2002).

4.2.7. PTZ kindling modeli

PTZ, bir $GABA_A$ reseptör antagonistidir (Park ve ark., 2006). PTZ, $GABA_A$ reseptörünün klorid iyonofor kompleksinin seçici bir engelleyicisidir. Hipokampusun da dahil olduğu birçok beyin bölgesinde GABAerjik ve glutamaterjik sistemleri etkiler (Patsoukis ve ark., 2004).

PTZ kindling, nöbet oluşum mekanizmasını ve nöbetlerin nörodavranışsal ve nörofizyolojik sonuçlarını araştırmak için sıklıkla kullanılmaktadır (Shandra ve Godlevsky, 2005). Sıçanlarda PTZ uygulaması, beyin uyarılabilirliği çalışmalarına (Klioueva ve ark., 2001) uygun olmasının yanı sıra, antiepileptik ilaç geliştirmek için de yaygın olarak kullanılan davranışçı yaklaşımlardan biridir (Löscher, 2002). PTZ kindling, insan absans epilepsi ve jeneralize tonik klonik (birinci jeneralize) nöbet modellerini oluşturur (Wu ve ark., 2006).

Kindling, beyinde nörokimyasal ve uzun dönem yapısal değişimleri araştırmak için kullanılan en önemli epilepsi modellerinden biri haline gelmiştir

(Akdoğan ve Yonguç, 2011). PTZ kindling, TLE'nin kronik hayvan modeli (Morimoto ve ark., 2004), ilaca karşı dirençli epilepsi modeli (Ali ve ark., 2005) ve kompleks parsiyel epilepsinin çok önemli bir modeli olarak karşımıza çıkmaktadır (Marangoz, 1997).

Standart PTZ kindling modeli, davranışsal ve elektrofizyolojik deneyler yapılacaksa elektrotların implantını gerektirirken; davranışsal ve moleküler deneyler yapılacaksa elektrot implantını gerektirmemektedir (Davoudi ve ark., 2013).

PTZ hem akut hem de kronik (kindling) epilepsi hayvan modeli geliştirmek için kullanılabilir. Örneğin, kemirgenlerde PTZ'nin eşik dozda (60-100 mg/kg, i.p. veya s.c.) akut enjeksiyonu ile miyoklonik jerkler ve tonik ekstansiyon ortaya çıkar. Ancak, PTZ'nin eşik altı dozlarda (20-35 mg/kg, i.p.) tekrarlanarak uygulanması kindling fenomenini oluşturabilir (Dhir, 2012).TLE'li hastaların hipokampal nöronlarında siklin B1 ekspresyonu tanımlandığından bu yana, PTZ kindlingin nöbetle indüklenen nöronal ölüm mekanizmalarını çalışmak için uygun bir model olduğu bildirilmiştir (Pavlova ve ark., 2006). PTZ ile indüklenen kimyasal kindling, primer jeneralize epilepsimodelini oluşturur (Akdoğan ve Yonguç., 2011).

PTZ kindling modeli ile kindling gerçekleştikten sonra;

- Duygusal davranışlarda değişim
- Bilişsel düzensizlikler,
- Hipokampusta nöronal kayıp gösterilmiştir (Pavlova ve ark., 2006).

4.2.7.1. PTZ'nin etki mekanizması

PTZ ile indüklenen kindlingde çeşitli davranışsal, nörofizyolojik ve nörokimyasal değişiklikler oluşur (Schröder ve ark., 1998). PTZ uygulaması sıçanlarda hipokampal atrofiye yol açmaktadır. PTZ uygulanmış sıçanlarda hipokampusta seçici nöronal kayıp ve astositoz görülür. Ayrıca PTZ uygulanmış sıçanlar üzerine yapılan manyetik rezonans görüntüleme çalışmalarında, serebellum hacminde azalma görülmektedir (Akdoğan ve Yonguç, 2011).

PTZ'nin, $GABA_A$ reseptörlerini bloke ederek etkisini gösterdiği ileri sürülmektedir. PTZ tarafından üretilen kindlingin, beyinde GABAerjik sistemin inhibitör fonksiyonunda kalıcı bir azalmayla ilişkili olabileceği bildirilmektedir (Corda, 1991). Tekrarlanan tek doz uygulamaları, GABAerjik aktivitenin azalmasına neden olur. PTZ'nin, GABA tarafından aktive edilen kanalları inhibe ederek (Macdonald ve Barker, 1978) özellikle $GABA_A$ kapılı klorid reseptörlerini bloke ederek etkinliğini gösterdiği düşünülmektedir (Corda, 1992; Luthman ve Humpel, 1997). Böylece PTZ uygulaması, GABA ve diğer bazı inhibitör nörotransmitterlerin etkisini inhibe ederek, nöronların depolarizasyonunu kolaylaştırmaktadır (Velisek ve ark., 1990).

$GABA_A$ reseptörleri çeşitli allosterik bağlanma bölgelerine sahiptir. Çeşitli ilaçlar bu bağlanma bölgeleri üzerinden GABA aracılı Cl- akımını ayarlayabilirler. PTZ, bir merkezi sinir sistemi konvülzanıdır ve pikrotoksinin (PTX), $GABA_A$ reseptörüne bağlandığı bölgeye bağlanarak etkinliğini gerçekleştirmektedir (Huang ve ark.,2001). Ayrıca PTZ ile tutuşma sağlanmış sıçanlarda, GABAerjik nörotransmisyon inhibitörlerinin konvülzan etkilerine karşı hassasiyette uzun süreli bir artış görülmektedir (Corda, 1991). PTZ kindling yöntemiyle yapılan öğrenme ve bellekle ilgili bir çalışmada $GABA_B$ reseptör mekanizmasının da kindlingde değiştiğine dair bulgular mevcuttur (Getova, 1998). Ayrıca, GABA taşıyıcı seviyelerinin, nöbet duyarlılığında ve epileptogenezde bir belirleyici olabileceği bildirilmektedir (Doi ve ark., 2009).

PTZ beynin birçok bölümünde, farklı glutamat reseptör alt tiplerinin yoğunluk ve duyarlılığında da artış meydana getirmektedir (Schröder ve ark., 1998). PTZ kindlingde (metabotropik) glutamat reseptör yoğunluğu oluşumunda artış olduğu bildirilmektedir (Schröder ve ark., 1998). PTZ beynin birçok bölümünde, farklı glutamat reseptör alt tiplerinin yoğunluk ve duyarlılığında da artış meydana getirmektedir (Schröder ve ark., 1998). Ayrıca epileptojenik mekanizmada, iyonotropik glutamat reseptörlerinden AMPA da rol oynuyor gibi görünmektedir. Konuyla ilgili bir çalışmada PTZ kindling fenomeninin sürdürülmesi bakımından korteks ve bazal gangliada AMPA reseptörlerinin rol oynadığı bildirilmektedir (Ekonomou ve ark, 2001). Farede PTZ kindlingin

hipokampal CA3 alanında ve temporal kortekste AMPA reseptör bağlanmasında geçici bir artış, hipokampal CA1 ve DG'de AMPA reseptör alt birimlerinden GluR2 ve GluR3 için mRNA ekspresyonunda geçici bir azalma bildirilmektedir (Morimoto ve ark., 2004).

NMDA'nın da kindling epileptogenezinde rol oynadığı bildirilmektedir (Zhu ve ark., 2004). Sıçanlarda PTZ ile indüklenen tutuşmaya bağlı nöbet gelişiminde, NMDA reseptörlerinin sentez esnasında altbirim ve bölge ilişkili değişikliğe uğraması, PTZ ile indüklenennöronal hiperaktivitenin yayılımı ve nöbetingelişmesinden de bu değişikliklerin sorumlu olabileceğini akla getirmektedir (Zhu ve ark., 2004).

Kindling tarafından uyarılan uzun dönem neokortikal plastisite; nöronal inhibisyon ve eksitasyondaki hassas dengede değişim (inhibisyonda göreceli bir azalma ve eksitasyonda göreceli bir artış veya bu ikisinin bir kombinasyonu nedeniyle) ile üretilebilir (Getova ve ark., 1998). Kindling gelişiminde önemli bir kriter olarak $GABA_A$ aracılı inhibisyonun çöküşü ile birlikte, NMDA reseptör kompleksi aktivasyonunun gelişimi de gösterilmektedir (Morimoto, 1990).

Kindlingle ilişkili olarak hipokampusta GABA salınımında artış, GABA reseptör duyarlığında azalmaya yol açar. Glutamat reseptör aktivasyonu ve inhibitör GABA nörotransmitterinin inhibisyonu nedeniyle PTZ indüklü nöbet başlar ve jeneralize hale gelir (Erakovic ve ark., 2001).

4.3. Nörogenez

Nörogenez, kök hücrelerden ve farklılaşmamış progenitör hücrelerden olgun ve fonksiyonel sinir hücrelerinin oluşumunu tanımlayan, başlangıçta sadece erken gelişim sırasında meydana gelen sınırlı bir olgu olarak kabul edilir (Ming ve Song, 2005). Yetişkin nörogenezi beyinde lateral ventriküle bitişik SVZ ve hipokampus DG SGZ'de gerçekleşir(Altman ve ark., 1969).Lateral ventriküller boyunca uzanan SVZ'den kaynaklanan hücreler rostral göç akımı ile belirli bir mesafeyi aşarak

olfaktör bulbustaki yeni granüler veya periglomerüler inhibitör ara nöronlara farklılaşmaktadır.Hipokampusun DG'sindeki SGZ'den kaynaklanan hücreler ise bitişikteki granüler tabakada yeni eksitatör granüler nöronları oluşturmaktadır (Zao ve ark. 2008).Bunlara ek olarak, yapılan çalışmalarda neokorteks, striatum, amigdala ve hipotalamus bölgelerinde yeni nöron oluşumunun gerçekleştiğine dair kanıtlar da bulunmaktadır (Balu ve ark., 2009; Song ve ark., 2012; Abrous ve ark., 2005). Bununla birlikte, diğer çalışmalarda primatların prefrontal, inferior temporal ve posterior parietal neokorteks bölgelerinde ve sıçanlarda anterior neokortekste yeni nöron oluşumunun gerçekleştiği gösterilmiştir (Gould ve ark 1999; Sanai ve ark., 2005; Gould ve ark., 2002). Nörogenez, yeni doğan sinir hücresinin farklılaşma, olgunlaşma, göç ve sisteme entegrasyonunun gerçekleştiği karmaşık, çok aşamalı bir süreçtir (Abrous ve ark.,2005).

Nörogenez birbirinden bağımsız iki farklı süreçten oluşur. Birinci süreç hücre çoğalmasını kapsarken, ikinci süreç nöronal özelliklerin kazanılmasını sağlayan farklılaşma aşaması ile genç nöronların bir bölümünün elimine olduğu, diğerlerinin ise olgunlaşmasını tamamlayarak işlevsel hale geldiği aşamaları içerir. Erişkin merkezi sinir sisteminde(MSS) yeni oluşan nöronlar, glial hücre popülasyonu içindeki "kök hücre" ve "progenitor hücre" olarak isimlendirilen iki tip hücreden meydana gelirler. Kök hücreler farklılaşmamış, çoğalabilen, kendi kendini yenileme yeteneğine sahip, çok sayıda değişik hücre tipine farklılaşma özelliği olan hücrelerdir ve bu hücreler MSS'de iki bölge haricinde pasif durumda bulunurlar. SGZ ve hipokampus DG bölgesinde ise çok yavaş olarak birkaç haftada bir bölünürler. Progenitor hücreler ise çoğalma yeteneğine sahip, mitotik hücrelerdir ve hızlı bölünürler; ancak kendi kendilerini yenileme özellikleri yoktur. Sinir sisteminin üç ana hücre tipine (nöronlar, astrositler ve oligodendrositler) farklılaşabildikleri için multipotent olarak sınıflandırılmışlardır (Seaberg ve ark., 2002). Diğer bir deyişle erişkin nöral öncüller hem nörogenez, hem de gliogenezde rol almaktadır.

4.3.1. Hipokampal nörogenez

Hipokampal granüler nöronların oluşmasında ara öncüller PSA-NCAM (polysialylated neuronal cell adhesion molecule) eksprese etmeye başlamaktadır. Mikrotübül ilişkili protein DCX eksprese etmeye başlamaları hem nöral farklılaşmanın hem de göçün başlangıcıyla ilişkilidir. Post-mitotik farklılaşma, DCX ve kalsiyum bağlayıcı protein kalretininin geçici ekspresyonu ile, nöral belirteçler olan nöronal nüklear antijen (neuronal nuclear antigen; NeuN) ve kalbindin sentezlenmesi ile karakterize edilmektedir. Dendrit ve akson oluşumunun büyük kısmı bu dönemdedir (Balu ve ark., 2009; Abrous ve ark., 2005). Akson uzaması hücreler post-mitotik olduktan hemen sonra görülmekte ve CA3'te sonlanan uygun aksonal bağlantılar 4-10 gün içinde oluşmaktadır (Balu ve ark., 2009).

Nörogenezde GABA anahtar rol oynadığını gösteren çok sayıda kanıt mevcuttur. Olgunlaşmanın erken dönemlerinde (bölünmeden sonraki ilk hafta) yeni doğan hücreler işlevsel olarak GABA aracılı input almaya başlamakta, ancak glutamaterjik sinyal almamaktadır (Balu DT ve ark 2009; Song J ve ark 2012). GABA bilinen inhibitör etkisine karşın bu hücreleri uyarmaktadır. Nöral iletişimde glutamaterjik haberleşme ise entegrasyon kurulduktan sonra başlamaktadır. Bu durum nöral farklılaşma, olgunlaşma ve yeni nöronların mevcut devrelere entegre olması için kritiktir. Olgunlaşmanın 2. ve 3. haftaları boyunca yeni doğan hücreler daha fazla olgun elektrofizyolojik özellik göstermeye başlamaktadır. İşlevsel glutamaterjik sinyal, dendritik diken oluşumu ve devam eden dendritik büyüme, entegrasyonun kurulmasından sonra 14. ile 18. günler arasında görülmektedir. Bölünmeden 7 hafta sonra yeni granül hücreleri aksiyon potansiyeli oluşturabilmekte ve çevredeki daha olgun nöronlarla benzer elektrofizyolojik cevapları verebilmektedir (Balu ve ark., 2009; Song ve ark., 2012).

4.4. Doublecortin

Mikrotübül ilişkili bir protein olan DCX embriyonik ve erken postnatal gelişim sırasında merkezi ve periferik sinir sistemi boyunca gelişmekte olan nöronlarda yaygın olarak eksprese edilmektedir(Francis ve ark., 1999).DCX yetişkin nörogenezi için belirleyici bir adaydır.İlk olarak embriyonik 5-10. günde saptanan DCX, gelişmekte olan fare MSS'de yüksek seviyelerde eksprese edilir(Francis ve ark., 1999).

Erişkin beyninde DCX ekspresyonu, nörojenik bölgelerle ve piriform korteks gibi spesifik nörojenik olmayan bölgelerle sınırlıdır. Erişkin beyninde DCX; DG, SVZ ve SGZ olgunlaşmamış nöronlar tarafından eksprese edilir (Francis ve ark 1999). DCX iki ana nörojenik bölge içinde, yaklaşık 30 gün sonra olgun nöronlar oluşana kadar bölünen nöronal öncü hücrelerde geçici olarak eksprese edilmektedir (Brown ve ark ., 2003).

Çalışmalarda nöronal öncü hücrelerin SVZ'den olfaktör bulbusa göç ettiği yetişkin rostral migrasyon akımının nörojenik bölgesinde, DCX'in fonksiyonu araştırılmıştır. Genç yetişkin DCX mutant farelerde, DCX'inbipolar şekil ve göç için önemli olduğu gösterilmiştir (Balu DT ve ark., 2009).Farelerde yapılan başka bir çalışmada iserostral göç akımındaki nörojenik hücrelerin kaderini belirlemede DCX için yeni bir rolün altı çizilmiştir(Balu DT ve ark., 2009).

5. GEREÇ VE YÖNTEM

5.1. Deney Hayvanları

Çalışmamızda erişkin erkek 250-300 gr ağırlığında Wistar albino ve GAERS suşu sıçanlar kullanıldı. Hayvanlar Marmara Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma ve Uygulama Merkezinden temin edildi. Çalışma için Marmara Üniversitesi Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulundan onay alındı(70.2017.mar).

Hayvanlar standart koşullar altında sabit sıcaklık ve nem sağlanan (21±2˚C ve %65-70 nem) ve uygun havalandırması olan laboratuvar ortamında tutuldu veuygun kafesler içinde barındırıldı. Sıçanlar 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık ortamda standart sıçan yemi ile beslendive musluk suyu içti.

5.2. Deney Grupları

Histolojik değerlendirmeler için çalışma grupları Tablo 1'de belirtildiği şekilde oluşturuldu.

Tablo 1. Çalışmada kullanılan deney grupları ve hayvan sayıları.

Wistar	**GAERS**
Yalancı-opere 7. gün (n=6)	Yalancı-opere 7. gün (n=3)
Yalancı-opere 14. gün (n=6)	Yalancı-opere 14. gün (n=3)
PTZ 7. gün (n=6)	PTZ 7. gün (n=4)
PTZ 14. gün (n=6)	PTZ 14. gün (n=3)

5.3. Kimyasal Kindling Uygulaması

Kimyasal kindling oluşturmak için erişkin Wistar ve GAERS sıçanlara gün aşırı subkutan yol ile 35 mg/kg PTZ enjeksiyonu uygulandı. PTZ enjeksiyonunun ardından sıçanlar pleksiglasların içine alınarak 30 dk. boyunca nöbet gelişim evreleri Racine skalasına göre gözlendi (Racine, 1972a,1972b) ve 5 kez evre 5 nöbet geçiren sıçanlar kindled olarak kabul edildi.

Yalancı-opere grubundaki Wistar ve GAERS sıçanlara, PTZ enjeksiyonu yapılan sıçanlarla aynı gün ve saatte subkutan yol ile serum fizyolojik verilerek pleksiglaslara alındı ve 30 dk. boyunca gözlendi.

5.4. Işık Mikrokopik Takip ve İmmünfloresan İnceleme

5.4.1. Perfüzyon fiksasyonu

PTZ grubundaki sıçanlara son evre 5 nöbetten sonraki 7. ve 14. günlerde derin anestezi (100 mg/kg ketamin ve 10 mg/kg ksilazin hidroklorid, i.p.) altında, pençe ve korneal refleksleri kontrol edildikten sonra intrakardiyak perfüzyon fiksasyonu yapıldı. PTZ gruplarındaki hayvanların yalancı-opere kontrollerine de aynı gün perfüzyon fiksasyonu işlemi uygulandı. Derin anestezi oluştuktan sonra göğüs kafesi açılarak, aortadan perfüzyon pompası yardımıyla 50 ml/dk hızında önce 10 ml heparin ve daha sonra aralıksız olarak 300 ml %4 paraformaldehit (0.1 M fosfat tamponlu salin [PBS] içinde,pH 7.3) ile fiksasyon yapıldı. Perfüzyon fiksasyonunun ardından sakrifiye edilen hayvanların beyin dokuları çıkarılarak aynı fiksatif içinde 1 gece +4ºC'de bekletildi**.**

5.4.2. Işık mikroskopik preparasyon

Fiksasyondan 1 gün sonra beyinler %10, %20, %30'luk sukroz serilerine (0.1 M PBS, pH 7.3 içinde) alındı. Herbir sukroz serisinde beyinlerin dibe çökmesi beklendi ve bu işlemden sonra doku diğer serilere sırasıyla alındı. Daha sonra kuru buz içinde -80ºC'de beyin dokuları dondurulduu ve -80ºC'de saklandı. Doku bloklarından kriyomikrotom ile 5 µm kalınlığında kesitler alındı.

5.4.3. İmmünfloresan boyama

Çalışmamızda kullandığımız tüm deney hayvanlarının beyinlerinden alınan 5 µm kalınlığındaki kriyo-kesitlere yeni oluşan progenitör nöronları göstermek amacıyla, nöronal göç belirteci olan DCX, glial hücreleri göstermek için glial fibriller asidik protein (GFAP) veolgun nöronları göstermek için nöronal nüklear antijen (NeuN) primer antikorları kullanılarak DCX-GFAP ve DCX-NeuN ikili immünfloresan boyamaları yapıldı.

Doku kesitleri önce 5 dk. parafomaldehitin içinde bekletildi. Dokudaki endojen peroksidaz aktivitesi 10 dk. %3'lük hidrojen peroksit (%97 metanol içinde) ile baskılandı. Spesifik olmayan boyanmayı engellemek için dokulara 10 dk. protein blokajı yapıldı (Skytek Superblock Solution). Blokajın ardından kesitlere anti-DCX primer antikoru (1:4000, ab18723) damlatılarak 1 sa. 37ºC'de inkübe edildi. Bu süre sonunda kesitler iki ayrı PBS ile yıkandı ve ardından ardışık kesitlere her birine anti-GFAP (1:500, MAB3402) veya anti-NeuN (1:5000, MAB377) primer antikorları damlatılarak 1 sa. 37 ºC'de inkübasyon yapıldı. İki ayrı PBS ile yıkama tekrarlandı ve DCX için Dylight 550 konjuge keçi anti-tavşan sekonder antikoru (1:600, Thermo Pierce 84541) damlatılarak 1 sa. oda sıcaklığında karanlıkta bekletildi. Bu süre sonunda iki ayrı PBS ile yıkama yapıldı. Yıkamadan sonra GFAP ve NeuN için Dylight 488 konjuge keçi anti-fare sekonder antikoru (1:400, Thermo Pierce 35502) damlatılarak 1 sa. oda sıcaklığında ve karanlıkta bekletildi. Bu süre sonunda iki ayrı PBS ile tekrarlanan yıkamanın ardından 4',6-

Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) içeren kapatma solüsyonu (Vectashield) ile kapatılan kesitlerde hipokampus bölgesi floresan mikroskobu (DP72 Olympus kamera ve floresan filtreleri eklentili, BX51 Olympus fotomikroskop, Japonya) ile incelendi.

5.5. İstatistiksel Analizler

İstatistiksel analizler Graph-Pad Prism7.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) programı kullanılarak yapılmıştır. İki grup arasındaki karşılaştırma Unparied T-testi ile karşılaştırıldı $p< 0.05$ anlamlı olarak kabul edilmiştir.

6.BULGULAR

6.1. Wistar Grubu

Perfüzyonla elde edilen beyin dokularından alınan kesitlere DCX-GFAP ikili immünfloresan boyamasından sonra DCX pozitif hücreler kırmızı floresan renkte, GFAP pozitif hücreler yeşil floresan renkte ve tüm hücrelerin nukleusları mavi floresan renkte görüldü. DCX-NeuN ikili immünfloresan boyamasından sonra DCX pozitif hücreler kırmızı floresan renkte ve NeuN pozitif hücreler yeşil floresan renkte görüldü.

6.1.1. Wistar yalancı-opere grup

6.1.1.1. Wistar yalancı-opere 7. gün grubu

Perfüzyonla elde edilen beyin dokularından alınan kesitlere DCX-GFAP (Resim 2, 3)ve DCX-NeuN (Resim 4, 5) ikili immünfloresan uygulamalarından sonra kontrol 7. gün grubunda DG subgranüler tabakasındaDCX pozitif hücreler görüldü.

DG'de hilus ve SGZ'de DCX ve NeuN ikili işaretlenmesinin pozitif olduğu hücreler izlendi. SGZ'de bu tabakaya paralel ve granüler tabakada bu tabakaya dik DCX pozitif hücre uzantıları görüldü.

6.1.1.2. Wistar yalancı-opere 14. gün grubu

Perfüzyonla elde edilen beyin dokularından alınan kesitlere DCX-GFAP (Resim 6, 7DCX-NeuN (Resim 8)ikili immünfloresan boyamaları ile Wistar kontrol 14. gün gruplarında DG subganüler tabakasında DCX pozitif,granüler tabaka ve hilusta NeuN pozitif hücreler görüldü. DG hilus ve SGZ'de DCX ve NeuN ikili işaretlenmesinin pozitif olduğu hücreler izlendi.

6.1.2. Wistar PTZ grubu

6.1.2.1. Wistar PTZ 7. gün grubu

Wistar PTZ 7. gün grubundaki hayvanların 5 kez evre 5 nöbete ulaşmaları için gereken PTZ enjeksiyon sayısı ortalaması 5,75±0,48 olarak bulundu. Bu sayının GAERS PTZ 7. gün grubuna göre anlamlı olarak yüksek olduğu tespit edildi ($p<0.0001$, Resim 1).

Wistar PTZ 7. gün grubundaperfüzyonla elde edilen beyin dokularından alınan kesitlere DCX-GFAP ve DCX-NeuNikili immünfloresan boyamaları ile DG subganüler tabakasında DCX pozitif hücreler görüldü. DCX-GFAP ikili immünfloresan boyaması sonucundaWistar 7. gün yalancı-operekontrol grubuna kıyasla DCX pozitif hücrelerde artış izlendi (Resim 9-12).

DCX-NeuN ikiliimmünfloresan boyaması sonucunda Wistar 7. gün yalancı-operekontrol grubuna kıyasla DCX-NeuN pozitif hücrelerde artış gözlendi (Resim 13, 14).

Bu gruptaki DCX pozitif hücrelerin SGZ'de yerleşim gösterdiği ve yalancı-opere Wistar kontrol grubuna göre daha büyük boyutta olduğu izlendi. Bazı DCX pozitif hücrelerin ise SGZ'de kümeler oluşturduğu görüldü. DCX pozitif dendiritik uzantıların granüler tabaka içerisinde ve bu tabakaya dik yerleşim gösterdikleri izlendi.

6.1.2.2. Wistar PTZ 14. gün grubu

Wistar PTZ 14. gün grubundaki hayvanların 5 kez evre 5 nöbete ulaşmaları için gereken PTZ enjeksiyon sayısı ortalaması 5±0 olarak bulundu. Bu sayının GAERS PTZ 14. gün grubuna göre anlamlı olarak yüksek olduğu tespit edildi ($p<0.001$, Resim 1).

Perfüzyonla elde edilen beyin dokularından alınan kesitlere DCX-GFAP ve DCX-NeuN ikili immünfloresan boyamaları ile DGSGZ'de DCX pozitif hücreler görüldü. DCX-GFAP ikili immünfloresan boyaması sonucundayalancı-opere Wistar 14. gün kontrol grubuna göre DCX pozitif hücrelerde artış olduğu görüldü (Resim15-18).

Bu gruptaki DCX-NeuN ikili immünfloresan boyaması sonucunda,ikili işaretlenen hücrelerin yalancı-opere Wistar 14. gün kontrol grubuna göre daha fazla olduğu görüldü (Resim 19, 20). Bu hücrelerin hilus ve SGZ'de yerleşim gösterdikleri gözlendi.

Wistar PTZ 14. gün grubunda DCX pozitif bazı hücrelerin SGZ'de küme oluşturdukları görüldü. Bu grupta yalancı-opere Wistar gruplarına göre daha fazla DCX pozitif hücre olduğu izlendi. DCX pozitif hücre uzantılarının granüler tabaka içinden geçerek moleküler tabakaya uzandıkları, bu uzantıların yalancı-opere Wistar 14 gün grubuna göre daha fazla olduğu görüldü.

6.2. GAERS Grubu

Perfüzyonla elde edilen beyin dokularından alınan kesitlere DCX-GFAP ikili immünfloresan boyamasından sonra DCX pozitif hücreler kırmızı floresan renkte, GFAP pozitif hücreler yeşil floresan renkte ve tüm hücrelerin nukleusları mavi floresan renkte görüldü. DCX-NeuN ikili immünfloresan boyamasından sonra DCX pozitif hücreler kırmızı floresan renkte ve NeuN pozitif hücreler yeşil floresan renkte görüldü.

6.2.1. GAERS yalancı-opere grup

6.2.1.1. GAERS yalancı-opere 7. gün grubu

GAERS PTZ 7. gün grubunda DG'de DCX-GFAPve DCX-NeuNikili immünfloresan boyamaları ile SGZ ve hilusta DCX pozitif hücreler görüldü.

DCX-GFAP ikili immünfloresan boyaması sonucunda DG bölgesinde hem DCX hem de GFAP pozitif olan hücrelere rastlandı. Hilustaki DCX pozitif hücrelerin astrosit morfolojisini yansıttığı görüldü (Resim 21, 22).

Yapılan DCX-NeuN ikili immünfloresan boyaması sonucunda hilustaki bazı hücrelerde hem DCX hem de NeuN pozitifliği görüldü. Astrositlerdeki DCX pozitifliği homojen iken, nöronlardaki DCX pozitifliğinin punktat şeklinde olduğu gözlendi (Resim 23).

6.2.1.2. GAERS yalancı-opere 14. gün grubu

GAERS yalancı-opere 14. gün grubundakiDCX-GFAP ve DCX-NeuNikili immünfloresan boyaması uygulanan kesitlerde DG SGZ ve hilus bölgelerinde DCX pozitif hücreler görüldü. Bu hücrelerin Wistar yalancı-opere kontrollere göre daha fazla olduğu izlendi. Bazı DCX pozitif hücrelerin kümeler halinde bulunduğu gözlendi.

Yapılan DCX-GFAP ikili immünfloresan boyaması sonucunda DG SGZ'de DCX pozitif hücreler ve hilusta GFAP pozitif astrositler görüldü (Resim 24, 25). Astrositlerdeki DCX pozitifliğinin nöral progenitörlere göre daha zayıf olduğu gözlendi. Astrositlerdeki DCX pozitifliği homojen iken, progenitör olduğu düşünülen hücrelerdeki pozitifliğin punktat şeklinde olduğu görüldü.

Yapılan DCX-NeuN ikili immünfloresan boyaması sonucunda SGZ ve hilustaki bazı hücrelerde NeuN ve DCX pozitifliğinin birlikte olduğu görüldü (Resim 26, 27).

6.2.2. GAERS PTZ grubu

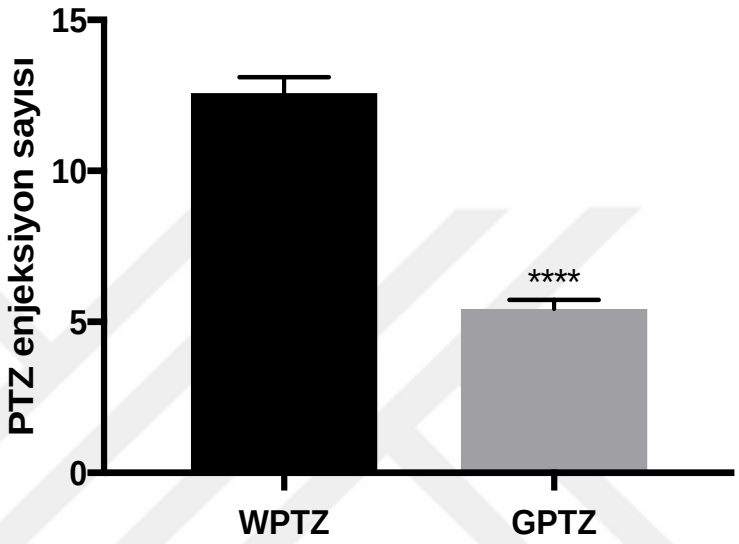
6.2.2.1. GAERS PTZ 7. gün grubu

GAERS PTZ 7 gün grubundaDCX-GFAP (Resim 28-31) ve DCX-NeuN (Resim 32)ikili immünfloresan boyamaları uygulanan kesitlerde DG SGZ ve hilusta DCX pozitif hücreler görüldü. GAERS yalancı-opere 7 gün kontrol grubu ile kıyaslandığında DCX pozitif hücrelerde artış izlenmedi. Bazı DCX pozitif hücrelerin SGZ'de küme halinde bulundukları görüldü. DG granüler tabakadan moleküler tabakaya doğru uzanan DCX pozitif, dendiritik uzantı olduğu düşünülen hücre projeksiyonları görüldü.

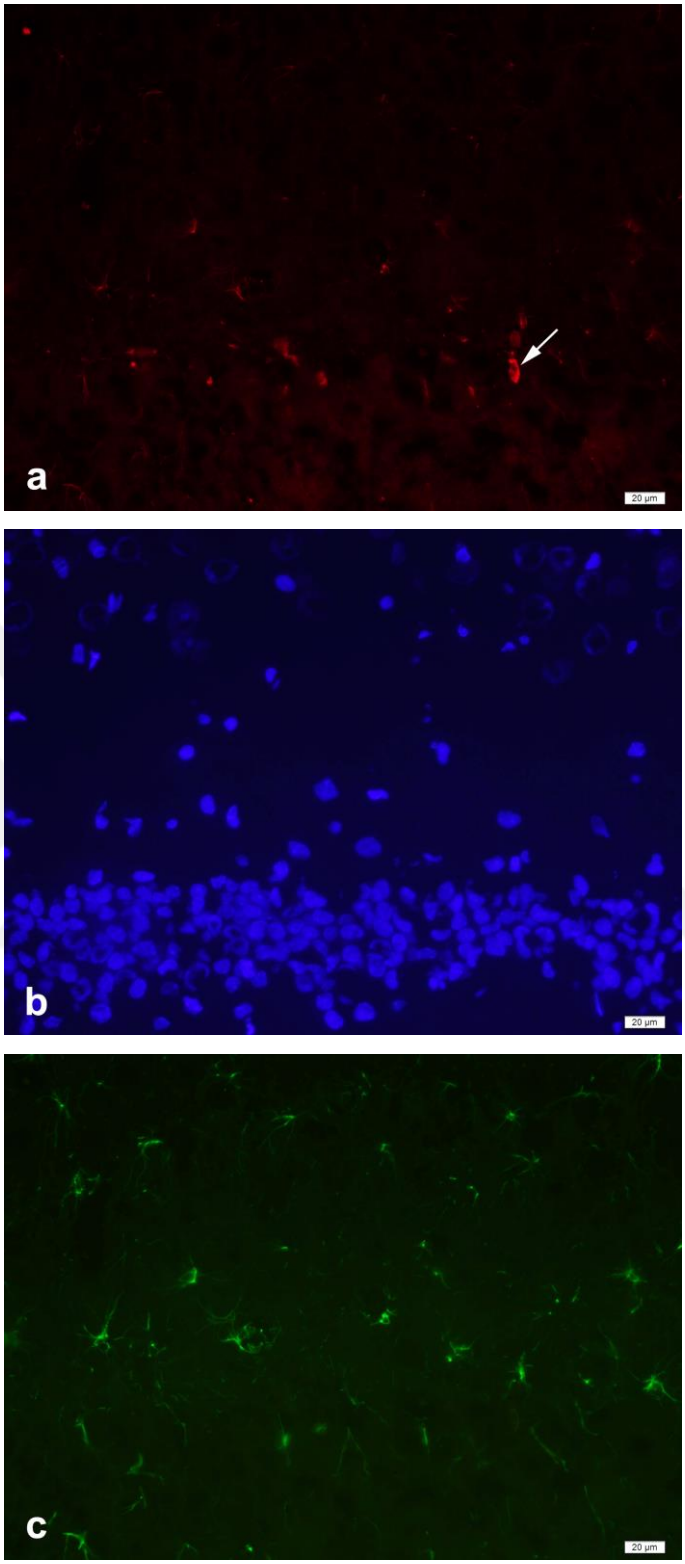
6.2.2.2. GAERS PTZ 14. gün grubu

GAERS PTZ 14. gün grubundaDCX-GFAP (Resim 33, 34) ve DCX-NeuN (Resim 35) ikili immünfloresan boyaması uygulanan kesitlerde, SGZ'de Wistar PTZ 14 gün grubuna kıyasla daha az DCX pozitif hücre olduğu görüldü. Pozitiflik görülen hücrelerin çoğunun astrosit morfolojisi gösterdiği izlendi.Astrositlerdeki DCX pozitifliğinin nöral progenitör olduğu düşünülen hücrelerdekine kıyasla daha zayıf olduğu görüldü.

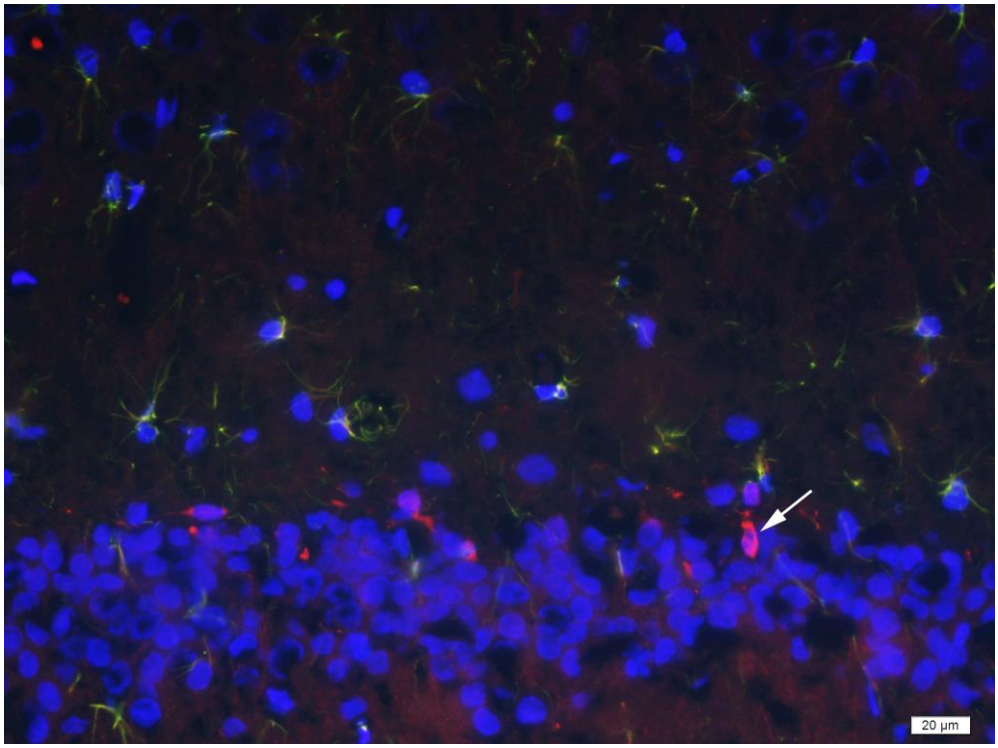
Bu gruptaki DCX-NeuN ikili boyanmasında bazı DCX pozitif hücrelerin aynı zamanda NeuN pozitifliği de gösterdiği izlendi. DCX ve NeuN pozitifliği görülen hücrelerin genellikle hilus tabakasında yerleşim gösterdiği saptandı. Bazı DCX pozitif nöral progenitör olduğu düşünülen hücrelerin granüler tabakaya dik olacak şekilde, bazılarının da SGZ'ye paralel olacak şekilde yerleşim gösterdikleri izlendi. DCX-NeuN ile ikili işaretlenen hücrelerdeki NeuN pozitifliğinin bazı hücrelerde nükleusta, bazı hücrelerde ise sitoplazmada olduğu görüldü. İkili işaretlenen bu hücrelerdeki DCX pozitifliğinin punktat şeklinde olduğu gözlendi.



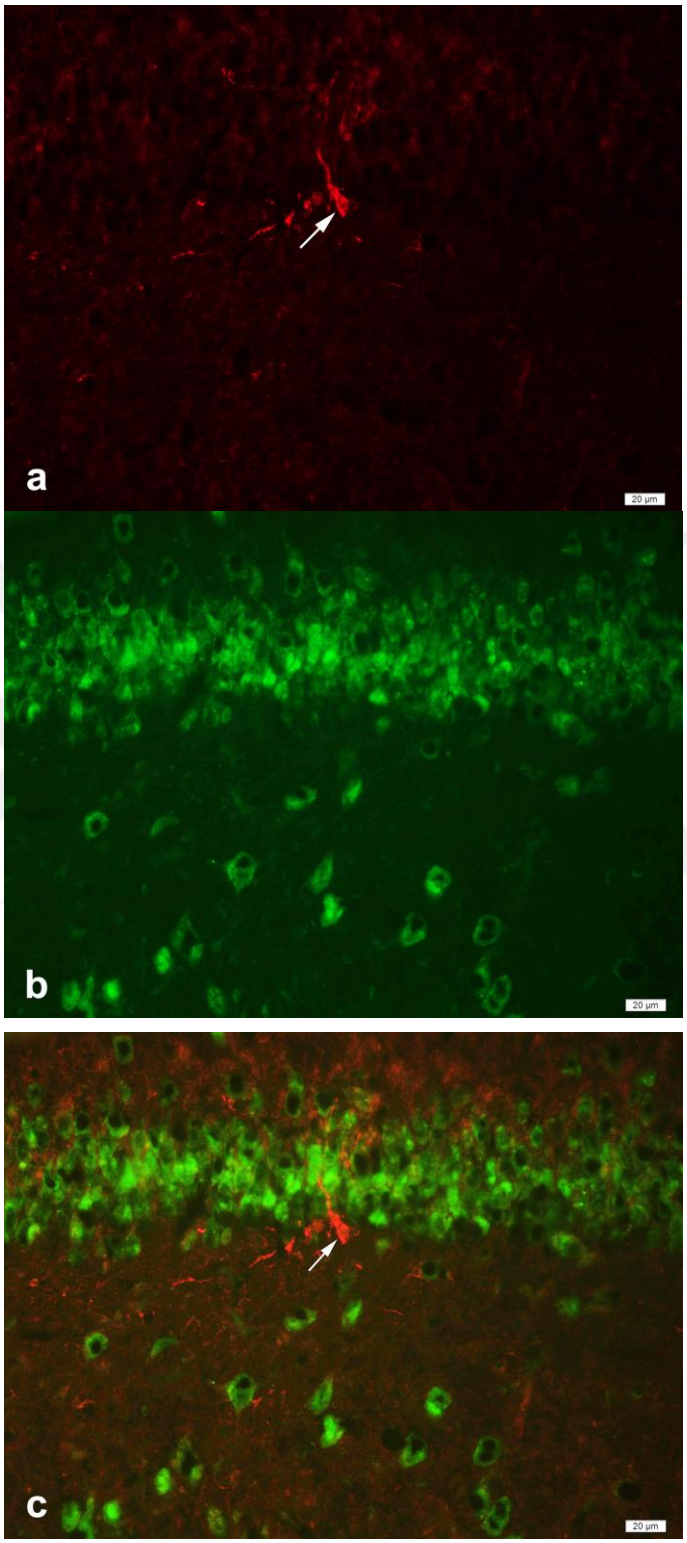
Resim 1. PTZ gruplarında 5 kez evre 5 nöbet oluşturmak için uygulanan enjeksiyon sayısı.****p<0.0001, WPTZ: Wistar PTZ grupları, GPTZ: GAERS PTZ grupları.



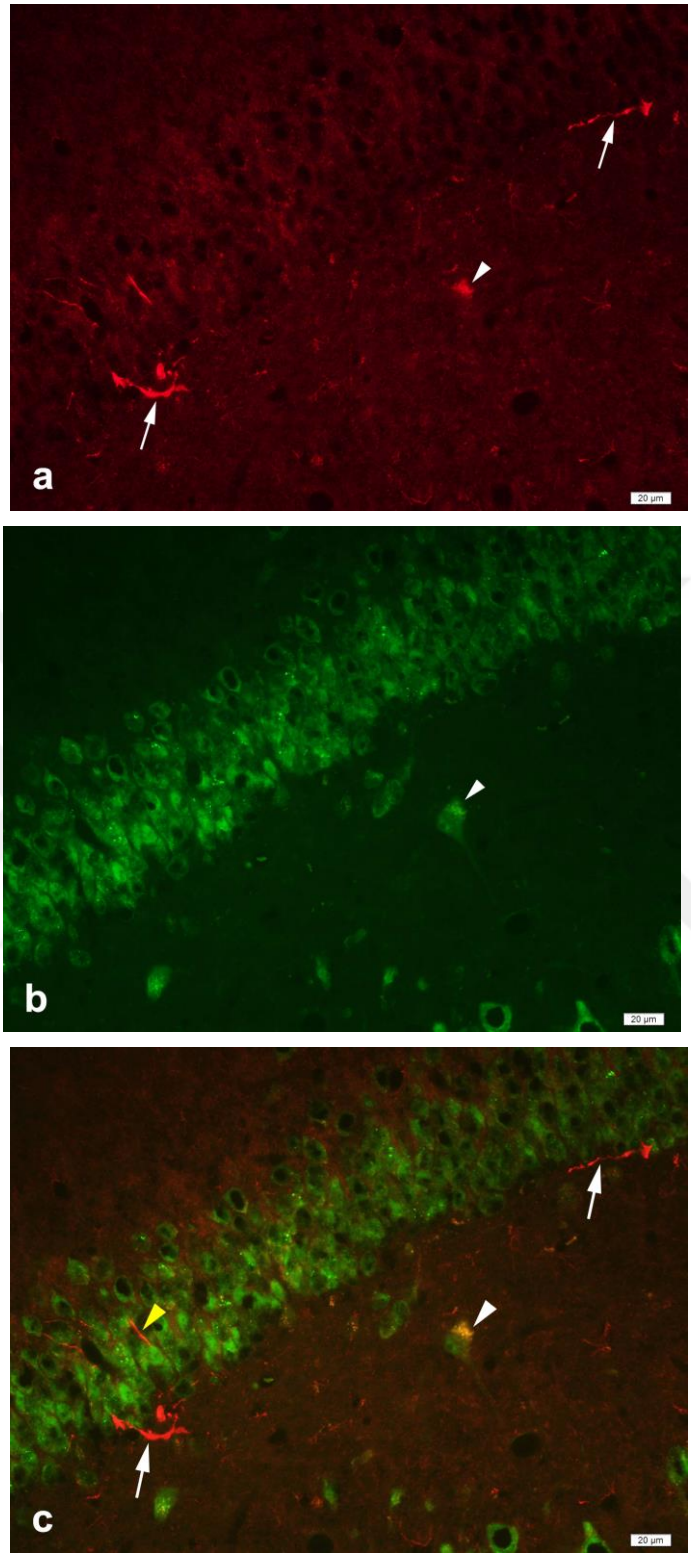
Resim 2. Wistar 7. gün yalancı-opere grubu. **(a)** DCX pozitif hücre (ok), **(b)** DAPI pozitif hücreçekirdekleri, **(c)** GFAP pozitif hücreler. Orijinal büyütme: x20.



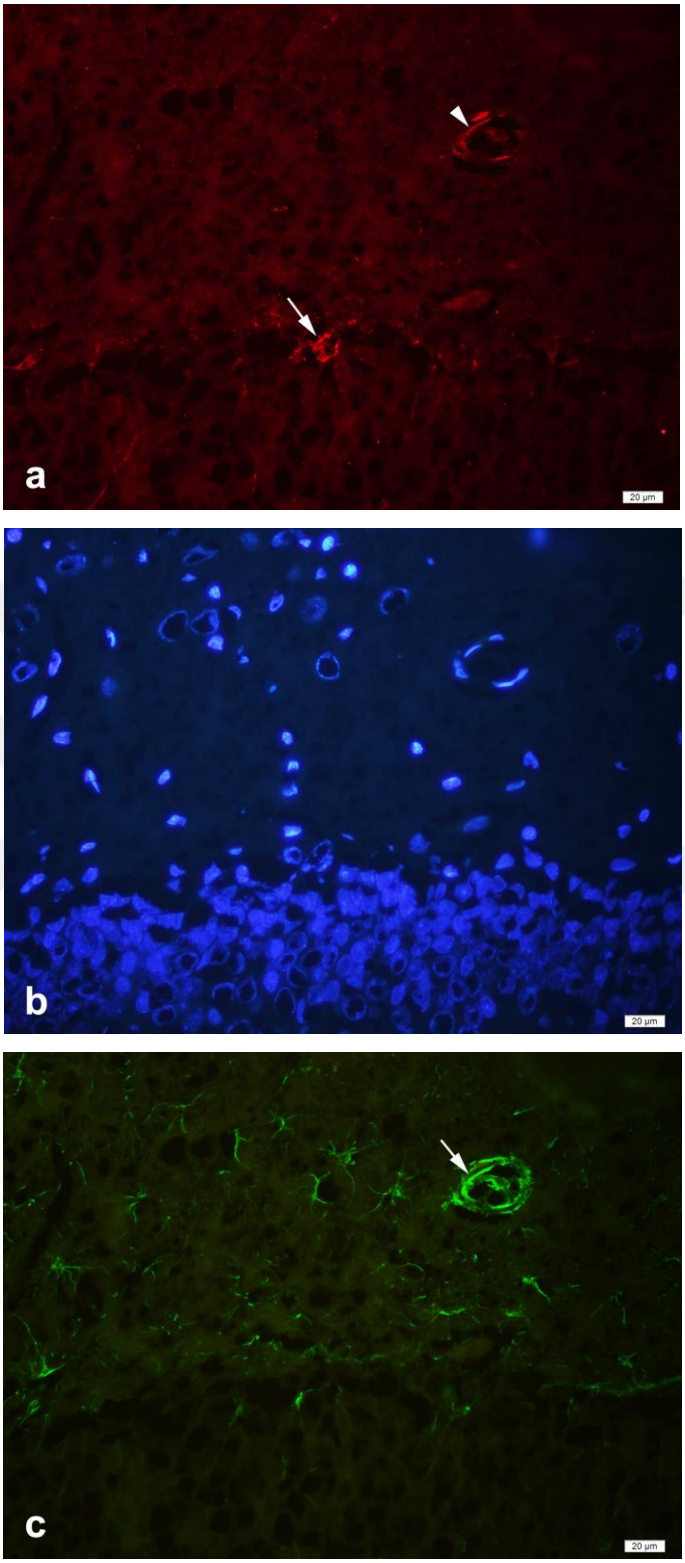
Resim 3. Wistar 7. gün yalancı-opere grubu. DCX-DAPI-GFAP boyamaları üçlü işaretlenme. Ok: DCX pozitif hücre.Orijinal büyütme: x20.



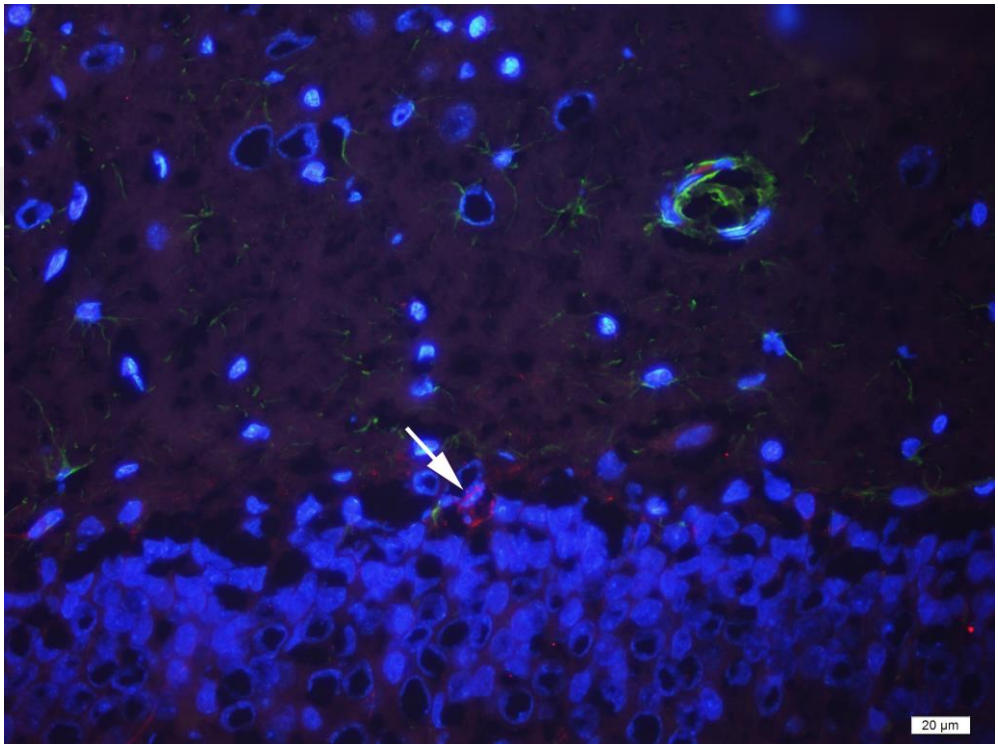
Resim 4. Wistar yalancı-opere7. gün grubu. **(a)** DCX pozitif hücre (ok).**(b)** NeuN pozitif hücreler, **(c)**DCX-NeuN ikili boyama görüntüsü. Ok: DCX pozitif hücre.Orijinal büyütme: x20.



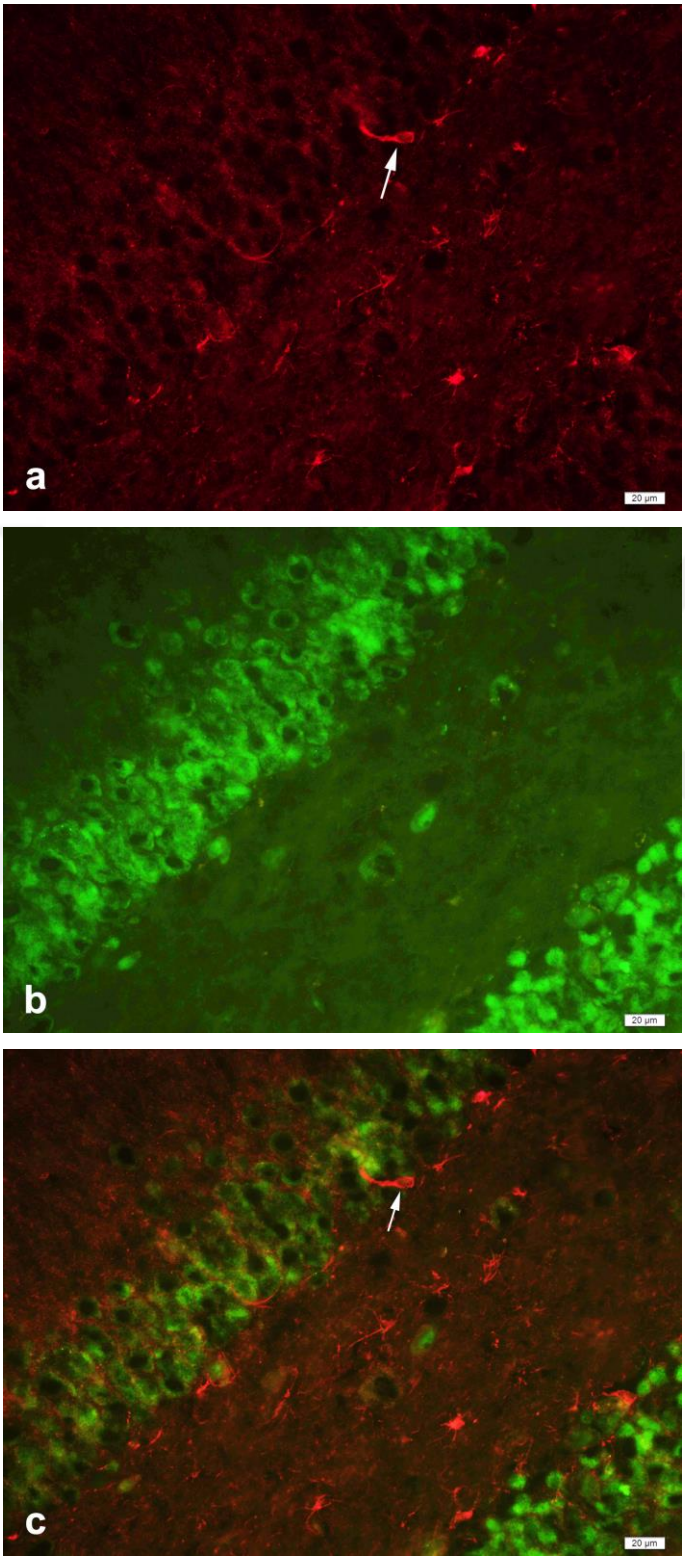
Resim 5. Wistar yalancı-opere7. gün grubu. **(a)** DCX pozitif hücre (ok başı) ve hücre uzantıları (ok), **(b)** NeuN pozitif hücreler, **(c)** DCX-NeuN ikili işaretlenmede DCX-NeuN pozitif hücre (ok başı), SGZ'de DCX pozitif hücre uzantıları (ok), granüler tabakada DCX pozitif hücre uzantısı (sarı ok başı). Orijinal büyütme: x20.



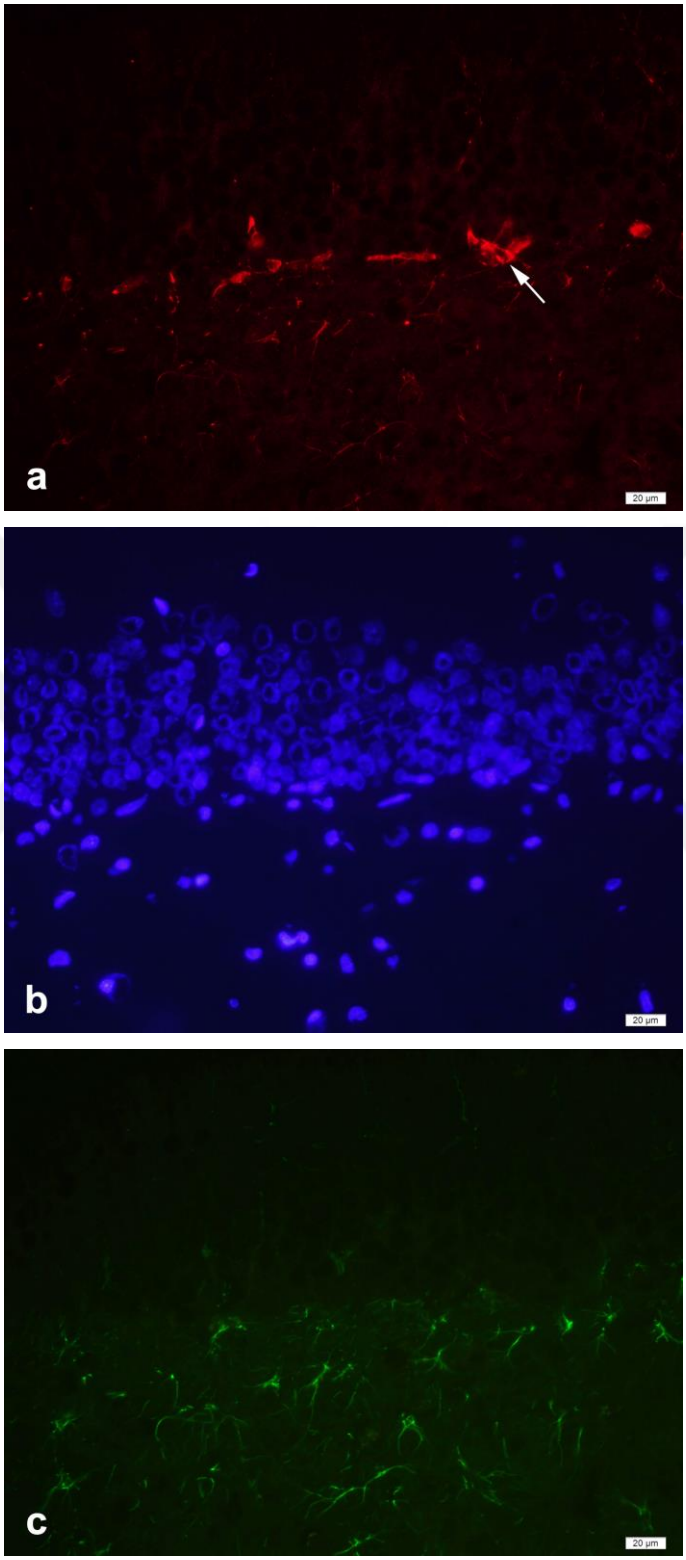
Resim 6. Wistar 14.gün yalancı-opere grubu.**(a)** DCX pozitif hücre(ok) ve damar etrafında DCX pozitif astrosit uzantıları (ok başı), **(b)**DAPI pozitif hücre çekirdekleri,**(c)**Damar etrafında GFAP pozitif astrosit uzantıları (ok). Orijinal büyütme: x20.



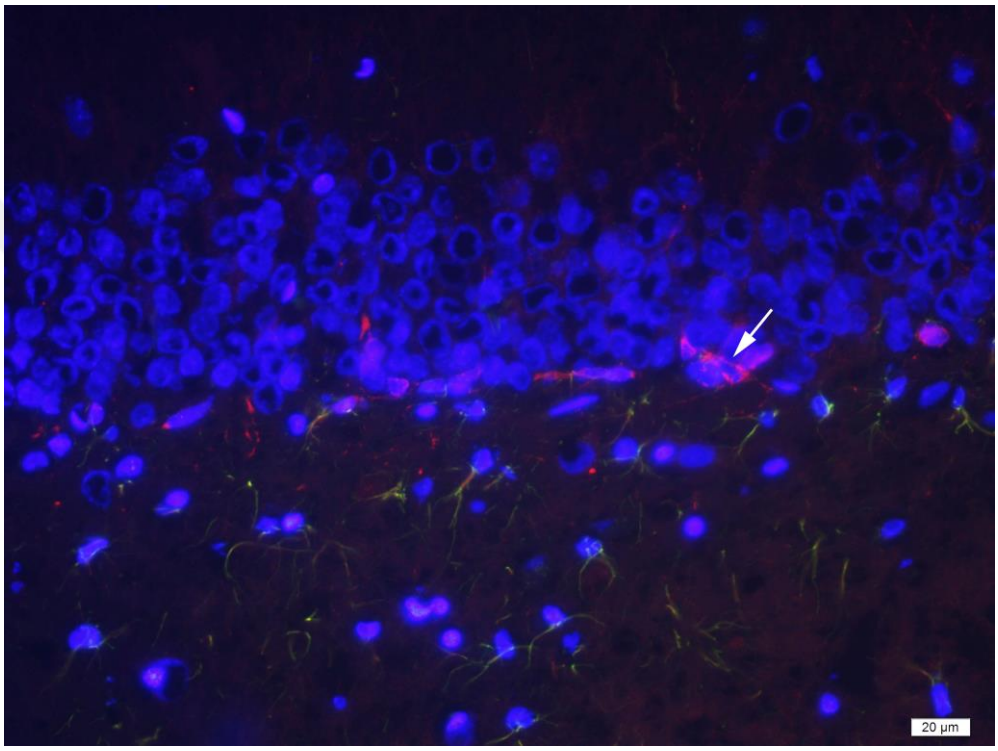
Resim 7. Wistar 14. gün yalancı-opere grubu. DCX-DAPI-GFAP üçlü işaretlenme. Ok: SGZ'de DCX pozitif hücre. Orijinal büyütme: x20.



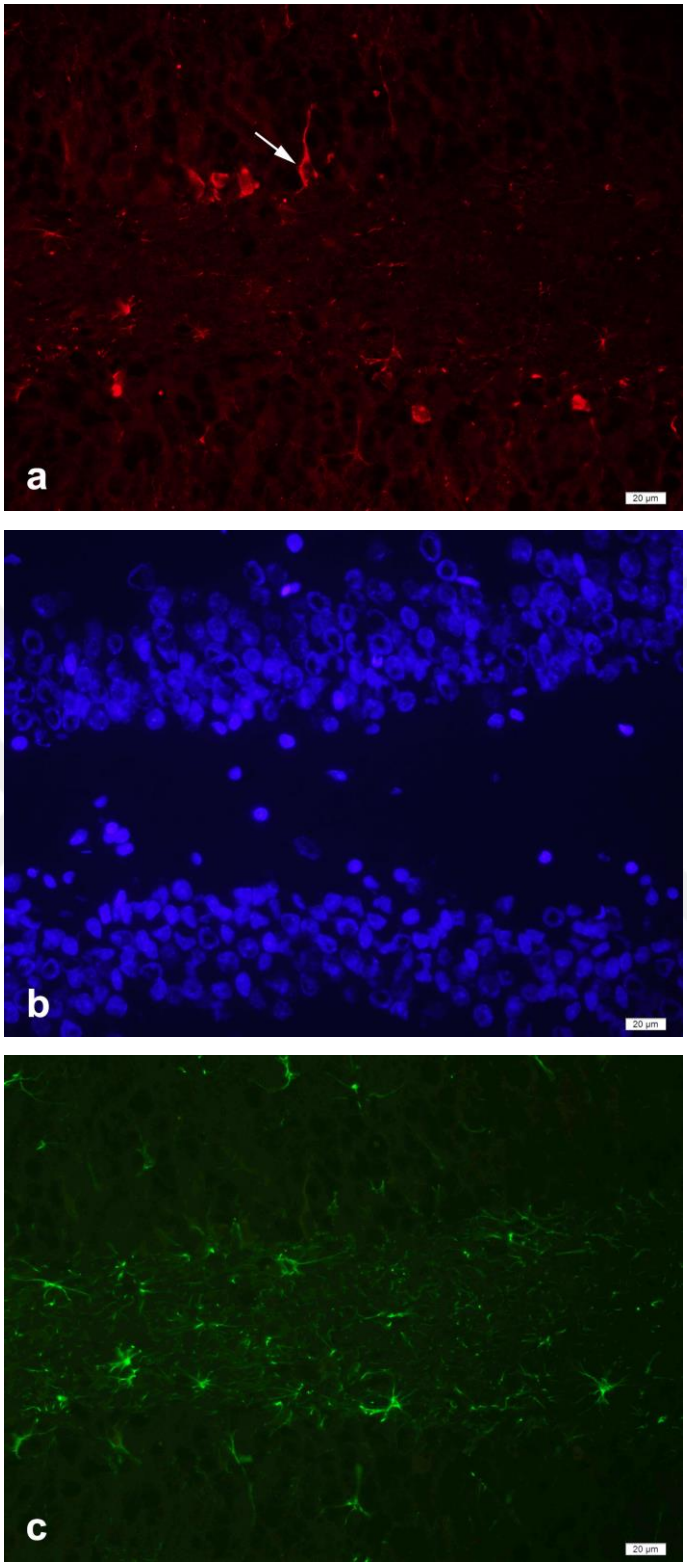
Resim 8. Wistar 14. gün yalancı-opere grubu. **(a)** DCX pozitif hücre (ok), **(b)** DAPI pozitif hücre çekirdekleri, **(c)** DCX pozitif, NeuN negatif hücre(ok). Orijinal büyütme: x20.



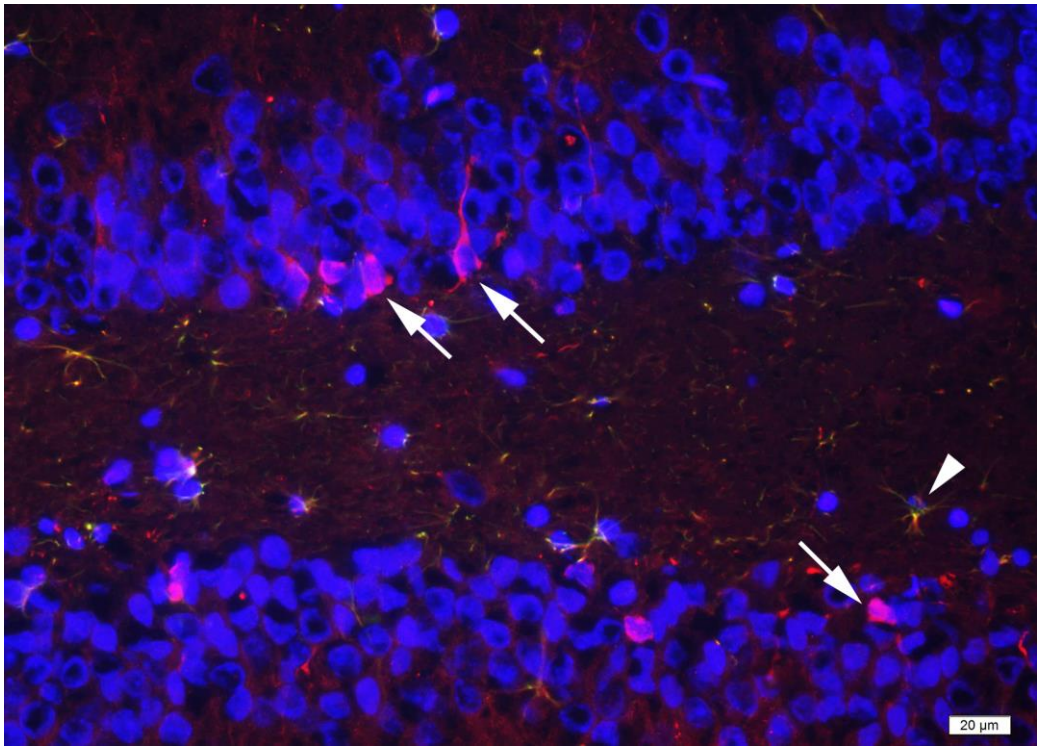
Resim 9. Wistar PTZ 7. gün grubu. DCX-GFAP ikili immünfloresan boyama. **(a)** DCX pozitif hücreler(ok),**(b)** DAPI pozitif hücre çekirdekleri, **(c)**GFAP pozitif hücreler. Orijinal büyütme: x20.



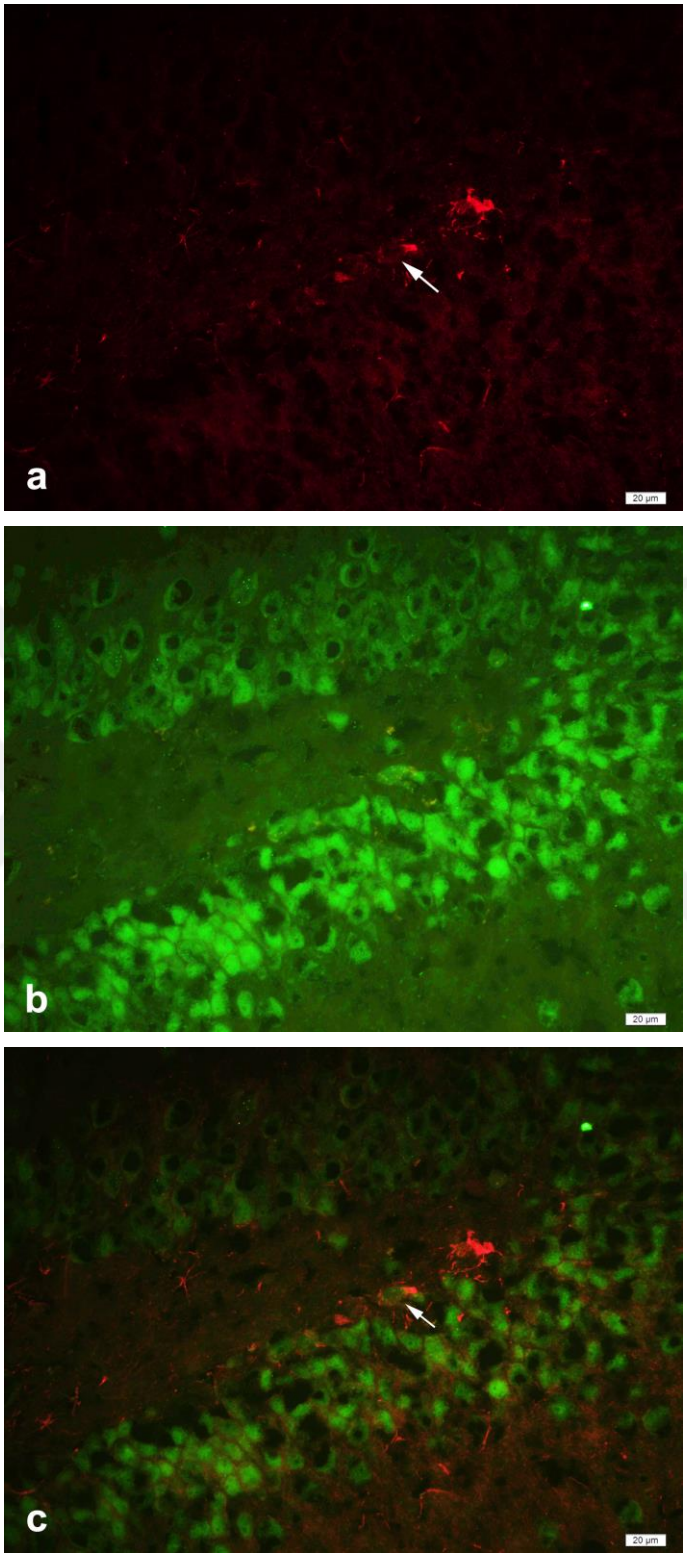
Resim 10. Wistar PTZ 7. gün grubu. DCX-DAPI-GFAP üçlü işaretleme. DCX pozitif hücre kümesi (ok). Orijinal büyütme: X20.



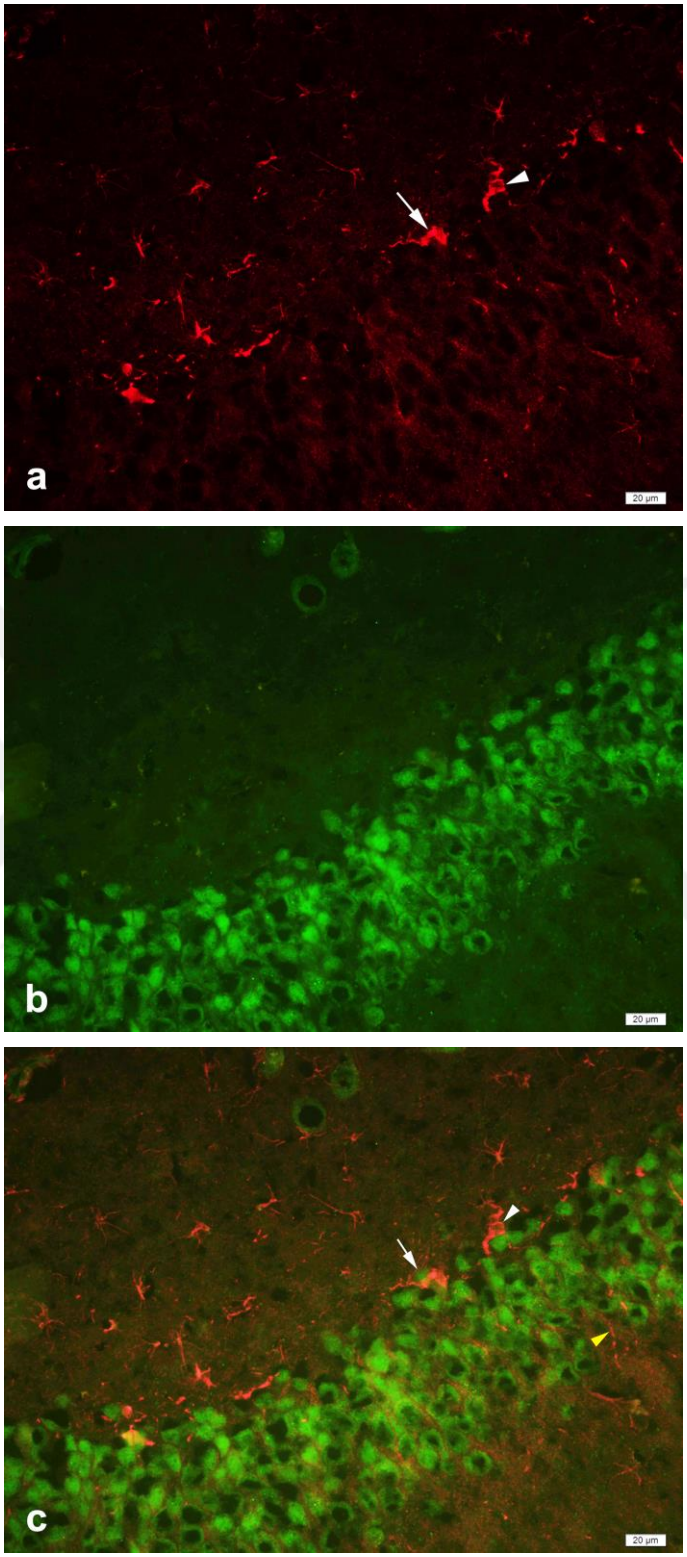
Resim11. Wistar PTZ 7. gün grubu. DCX-GFAP ikili immünfloresan boyama. **(a)** DCX pozitif hücreler (ok), **(b)** DAPI pozitif hücre çekirdekleri, **(c)**GFAP pozitif hücreler. Orijinal büyütme: x20.



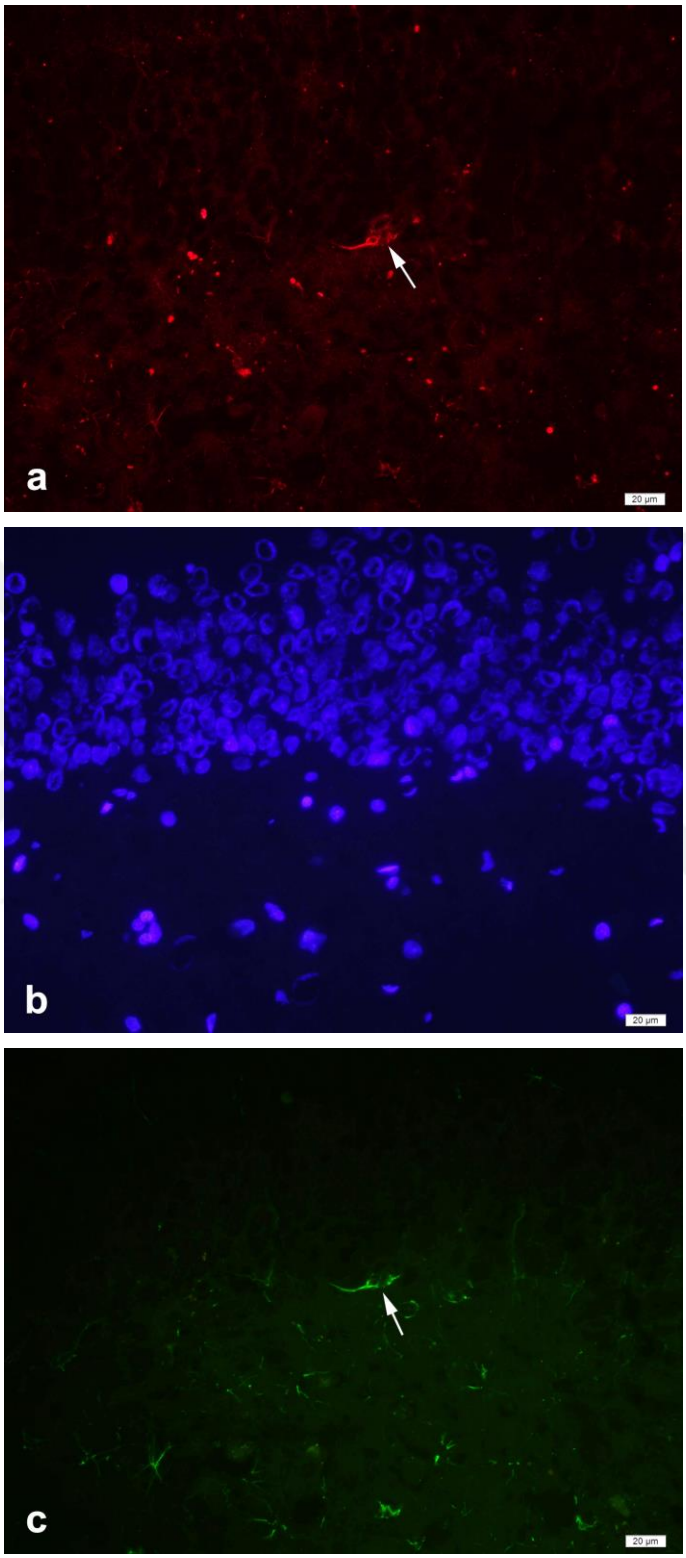
Resim 12. Wistar PTZ 7. gün grubu. DCX-DAPI-GFAP üçlü işaretleme. DCX pozitif hücreler (ok),DCX-GFAP ile ikili işaretlenmiş hücre (ok başı). Orijinal büyütme: x20.



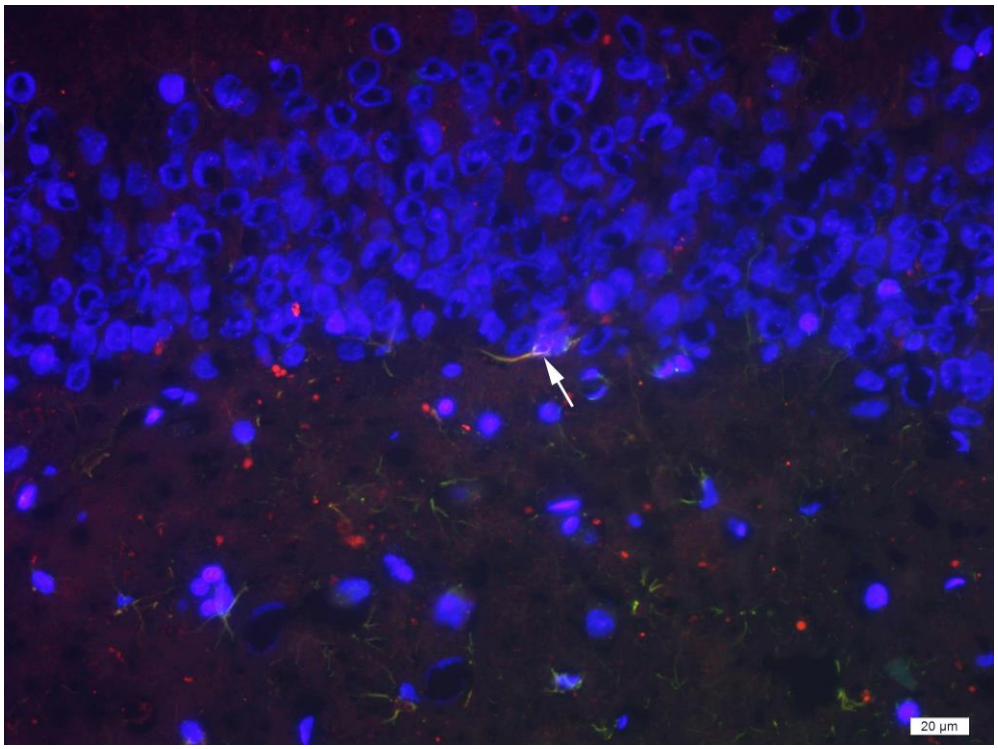
Resim 13. Wistar PTZ 7. gün grubu. **(a)** DCX pozitif hücre (ok),**(b)**NeuN pozitif hücreler,**(c)**DCX-NeuN ikili işaretlenenhücre(ok). Orijinal büyütme: x20.



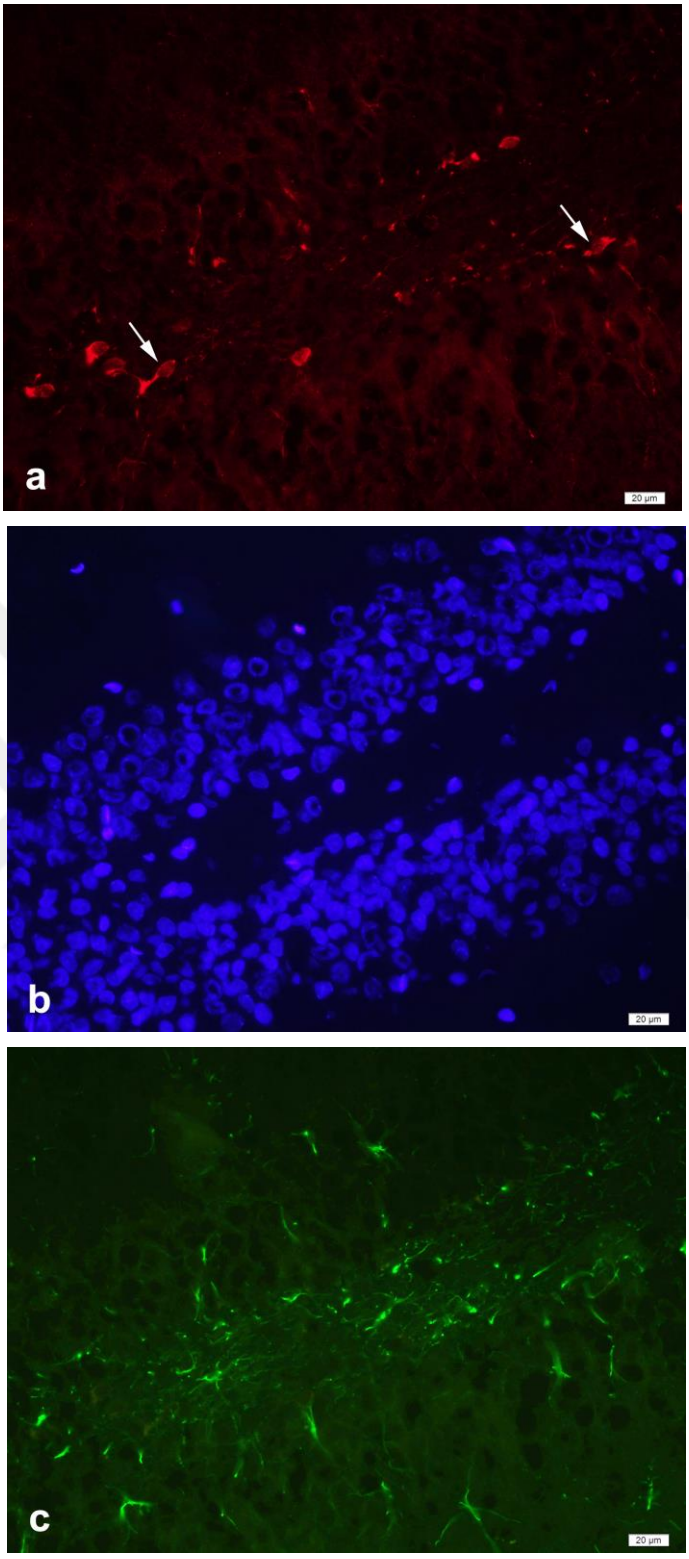
Resim 14. WistarPTZ 7. gün grubu. **(a)** DCX pozitif hücreler (ok ve ok başı), **(b)** NeuN pozitif hücreler, **(c)**DCX-NeuN ikili işaretlenen hücre(ok) ve DCX pozitif, NeuN negatif hücre (ok başı). Orijinal büyütme: x20.



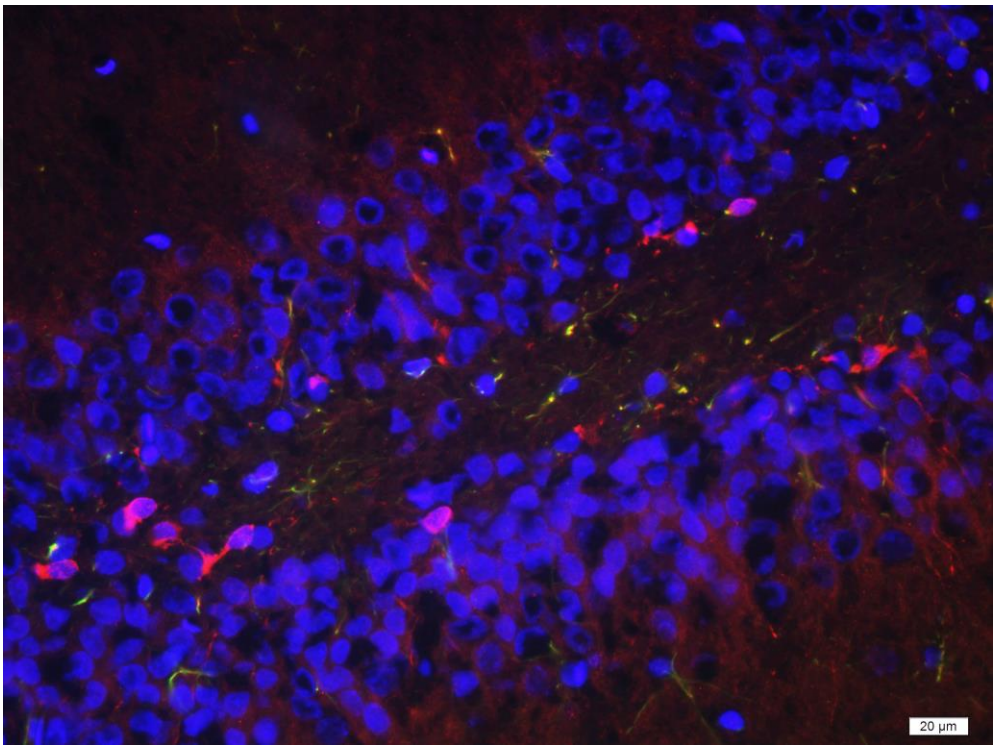
Resim 15. PTZ 14. gün grubu. **(a)** DCX pozitif hücre kümesi(ok), **(b)** DAPI pozitif hücre çekirdekleri, **(c)** GFAP pozitif hücrekümesi (ok). Orijinal büyütme: x20.



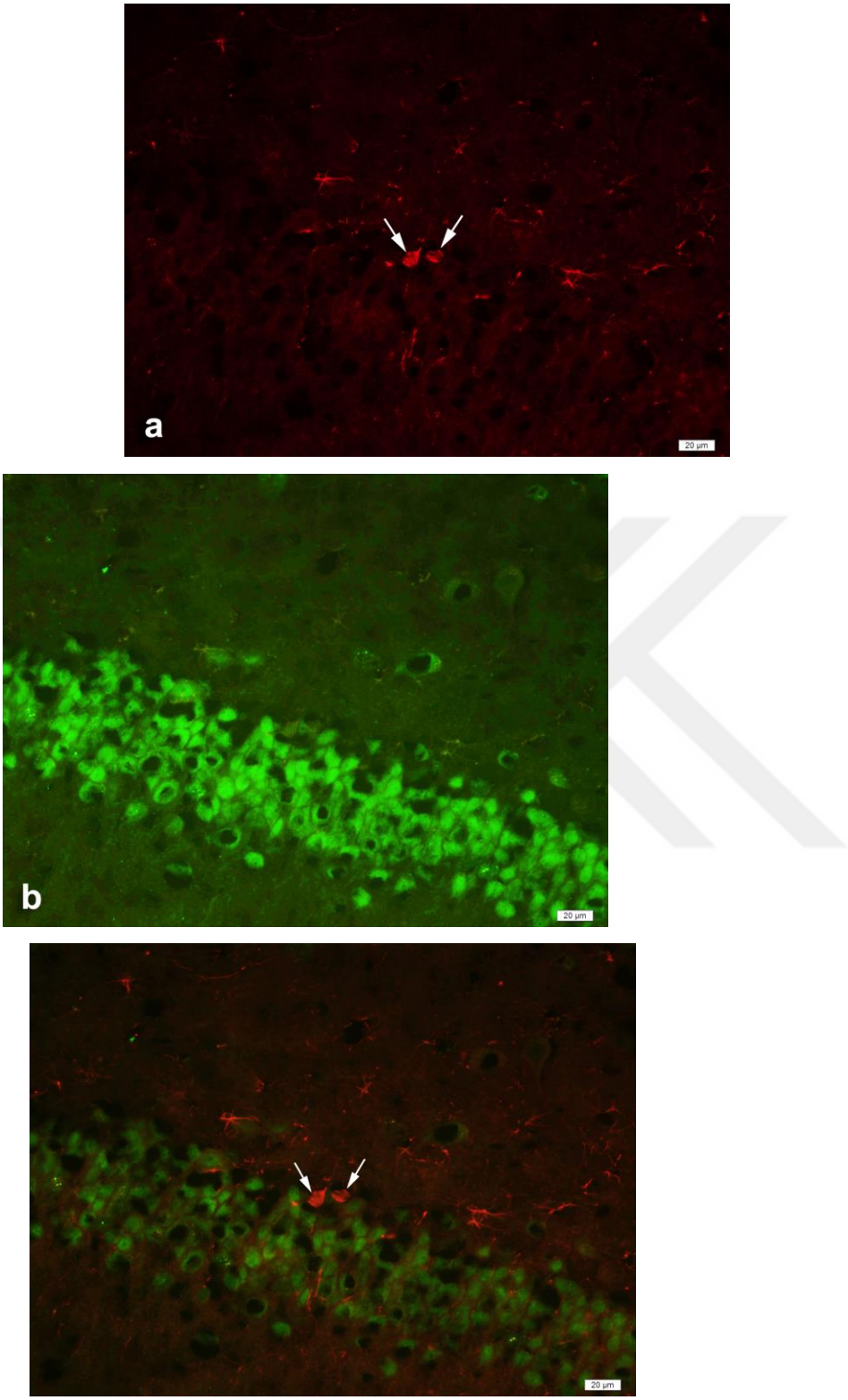
Resim 16. Wistar 14. gün PTZ grubu. DCX-DAPI-GFAP üçlü işaretlenmede DCX-GFAP pozitif hücre kümesi (ok).Orijinalbüyütme: x20.



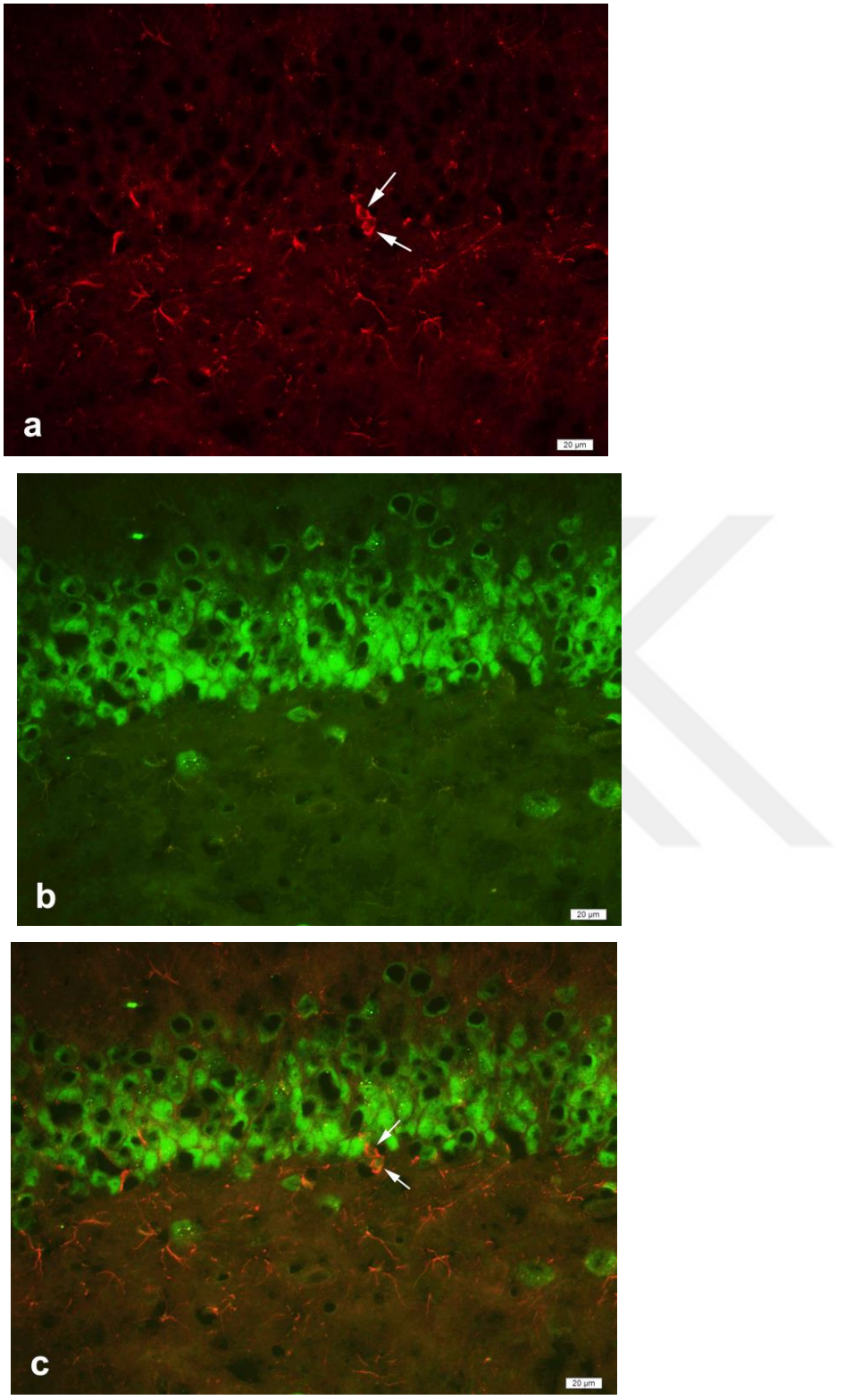
Resim 17. PTZ 14. gün grubu. **(a)** DCX pozitif hücreler(ok),**(b)** DAPI pozitif hücre çekirdekleri, **(c)** GFAP pozitif hücreler. Orijinal büyütme: x20.



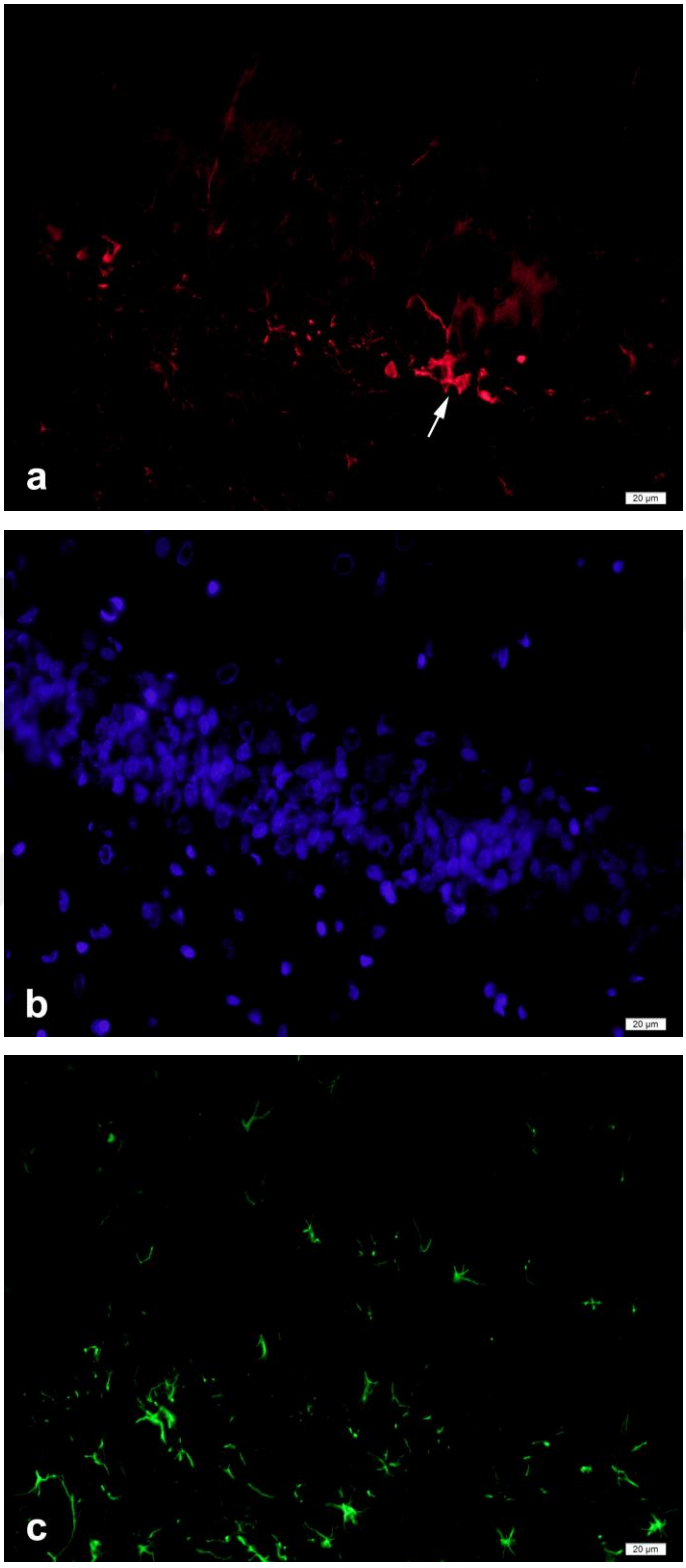
Resim 18. Wistar 14. gün PTZ grubu. DCX-DAPI-GFAP üçlü işaretleme. SGZ'de DCX pozitif ve hilusta DCX-GFAP pozitif hücreler. Orijinalbüyütme: x20.



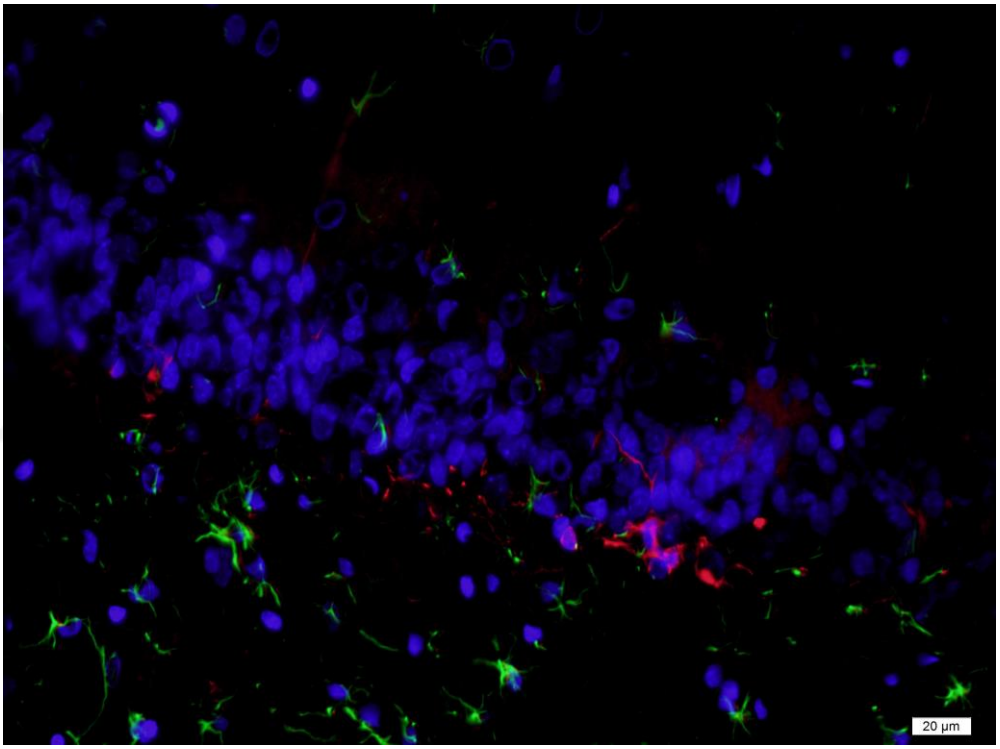
Resim 19. PTZ 14. gün grubu. **(a)** DCX pozitif hücreler (ok), **(b)** NeuN pozitif hücreler, **(c)** DCX pozitif,NeuN negatif hücreler (ok). Orijinal büyütme: x20.



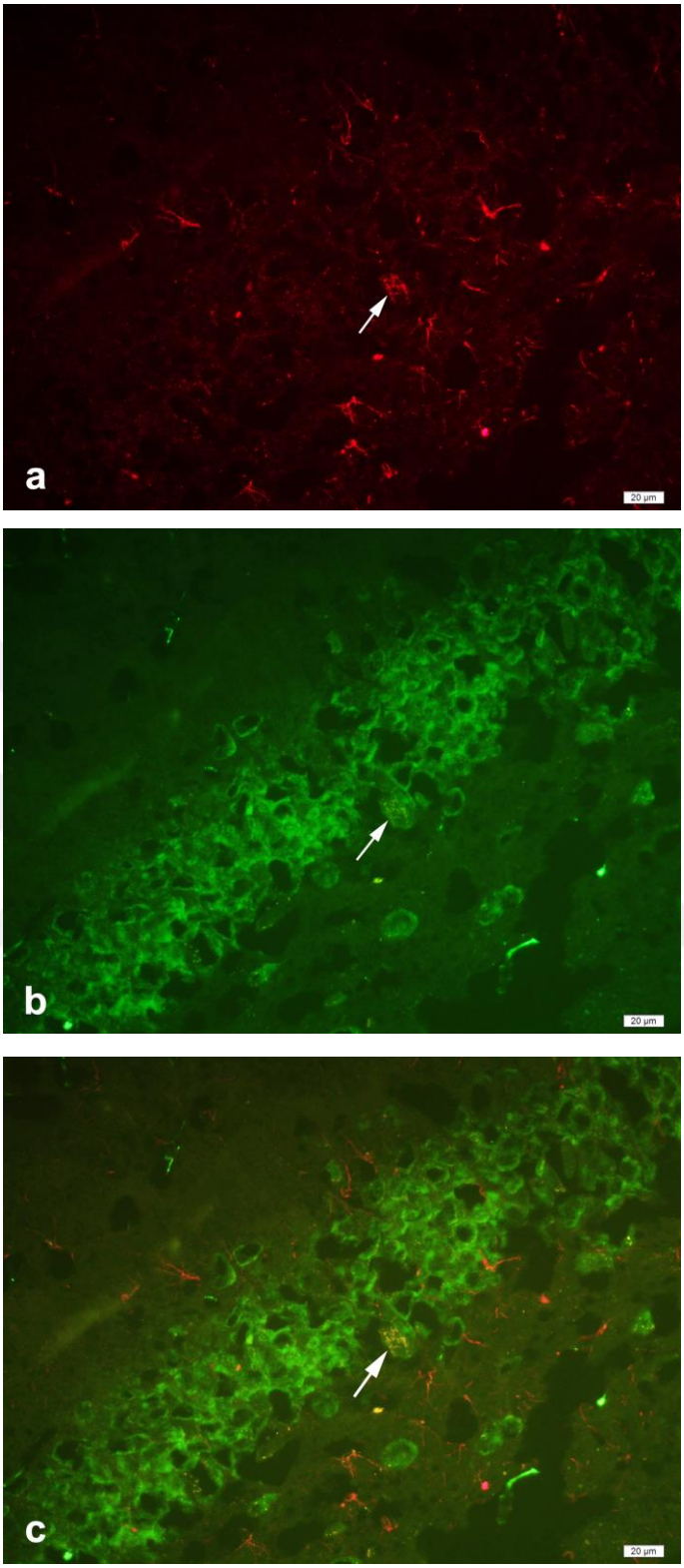
Resim 20. PTZ 14. gün grubu. **(a)** DCX pozitif hücreler(ok),**(b)**NeuN pozitif hücreler, **(c)**DCX-NeuN ikili işaretlenen hücreler(ok). Orijinal büyütme: x20.



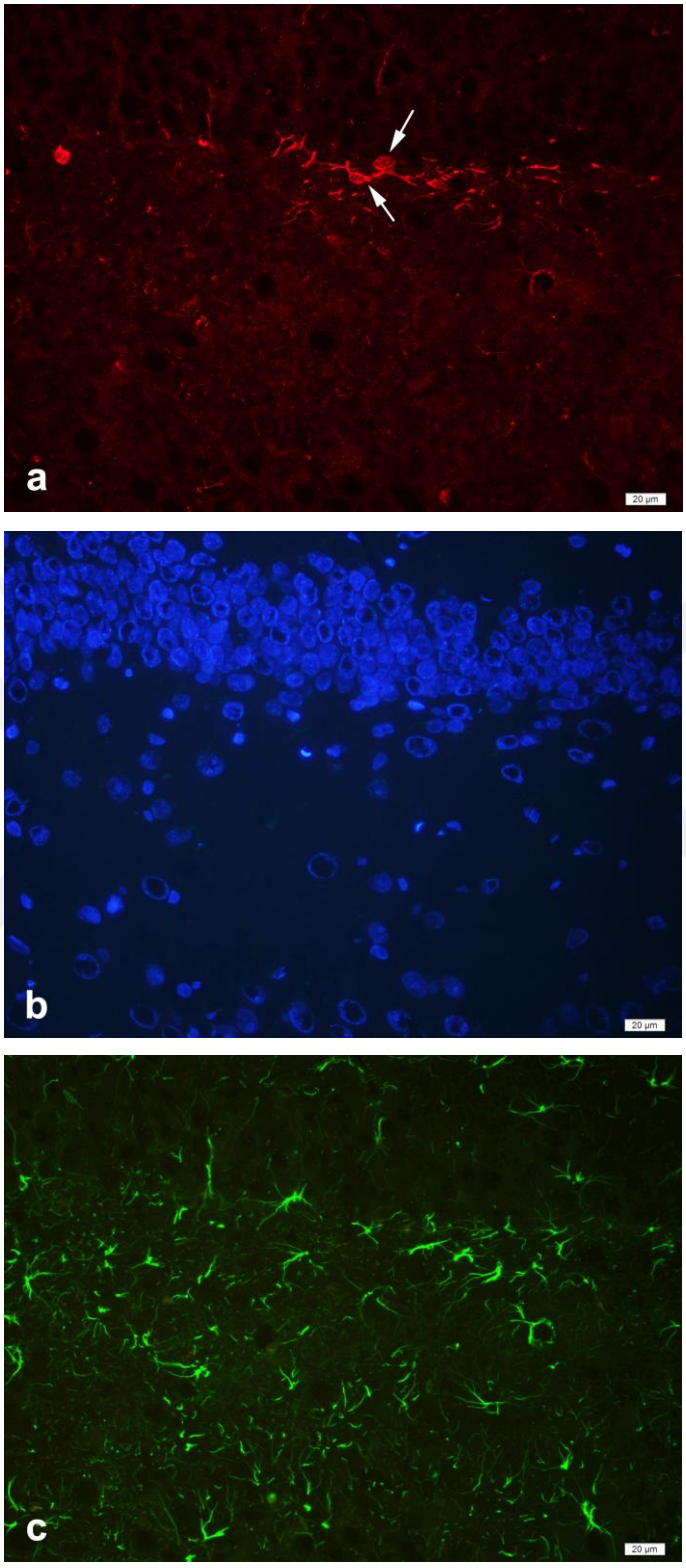
Resim 21.GAERS 7. gün yalancı-opere grubu, DCX-GFAP ikili immünfloresan boyama. **(a)** DCX pozitif hücrekümesi (ok), **(b)** DAPI pozitif hücre çekirdekleri, **(c)** GFAP pozitif hücreler. Orijinal büyütme: x20.



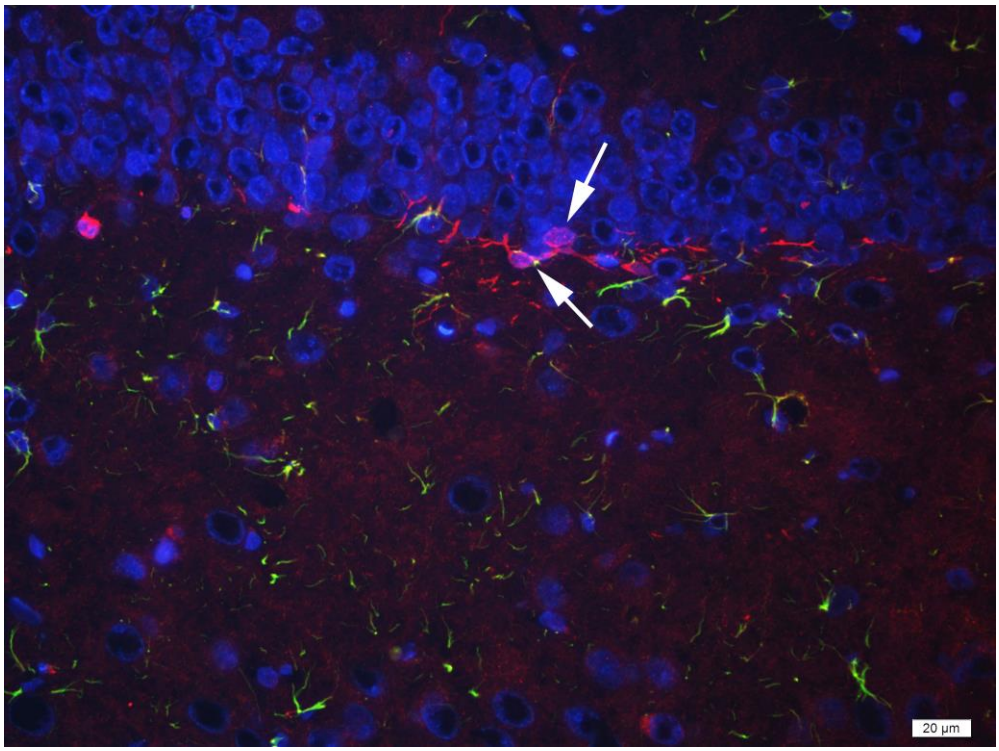
Resim 22.GAERS 7.gün yalancı-opere grubu,DCX-DAPI-GFAP üçlü işaretlemede DCX pozitif hücre kümesi ve granüler tabaka ile moleküler tabakada bulunan DCX pozitif dendritik uzantılar. Orijinal büyütme x20.



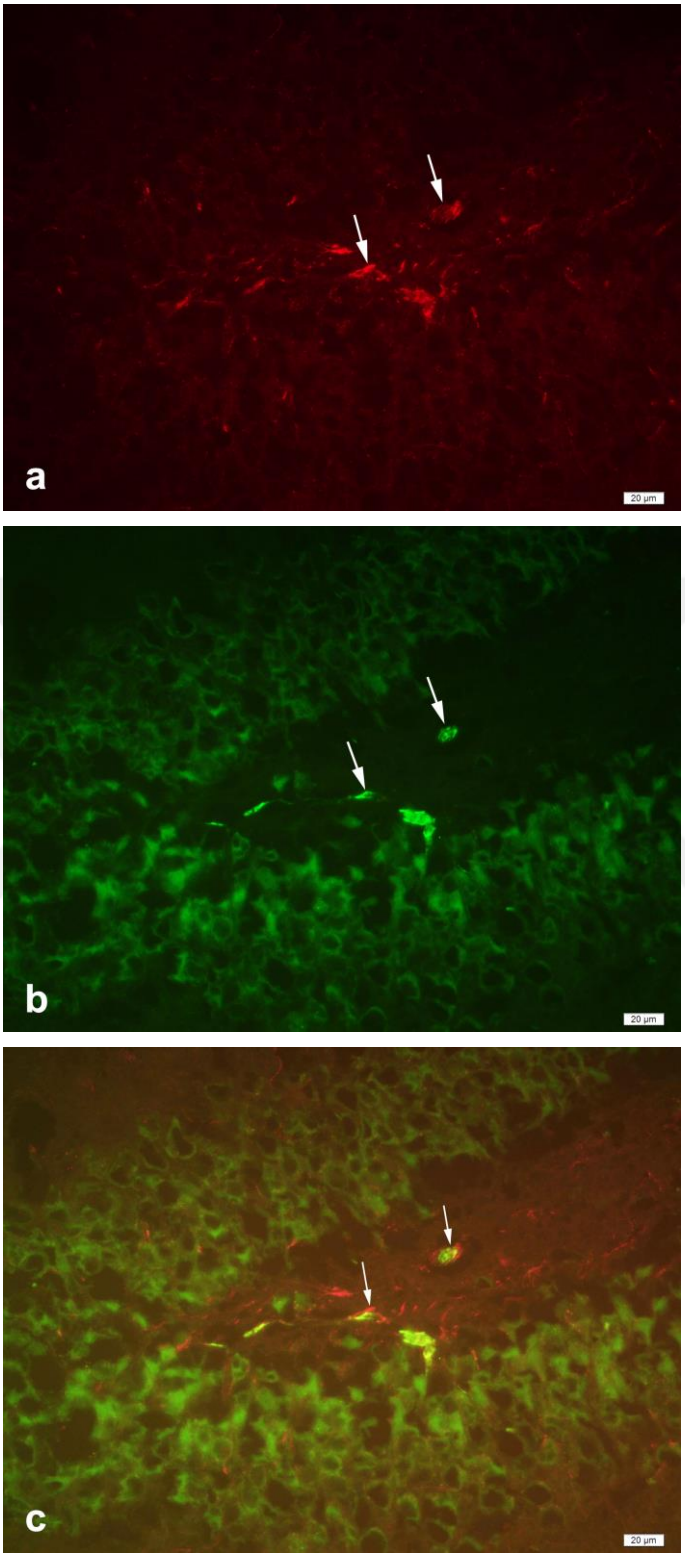
Resim23.GAERS 7.gün yalancı-opere grubu, DCX-NeuN ikili immünfloresan boyama.**(a)** DCX pozitif hücre kümesi (ok), **(b)** NeuN pozitif hücre kümesi (ok), **(c)** DCX-NeuN ikili işaretlenen hücre kümesi (ok). Orijinal büyütme x20.



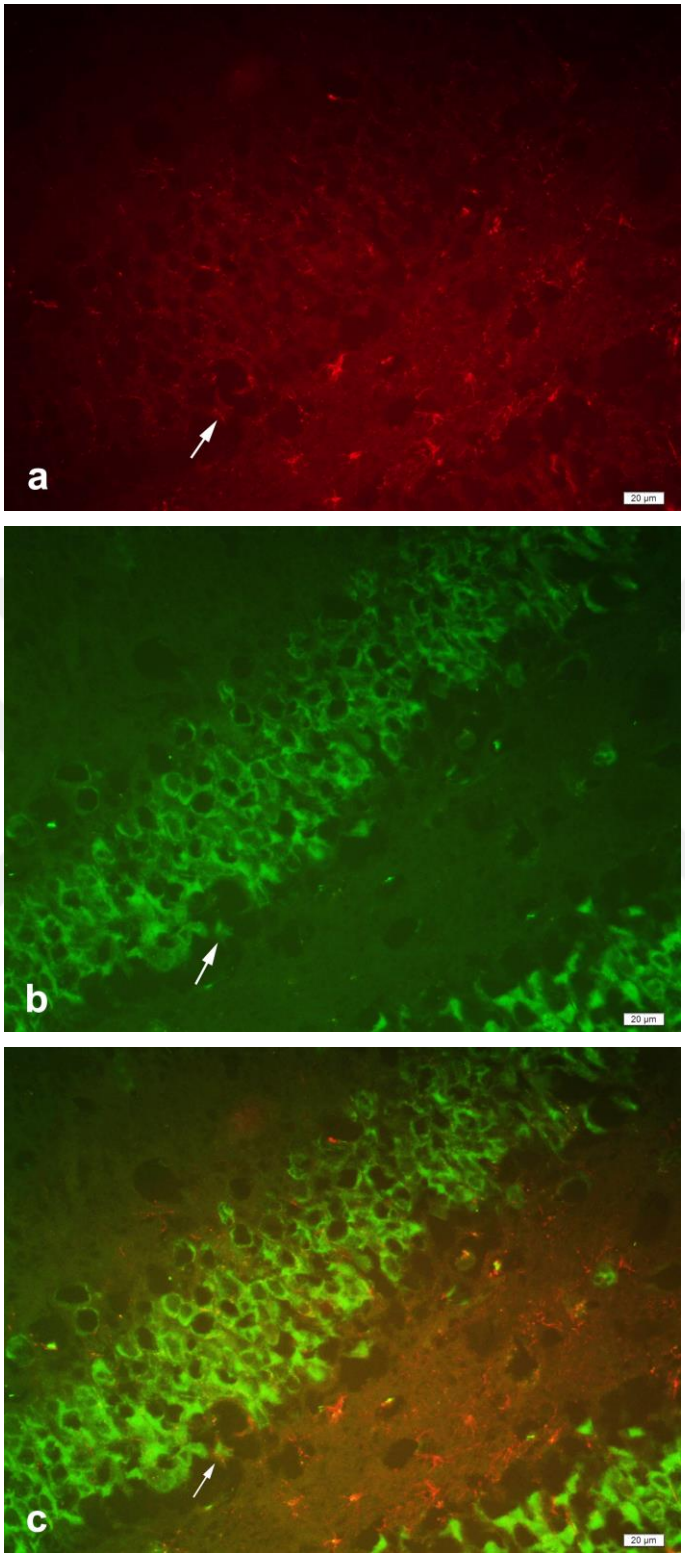
Resim 24. GAERS 14. gün yalancı-opere grubu, DCX-GFAP ikili immünfloresan boyama. **(a)** DCX pozitif hücreler(ok), **(b)** DAPI pozitif hücre çekirdekleri, **(c)** GFAP pozitif hücreler. Orijinal büyütme: x20.



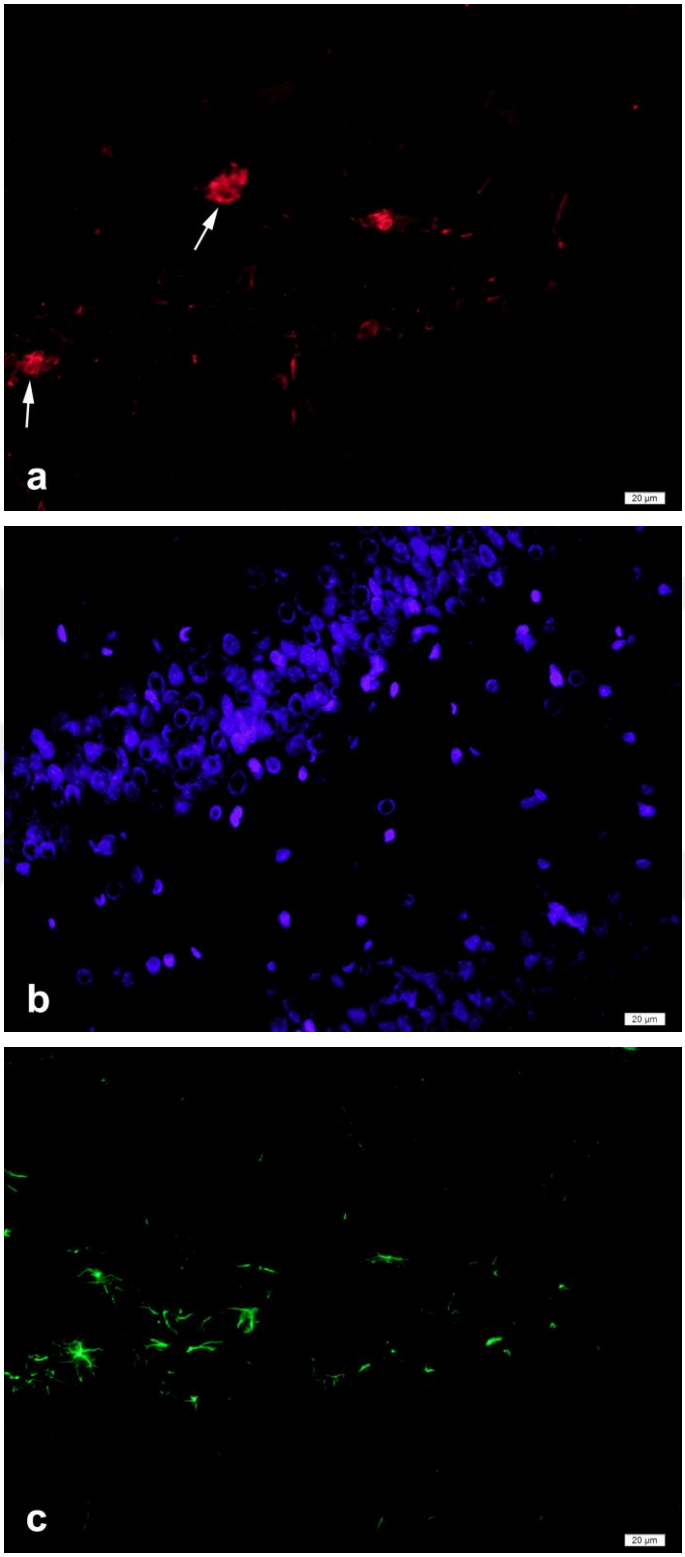
Resim 25. GAERS 14.gün yalancı-opere grubu, DCX-DAPI-GFAP üçlü işaretlenme. SGZ'de DCX pozitif hücreler (ok). Orijinal büyütme x20.



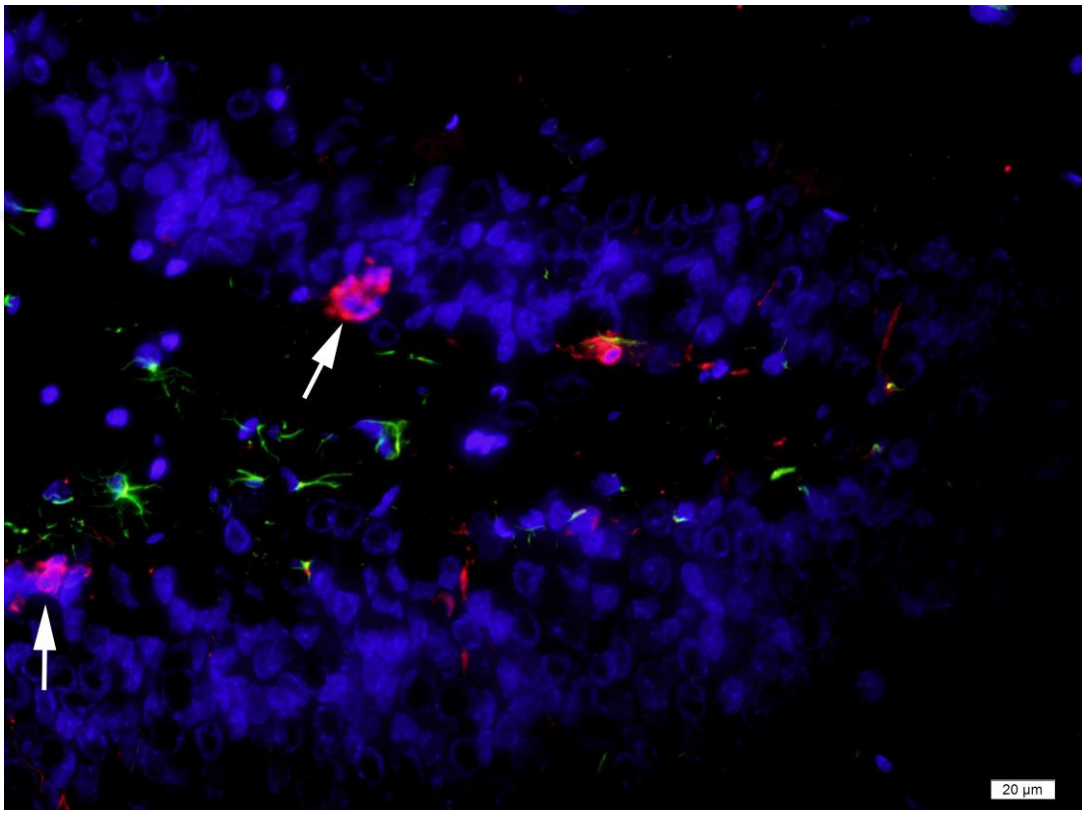
Resim 26.GAERS 14.gün yalancı-opere grubu, DCX-NeuN ikili immünfloresan boyama.**(a)** DCX pozitif hücreler(ok), **(b)** NeuN pozitif hücreler (ok), **(c)** HilustaDCX-NeuN ikili işaretlenen hücreler (ok). Orijinal büyütme x20.



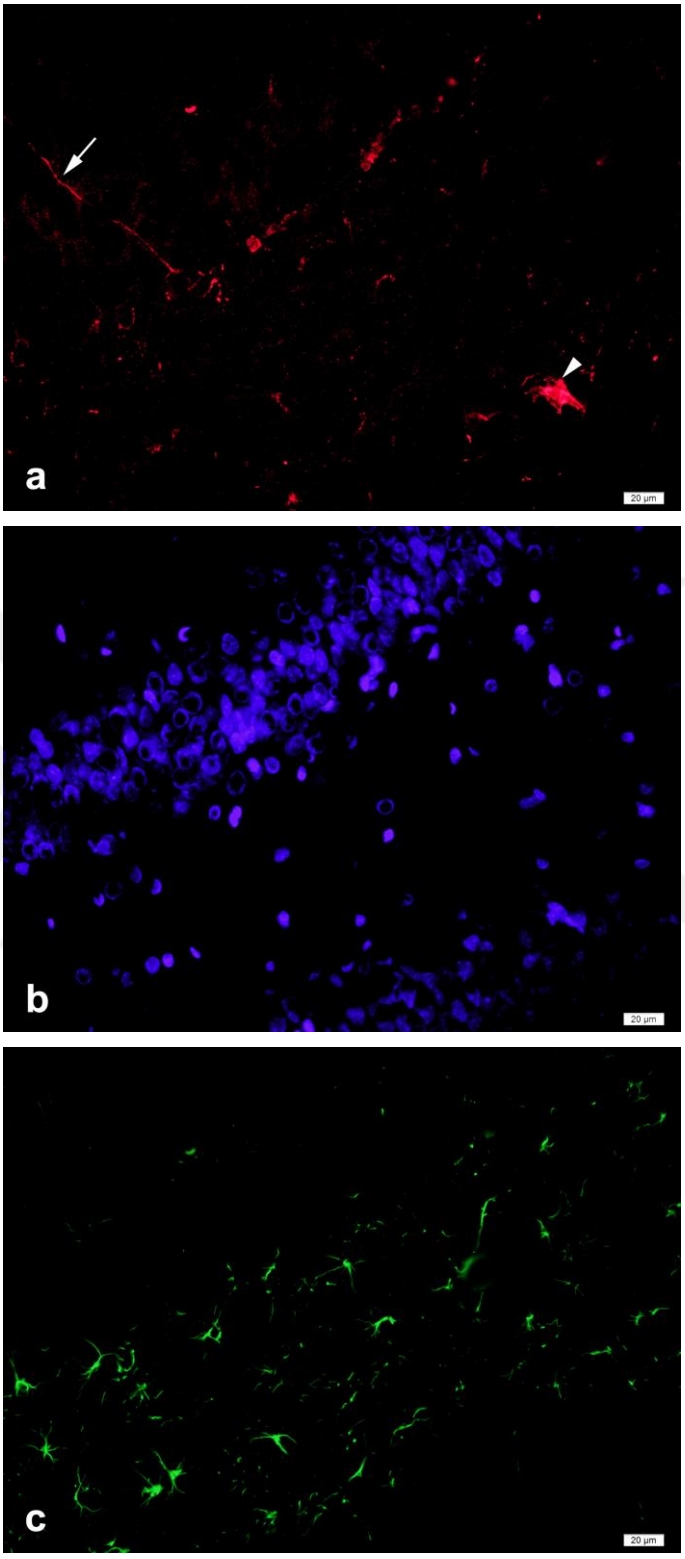
Resim 27.GAERS 14.gün yalancı-opere grubu, DCX-NeuN ikili immünfloresan boyama.**(a)** DCX pozitif hücre(ok), **(b)** NeuN pozitif hücre (ok), **(c)**SGZ'de DCX-NeuN ikili işaretlenen hücre (ok). Orijinal büyütme x20.



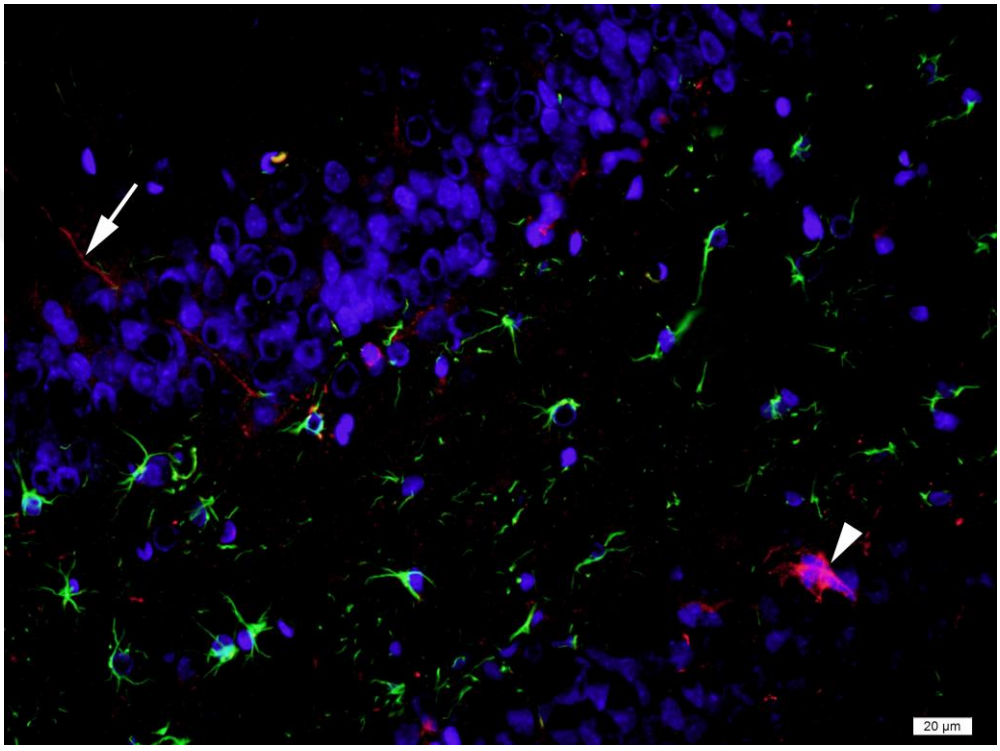
Resim 28.GAERS 7. gün PTZ grubu DCX-GFAP ikili immünfloresan boyama. **(a)** DCX pozitif hücre kümeleri(ok), **(b)** DAPI pozitif hücre çekirdekleri, **(c)** GFAP pozitif hücreler. Orijinal büyütme: x20.



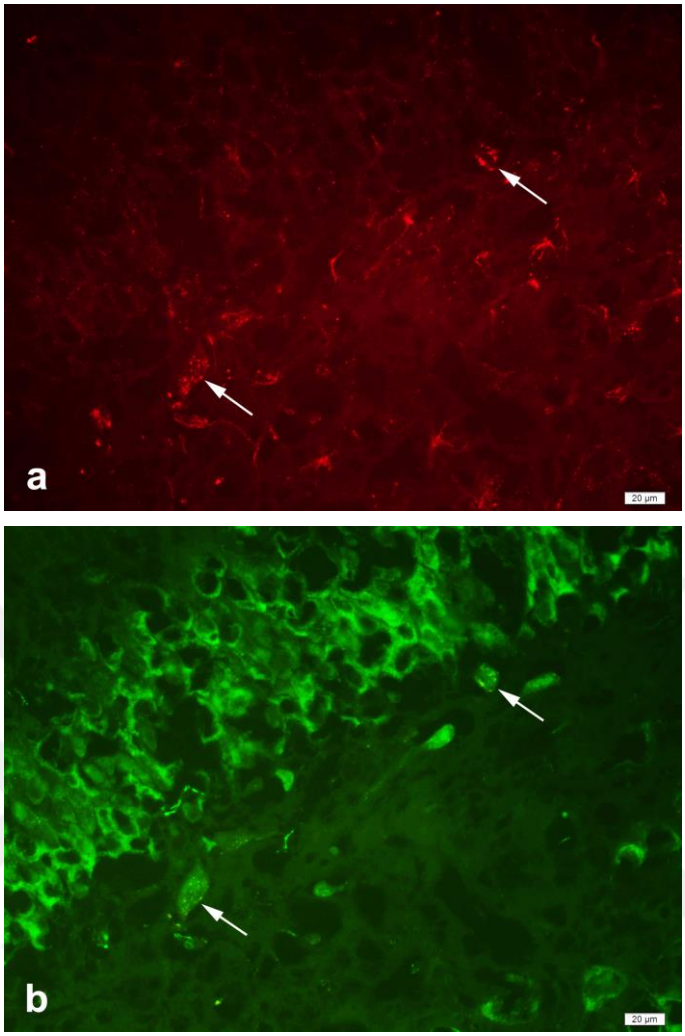
Resim 29. GAERS 7.gün PTZ grubu, DCX-DAPI-GFAP üçlü işaretlenme. DCX pozitif, GFAP negatif hücre kümeleri (ok). Orijinal büyütme x20.



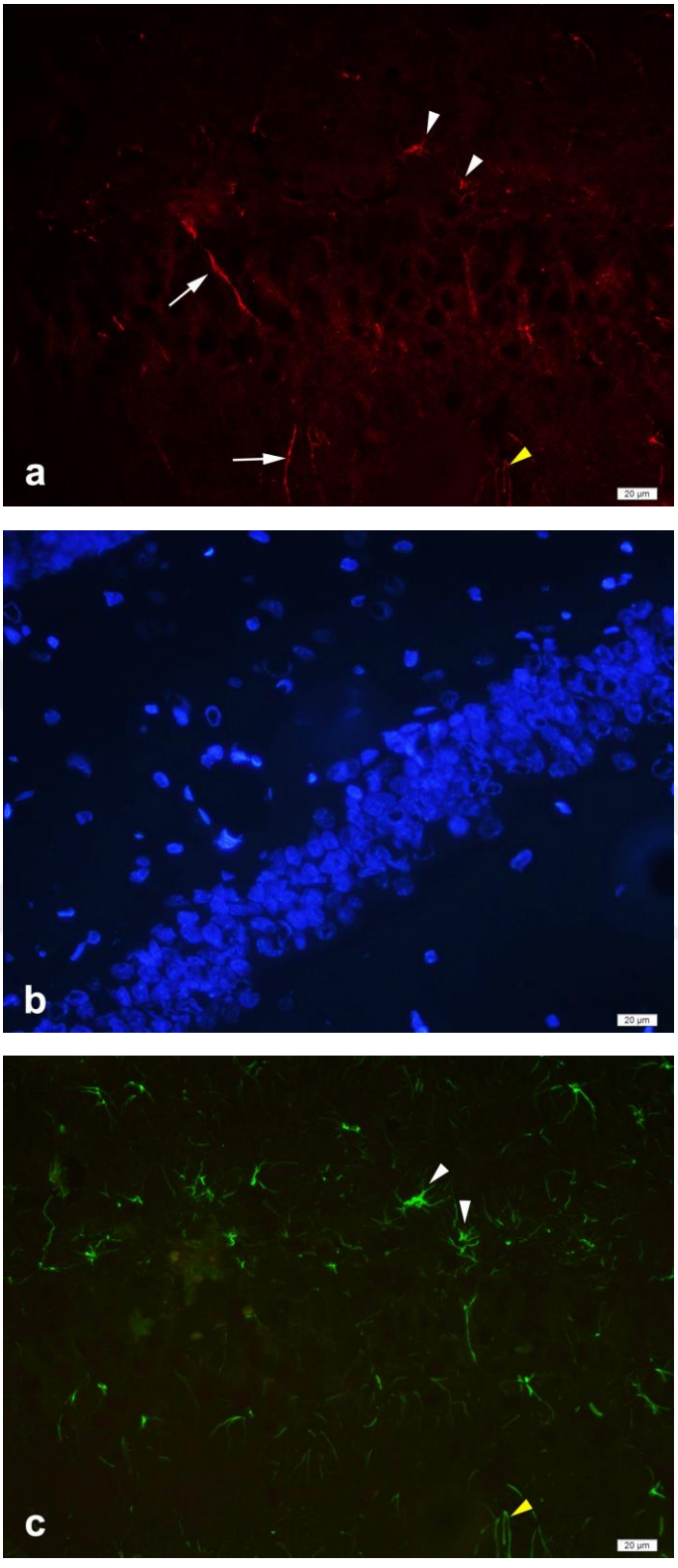
Resim 30.GAERS7. gün PTZ grubu, DCX-GFAP ikili immünfloresan boyama. **(a)** DCX pozitif hücre kümesi(ok başı) ve hücre uzantısı (ok),**(b)** DAPI pozitif hücre çekirdekleri, **(c)** GFAP pozitif hücreler. Orijinal büyütme: x20.



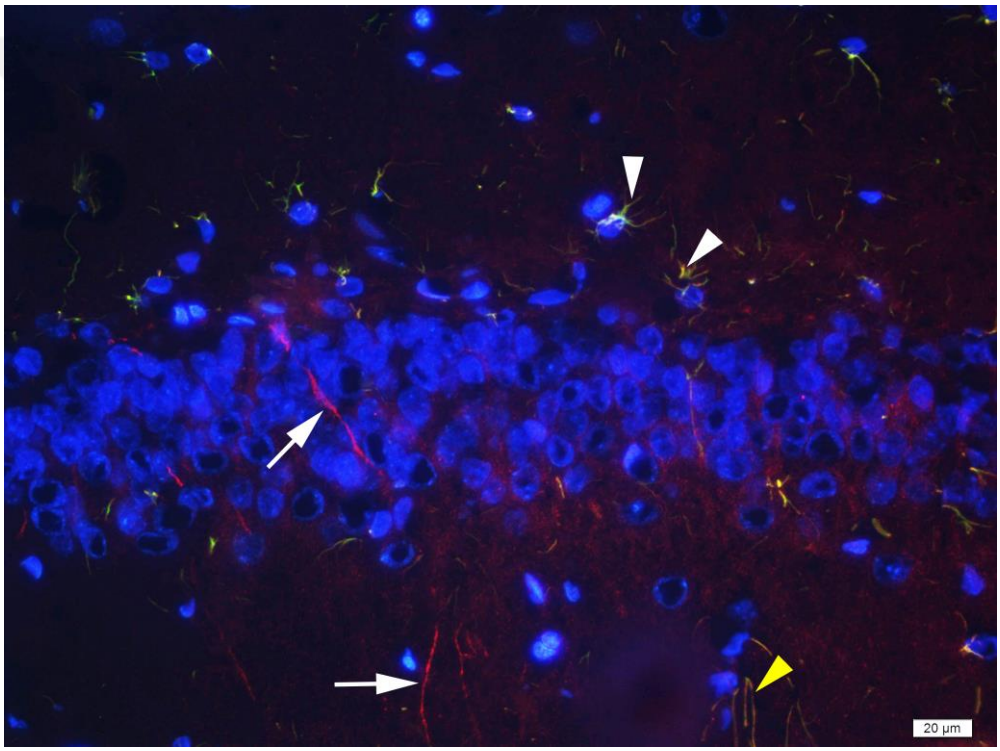
Resim31.GAERS 7.gün PTZ grubu, DCX-DAPI-GFAP üçlü işaretlenme. Moleküler tabakaya uzanan DCX pozitif, GFAP negatif dendritik uzantı(ok) ve DCX pozitif GFAP negatif hücre kümesi (ok başı). Orijinal büyütme x20.



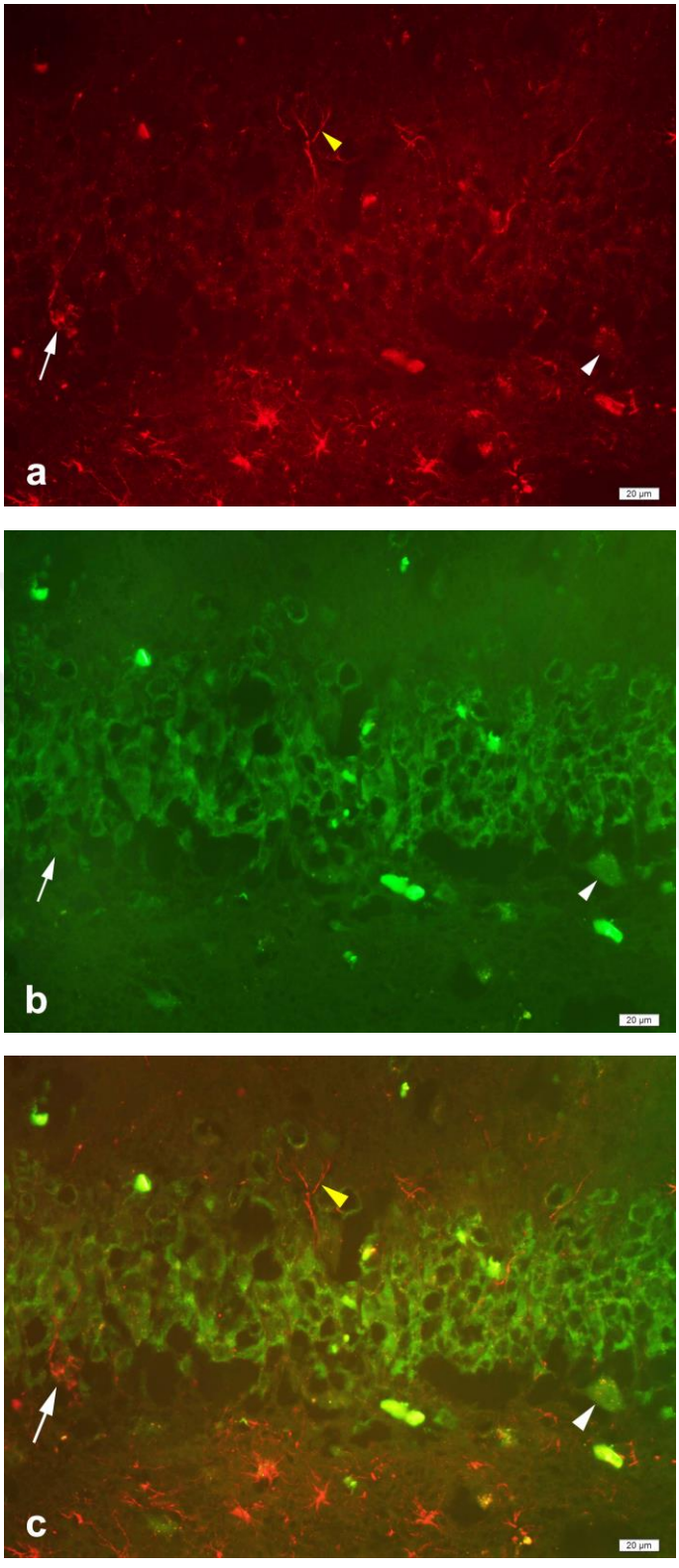
Resim 32.GAERS 7.gün PTZ grubu, DCX-NeuN ikili immünfloresan boyama.**(a)** DCX pozitif hücreler (ok), **(b)** NeuN pozitif hücreler (ok), **(c)** DCX-NeuN ikili işaretlenen hücreler (ok). Orijinal büyütme x20.



Resim 33.GAERS 14.gün PTZ grubu, DCX-GFAP ikili immünfloresan boyama. **(a)** DCX pozitif hücre uzantıları(ok) ve hücreler (ok). Sarı ok başı: Resim c'de işaretlenen GFAP pozitif ve DCX pozitif hücre uzantısı.**(b)** DAPI pozitif hücre çekirdekleri, **(c)** GFAP pozitif hücreler (beyaz ok başı). Sarı ok başı: GFAP pozitif hücre uzantısı. Orijinal büyütme: x20.



Resim 34.GAERS 14.gün PTZ grubu, DCX-DAPI-GFAP üçlü işaretlenme. Moleküler tabakaya uzanan DCX pozitif ve GFAP negatif dendritik uzantı(ok), DCX ve GFAP ikili işaretlenen hücreler (beyaz ok başı) ve DCX-GFAP ikili işaretlenen hücre uzantıları (sarı ok başı). Orijinal büyütme x20.



Resim 35.GAERS 14.gün PTZ grubu, DCX-NeuN ikili immünfloresan boyama.**(a)** DCX pozitif hücre kümesi (ok) ve hücre uzantısı (sarı ok başı). Beyaz ok başı: Resim c'de DCX ve NeuN ikili işaretlenen DCX pozitif hücre.**(b)** NeuN pozitif hücre kümesi (ok) ve hücre (ok başı).**(c)** Sitoplazmada DCX-NeuN ikili işaretlenen hücre (beyaz ok başı). Sarı ok başı: Moleküler tabakaya uzanan DCX pozitif, NeuN negatif hücre uzantısı, ok: DCX pozitif, NeuN negatif hücre kümesi. Orijinal büyütme x40.

7. TARTIŞMA VE SONUÇ

Çalışmamızda GAERS ve kontrol Wistar albino suşu sıçanlara gün aşırı 35 mg/kg subkutan yol ile PTZ enjeksiyonu yapılarak kimyasal kindling modeli oluşturuldu ve nöbet gelişim evreleri Racine skalasına göre değerlendirildi. Beş kez evre 5 nöbet geçiren Wistar ve GAERS suşu sıçanlar kindled olarak kabul edildi. Son evre 5 nöbetten sonra hayvanlar 7. ve 14. günlerde intrakardiyak perfüzyon işlemi ile sakrifiye edildi. DCX-GFAP ve DCX-NeuN ikili immünfloresan işaretleme ile hipokampal DG bölgesinde nörogenez varlığı araştırıldı. Kontrol gruplarına göre PTZ gruplarında, GAERS kontrol grubunda Wistar kontrol grubuna göre nörogenez artışı saptandı. Tüm gruplarda yeni doğan nöron belirteci olan DCX pozitif hücrelerin bazılarının aynı zamanda GFAP veya NeuN da içerdikleri görüldü.

Erişkin beyninde nörogenez iki ana bölgede gözlenmektedir. Bu bölgelerden biri SVZ, diğeri ise hipokampusun DG bölgesindeki SGZ'dir(Altman ve ark., 2012). Çalışmamızdaki tüm gruplarda literatürle uyumlu olarak DG SGZ'de DCX pozitif hücrelerin bulunduğu saptanmış ve bunların yeni doğan nöral progenitör hücreler olduğu düşünülmüştür.

GAERS suşu sıçanların elektriksel kindlinge dirençli oldukları daha önce yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Eşkazan ve ark., 2002). Ancak, çalışmamızda TLE modeli oluşturulurken, nöbet gelişim evreleri gözlemlerinde Wistar ve GAERS suşu hayvanlar arasında PTZ'ye yanıtta farklılıklar görülmüştür. Elektriksel kindlinge dirençli olan GAERS suşu sıçanların, PTZ enjeksiyonlarına dirençli olmadıkları, aksine Wistar kontrole göre daha duyarlı oldukları, ilk PTZ enjeksiyonunda evre 5 nöbet geçirdikleri, Wistar suşu sıçanların ise ilerleyen PTZ enjeksiyonlarında evre 5 nöbet geçirdiği gözlenmiştir. PTZ bir GABAA reseptör antagonistidir ve deneysel epilepsi modellerinde hayvanlarda epileptik nöbet oluşturmada kullanılmaktadır (Park ve ark., 2006; Rogawski ve Loscher, 2004). PTZ, GABAA reseptörüyle etkileşerek GABA ile yönlendirilen klor akımını azaltmaktadır (Huang ve ark., 2001). GAERS suşu hayvanlarda retiküler talamik çekirdekten talamusa gelen GABAerjik projeksiyonların diken-dalga deşarjı oluşumunda rolü olduğu bildirilmiş, mikrodiyaliz yöntemiyle talamusta

ekstraselüler GABA artışı olduğu saptanmıştır (Danober ve ark., 1998; Richards ve ark., 1995). GAERS suşunda GABAerjik mekanizmalarda artış olması nedeniyle, çalışmamızda bir GABAA reseptör antagonisti olan PTZ'nin bu suşa uygulanmasıyla GABAerjik sistem baskılanmış ve hayvanların nöbete duyarlılıklarında artış ve Wistar kontrollere göre farklılık gözlenmiş olabilir. Yapılan bir çalışmada GAERS'lerin GABAA reseptör antagonistlerine duyarlı oldukları, konvülziyon oluşturmak için kontrollere kıyasla daha düşük doza ihtiyaç duyulduğu bildirilmiştir (Vergnes ve ark., 2000). Çalışmamızın bulguları litaretürle uyumlu bulunmuş, GAERS suşu sıçanlar Wistar kontrollere göre daha az sayıda PTZ enjeksiyonla evre 5 nöbet geçirmişlerdir. Benzer şekilde, Brailowsky ve ark. GABA yoksunluğu sendromu oluşturulmuş GAERS'lerde PTZ ile indüklenen konvülzif nöbet insidansının daha fazla olduğunu bildirmişlerdir (Brailowsky ve ark., 1999). Araştırmacılar genetik absans epilepsili sıçanların GABA yoksunluğuna ve PTZ ile indüklenen konvülziyonlara olan kortikal duyarlılıklarındaki artışı, bu hayvanlarda görülen diken-dalga deşarjları ile ilişkilendirmişlerdir.

Yapılan çalışmalar nöbetlerin nörogenezi arttırdığını göstermektedir (Brailowsky ve ark., 1999). Kainik asit ve pilokarpin ile oluşturulan TLE modelinde hipokampal DG hücre proliferasyonunda artışa rastlanmıştır (Parent, 1997; Gray, 1998). Kronik temporal lob epilepsisinde ise hipokampusta nörogenez azalmaktadır (Fahner, 2007). Absans epilepsi modellerinde yapılan çalışmalarda gama-hidroksibütirat, AY-9944 ve WAG/Rij modelleri kullanılmış ve bu çalışmalarda farklı sonuçlar elde edilmiştir (Scott ve ark 2010; Russo ve ark 2013). Bunun nedeni kullanılan modellerin farklı olmasından kaynaklanıyor olabilir. (Scott ve ark. 2010) absans epilepsili grup ile kontrol grubunda nörogenez açısından farklılık gözlememişlerdir; ancak kullandıkları TLE modeli olan kindling grubunda nörogenez artışı saptamışlardır. Çalışmada absans epilepside diken-dalga deşarjı frekansının nörogenez artışı için yeterli olamayabileceği sonucuna varılmıştır. Aynı çalışmada kullanılan kindling modelindeki hücre artışı, hücre ölümü ile de ilişkilendirilmiştir. Absans epilepsi modelinde ise hücre ölümü gözlenmemiştir. Çalışmamızda absans epilepsi modeli olarak GAERS suşu sıçanlar kullanıldı. Bu modelde hipokampusun dentat girus SGZ'de Wistar kontrollere göre

daha fazla DCX pozitif hücre görüldü ve nörogenezin daha fazla olduğu şeklinde yorumlandı. Bizim çalışmamız ve Scott ve ark.nın çalışması arasındaki farklılığın sebebi, farklı absans epilepsi modelleri kullanılması ve farklı histolojik yöntemler uygulanması olabilir. Scott ve ark. çalışmalarında BrdU enjeksiyonu uygulamışlar, nörogenez belirteci olarak da TUC-4 kullanmışlardır (Scott ve ark., 2010).

Çalışmamızda PTZ uygulanmış Wistar grubunda kendi kontrollerine göre daha fazla DCX pozitif hücreye rastlanmıştır. Ancak, PTZ uygulanmış GAERS grubunda kendi kontrolleriyle ve PTZ uygulanmış Wistar grubuyla kıyaslandığında, SGZ'de daha az DCX pozitif hücre görülmüştür. Bunun nedeni, GAERS grubundaki hayvanların PTZ uygulamasıyla daha hızlı evre 5 nöbete ulaşmaları ve Wistar PTZ grubuna kıyasla nörogenez için yeterli zaman bulunmaması olabilir. Bu yöndeki bulgularımız, nöbet türünün de nörogenezi etkileyen faktörlerden biri olabileceğini düşündürmektedir. Çalışmamızın sonuçları GAERS ve nörogenez ilişkisini göstermesi bakımından literatürdeki eksikliğe katkıda bulunmaktadır. Literatürde GAERS suşu ve nörogenez ilişkisini gösteren bir çalışma bulunmamaktadır.

Literatürde DCX pozitif hücrelerde aynı zamanda GFAP pozitifliğinin de görülmesi tartışmalı bir konudur. Bazı çalışmalarda yeni doğan DCX pozitif progenitör hücrelerin GFAP eksprese ettiği bildirilse de, bazı çalışmalar immünhistokimyasal olarak bu iki proteinin birlikte bulunmadıklarını bildirmiştir (Garcia ve ark., 2004). Liu ve ark. normal ve epilepsili insan beyninde, Brown ve ark. ise erişkin sıçanlarda yaptıkları çalışmalarda DCX-GFAP birlikteliğine rastlamamışlardır (Liu ve ark., 2008; Brown ve ark., 2003). Capela ve ark. yaptıkları çalışmada bazı ependimal hücrelerin nöral progenitörler olduğunu göstermiş, diğer in vivo ve in vitro çalışmalarda ise ependimal hücrelerin nöral progenitörler olduğu doğrulanmamıştır (Capela ve ark., 2002; Lawyell ve ark., 2000). Başka bir çalışmada erişkin nöral progenitörlerin GFAP sentezledikleri ve ince-yapısal düzeyde astroglia özelliği gösterdikleri bildirilmiştir (Garcia ve ark., 2004). Retroviral olarak uygulanan transgenlerin kullanıldığı tekli hücre soy analizleri, postnatal ve erişkin SEZ ve SGZ'deki nöral progenitörlerin bir kısmının in vivo ve in vitro GFAP eksprese ettiğini göstermektedir(Doetsch ve ark., 1997).

Yapılan bir çalışmada bazı hastalık durumlarında insan neokorteksinde olgun astrositlerin aynı zamanda DCX de eksprese ettiği gösterilmiş, astrositlerdeki GFAP-DCX birlikteliğinin glia-nöron iletişiminde rol oynuyor olabileceği düşünülmüştür (Verwer ve ark., 2007). Aynı çalışmada progenitör hücrelerde DCX'in punktat benzeri yapılar şeklinde eksprese olduğu da ifade edilmiştir. Literatürde yukarıda bahsedilen bazı çalışmalarla uyumlu olarak, bizim çalışmamızda da tüm gruplarda, özellikle DG hilus bölgesinde DCX pozitif astrosit benzeri hücreler görülmüştür ve bu hücrelerde aynı zamanda GFAP pozitifliği de izlenmiştir. Hilusta ve SGZ'de yerleşen GFAP negatif bazı hücrelerde ise DCX'in Verwer ve ark.nın ifade ettiği şekilde punktatlar oluşturduğu izlenmiştir. SGZ'de multipotent nöral progenitörlerdeki GFAP varlığının fonksiyonu bilinmemektedir. Çalışmamızda 14 gün PTZ Wistar grubunda SGZ'de DCX ve GFAP pozitif hücrelere rastladık ve bu hücrelerin bipolar morfoloji gösterdiklerini izledik. Benzer şekilde, Garcia ve ark. da GFAP eksprese eden erişkin multipotent nöral progenitörlerin in vivo erişkin nörogenezinin başlıca kaynağı olduğunu ve bipolar ya da unipolar morfoloji gösterdiklerini, non-nörojenik multipolar astrositlere kıyasla daha az uzantı içerdiklerini bildirmişlerdir (Garcia ve ark, 2004.). Bu bulgular, GFAP eksprese eden nöral progenitörlerin astrositlerden farklı olduklarını düşündürmektedir. Çalışmamızda hem nöral progenitör olduğunu düşündüğümüz hücrelerde, hem de olgun astrosit özelliği gösteren hücrelerde DCX ve GFAP birlikteliğini gösterdik. 1987 yılında yaptıkları çalışmada Rickman ve ark. SGZ'deki GFAP eksprese eden progenitörlerin radyal glial hücrelerden de köken alabildiklerini ve bu hücrelerin gelişimin son evrelerine doğru DG göç ettiklerini öne sürmüşlerdir (Rickman ve ark., 1987).

Brown ve ark. 2003 yılında yaptıkları bir çalışmada BrdU enjeksiyonundan sonraki ilk günlerde SGZ'de DCX pozitif hücre kümeleri gözlemişlerdir (Brown ve ark., 2003). Bu çalışma ile uyumlu bir şekilde biz de çalışmamızda GAERS ve Wistar PTZ gruplarında SGZ'de küme halinde DCX pozitif hücreler olduğunu saptadık. Brown ve ark. bu hücrelerin bazılarının belirgin bir uzantıya sahip olmadığını, diğerlerinin ise nöroblasta benzediğini ve uzantılarının granül hücre tabakasına paralel olduğunu gözlemişlerdir. Aynı çalışmada BrdU enjeksiyonundan 7 gün sonra DCX pozitif hücrelerin granül hücre

tabakasına entegre oldukları ve tüm tabakayı geçerek moleküler tabakaya uzandığı izlenmiştir. Biz de çalışmamızda benzer şekilde DCX pozitif hücre uzantılarının PTZ gruplarında granüler tabakayı bu tabakaya dik olacak şekilde geçerek moleküler tabakaya uzandıklarını gözledik. Moleküler tabakaya uzanan dendrit benzeri DCX pozitif yapılar özellikle PTZ gruplarında belirgindi. Bu bulgu, çalışmamızda kullandığımız kimyasal kindling ile oluşturulmuş TLE modelinde, yeni oluşan nöronların da nöbetlerin etkisiyle plastisiteye katkıda bulunuyor olabileceğini düşündürmüştür.

Erişkin kemirgen beyninde yapılan çalışmalarda DCX-NeuN birlikteliği kanıtlanmıştır (Brown ve ark., 2003). (Brown ve ark.2003) çalışmalarında NeuN pozitif hücrelerin Brdu enjeksiyonundan 10 gün sonra DCX eksprese etmeye başladığını, bu ekspresyonun 14. güne kadar devam ettiğini, 14. günden sonra ise ikili işaretlenmenin gözlenmediğini bildirmişlerdir. Başka bir çalışmada DCX pozitif yeni doğan nöronların %8'inin aynı zamanda NeuN da eksprese ettiği bildirilmiştir (Helen ve ark., 2004). Liu ve ark. yaptıkları çalışmada normal insan beyninde DCX-NeuN birlikteliğine rastlamamışlar, fakat epileptik temporal lob korteksinde DCX pozitif hücrelerin %40'ının aynı zamanda NeuN pozitif olduğunu gözlemişlerdir (Liu ve ark., 2008). Bu bulgularına dayanarak, epilepside nörogenezin arttığı ve yeni oluşan nöronların normal beyinde görülen yeni nöronlara göre daha olgun olduğu sonucuna varmışlardır. Biz ise çalışmamızda hem kindling hem de kontrol gruplarında SGZ'de aynı hücrede DCX-NeuN birlikteliğini ortaya koyduk ve bu hücrelerin gelişimlerin daha olgun bir evresinde olabileceğini, hilusta gözlediğimiz DCX-NeuN pozitif hücrelerin ise SGZ'de oluştuktan sonra hilusa göç eden hücreler olabileceklerini düşündük. Ayrıca, Scott ve ark. da absans epilepsi modeli ile yaptıkları çalışmada progenitör nöron belirteci olan TUC-4 ile NeuN birlikteliğine sıkça rastladıklarını bildirmişlerdir (Scott ve ark., 2010). NeuN ekspresyonunun genel olarak olgun nöronların çekirdeğinde görülse de, az da olsa sitoplazmada da görülebildiği bildirilmiştir (Guselnikova ve Korzhevskiy, 2015). NeuN proteininin 46 ve 48 kDa olmak üzere iki izoformunun bulunduğu, bunların her ikisinin de her iki bölgede mevcut olduğu, ancak çekirdek ve sitoplazmadaki göreli konsantrasyonlarında farklılık olduğu bildirilmiştir. Böylece, proteinin her iki izoformu da çekirdekte yaklaşık olarak eşit temsil

edilmektedir. Literatürle uyumlu olarak, biz de çalışmamızda özellikle PTZ gruplarında DCX-NeuN ikili işaretlenme gösteren bazı nöronlarda NeuN pozitifliğini çekirdekte, bazılarında sitoplazmada, bazılarında da hem çekirdek hem sitoplazmada gözledik. Çalışmamızda kullandığımız NeuN antikorunun 46-48 kDa oluşu literatürde verilen bilgiyle uyumludur.

Sonuç olarak, çalışmamızın bulguları genetik absans epilepsili sıçanlarda Wistar kontrollere göre daha fazla nörogenezin mevcut olduğunu göstermiş, bu bulgunun bu suşun elektriksel kindlinge olan dirençleri ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür. Ayrıca, DCX ekspresyonunu hem olgun astrositlerde hem de nöral progenitörlerde gözlemiş olmamız, yeni doğan nöron belirteci olarak çalışmalarda sıklıkla kullanılan bu proteinin nörogeneze spesifik olmadığına işaret etmektedir. Nörogenez çalışmalarında DCX kullanılması durumunda, diğer yeni doğan nöron belirteçleriyle de bulguların desteklenmesi gerektiğini düşünmekteyiz.

8.KAYNAKLAR

Abrous DN, Koehl M, Le Moal M. Adult neurogenesis: from precursors to network and physiology. *Physiol Rev*. 2005; 85: 523-569.

Afifi A.K., Bergman R.A. Functional Neuroanatomy Text and Atlas. 2th Edition. 2005. Lange Medical Books/McGraw-Hill.

Ali A, Ahmad FJ, Pillai KK, Vohora D. Amiloride protects against pentylenetetrazole-induced kindling in mice. British journal of pharmacology, 2005 145, 7, 880-884.

Akdogan I, Yonguc NG Experimental epilepsy models and morphologic alterations of experimental epilepsy models in brain and hippocampus, underlying mechanisms of epilepsy, InTech, 2001,15, 269-282.

Altman j, Hutchinson R, Petrlova J, Budamagunta MS, Tetali SD, Lagerstedt JO,VossJC,RutledgeJC.PLoSOne.2012;7(11):e50513.doi:10.1371/journal.pone.005 0513. Epub 2012 Nov 28.

Altman J, Das GD. Autoradiographic and histological evidence of postnatal Altman JJ., 1969, "Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis.IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb", Journal of Computational Neurology, Vol. 137, No. 4, pp. 433-57.hippocampal neurogenesis in rats. J Comp Neurol. 1965;124: 319-335.

Avanzini G, Franceshetti S. Cellular biology of epileptogenesis. The Lancet Neurology (2003) 2:33-39.

Bertram EH. Temporal lobe epilepsy: Where do the seizures really begin Epilepsy & Behav. (2009) 14:32–7.Neuroscience. 1999;93(3):1173-7.

Bengzon J, Kokaia Z, Elmér E, Nanobashvili A, Kokaia M, Lindvall O. Apoptosisand proliferation of dentate gyrus neurons after single and intermittent limbic seizures. Proc Natl Acad Sci USA. 1997;94(19): 10432-10437.

Brailowsky S1, Montiel T, Boehrer A, Marescaux C, Vergnes P. Transient Expression of Doublecortin during Adult Neurogenesis The Journal of Comparative Neurology 467:1-10 (2003).

Brown, Bastien, Cristiana, Cooper, Wınkler, H.Kuhni Transient Expression of Doublecortin during Adult Neurogenesis The Journal of Comparatıve Neurology (2003) 467;1-10

Balu DT, Lucki I. Adult hippocampal neurogenesis: regulation, functional implications, and contribution to disease pathology. *Neurosci Biobehav Rev*. 2009; 33: 232-252.

Cameron, H.A, McKay R.D. Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus. J. Comp. Neurol. (2001) 435:406–417.

Castel-Branco MM, Alves GL, Figueiredo IV, Falcão AC, Caramona MM. The maximal electroshock seizure (MES) Model in the preclinical assessment of potential new antiepileptic drugs. Methods Find Exp Clin Pharmacol, 2009 31, 2, 101 106.

Capela, A. & Temple, S. LeX/ssea-1 is expressed by adult mouse CNS stem cells.2002; 438:409–419.

Corda MG, Orlandi M, Lecca D, Carboni G, Frau V, Giorgi O . Pentylenetetrazol-induced kindling in rats: effect of GABA function inhibitors. Pharmacology Biochemistry and Behavior, 1991.40, 2, 329-333.

Corda MG, Orlandi M, Lecca D, Giorgi O (1992). Decrease in GABAergic function induced by pentylenetetrazol kindling in rats: antagonism by MK-801. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 262, 2, 792-800.

Clark PJ, Kohman RA, Miller DS, Bhattacharya TK, Haferkamp EH and Rhodes JS. Adult hippocampal neurogenesis and c-Fos induction during escalation of voluntary wheel running in C57BL/6J mice. Behav Brain Res. (2010) December 1; 213(2): 246–252.

Danober., K. Obernier, A. Alvarez-Buylla, 1998 "Adult neural stem cells bridge their niche", Stem Cell, Vol. 10, pp. 698-708.

Davoudi M, Shojaei A, Palizvan MR, Javan M, Mirnajafi-Zadeh. Comparison between standard protocol and a novel window protocol for induction of pentylenetetrazol kindled seizures in the rat. Epilepsy Res, (2009) 106, 54-63.

Dayer AG, Ford AA, Cleaver KM, Yassaee M, Cameron HA. Short-term and long-term survival of new neurons in the rat dentate gyrus, J. Comp. Neurol. (2003) 460:563– 572.

Devinsky Orrin 1, Annamaria Vezzani2, Terence J. O'Brien3,4,5, Nathalie Jette6, Ingrid E. Scheffer7,8,9, Marco de Curtis10 and Piero Perucca3,4,5 Nature rewiew disease primers 2018 208-05-03 10 10.38/nrdp.24.

Doi T, Ueda Y, Nagatomo K, Willmore LJ Role of glutamate and GABA transporters in development of pentylenetetrazol-kindling. Neurochem Res, 34, 7, 2009 1324-31.

Doetsch F, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Cellular compositionand three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. J Neurosci 1997 17:5046–5061.

Dhir, GABA regulates synaptic integration of newly generated neurons in the adult brain. Nature 2012;439: 589-593.

Ekonomou A, Smith AL, Angelatou F. Changes in AMPA receptor binding and subunit messenger RNA expression in hippocampus and cortex in the pentylenetetrazole-induced 'kindling'model of epilepsy. Molecular brain research, (2001). 95, 1, 27-35.

Engel J.Jr. Intractable epilepsy: Definition and neurobiology. Epilepsia (2001) 42:3. Seizures and epilepsy. Oxford University Press, New York

Eskazan E, Onat FY, Aker R, Oner G. Resistance to propagation of amygdaloid kindling seizures in rats with genetic absence epilepsy. Epilepsia (2002) 43(10):1115–1119.

Erdoğan F, Küçük A, Gölgeli A (2006). The assesment of the features of seizures and EEG in pentylenetetrazol-induced kindling. Journal of Neurological Sciences, 23, 2, 084-092.

Eraković V, Župan G, Varljen J, Laginja J, Simonić A. Altered activities of rat brain metabolic enzymes caused by pentylenetetrazol kindling and pentylenetetrazol-induced seizures. Epilepsy research, (2001). 43, 2, 165-17

Francis N, Farinas I, Brennan C, Rivas-Plata K, Backus C, Reichardt L, Landis S. NT-3, like NGF, is required for survival of sympathetic neurons, but not their precursors. Dev Biol. 1999;210(2): 411-427.

Fahrner A, Kann G, Flubacher A, Heinrich C, Freiman TM, Zentner J, Frotscher M,Haas CA. Granule cell dispersion is not accompanied by enhanced neurogenesis intemporal lobe epilepsy patients. Exp Neurol 2007;203(2): 320-332

Helen K.C. Yang, Nikki L. Sundholm-Peters, Gwendolyn E. Goings, Avery S. Walker, Kenneth Hyland, and Francis G. SzeleDistribution of Doublecortin Expressing Cells Near the Lateral Ventricles in the Adult Mouse BrainJournal of Neuroscience Research 76:282–295 (2004).

Gage FH. Mammalian neural stem cells. Science 2000;287: 1433-1438.

Garcia AD, Doan NB, Imura T, Bush TG, Sofroniew MWGFAP-expressing progenitorsare the principal source of constitutive neurogenesis in adult mouse forebrain. Nat Neurosci 2004 7:1233-12.

Ge S, Goh EL, Sailor KA, Kitabatake Y, Ming GL, Song H. GABA regulates synaptic integration of newly generated neurons in the adult brain. Nature 2006;439: 589-593.

Getova D, Froestl W, Bowery NG Effects of GABAB receptor antagonism on the development of pentylenetetrazol-induced kindling in mice. Brain research, (1998). 809, 2, 182-188.

Gleeson JG, Lin PT, Flanagan LA, Walsh CA. Doublecortin is a microtubule-associated protein and is expressed widely by migrating neurons. Neuron 1999;23(2): 257-271.

Geller EB, Lancman ME, Van Ness P, et al. Coexistence of generalized and partial epilepsies. Electroencephalogr Clin Neurophysiol (1995) 95:17P.

Goddard GV. Development of epileptic seizures through brain stimulation at low intensity. Nature. 1967; 214:1020–1021.

Gould E, Reeves AJ, Graziano MS, Gross CG. Neurogenesis in the neocortex of adult primates. Science 1999; 286:548-52.

Gould, E, Reeves AJ, Fallah M, Tanapat P, Gross CG, Fuchs E. Hippocampal neurogenesis in adult Old World primates. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.2002;96, 5263-67.

Gray WP, Sundstrom LE. Kainic acid increases the proliferation of granule cellProgenitors in the dentate gyrus of the adult rat. Brain Res. 1998;790(1-2): 52-59.

Guselnikova, D. E. Korzhevskiy NeuN As a Neuronal Nuclear Antigen and Neuron Differentiation Marker 2015; 287:549-55.

Henry, D., ed. The Human Hipocampus. Third ed. 1980.

Huang RQ, Bell-Horner CL, Dibas MI, Covey DF, Drewe JA, Dillon GH Pentylenetetrazone-induced inhibition of recombinant gam- ma-aminobutyric acid type A (GABA(A)) receptors: mechanism and site of action. J Pharmacol Exp Ther (2001) 298:986–995.

Hausher, Beghi,.Development of epileptic seizures through brain stimulation at down intensity. Hum Mol Genet. 2008 ;8: 1599-1610.

Imayoshi I, Shimogori T, Ohtsuka T, Kageyama R. Hes genes and neurogenin regulate non-neural versus neural fate specification in the dorsal telencephalic midline. Development 2008;135(15): 2531-2541.

Khalaf-Nazzal R, Francis F. Hippocampal development - Old and new findings. Neuroscience 2013;248C: 225-242.

Kempermann G, Jessberger S, Steiner B, Kronenberg G. Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. Trends Neurosci. 2004;27(8): 447-452.

Kuruba R, Hattiangady B, Shetty A.K. Hippocampal neurogenesis and neural stem cells in temporal lobe epilepsy. Epilepsy Behav. (2009) 14(Suppl 1): 65-73.

Koutroumanidis M, Hennessy M, Elwes RD, et al. Coexistence of temporal lobe and idiopathic generalized epilepsies. Neurology (1999) 53:490-495.

Klioueva IA, van Luijtelaar EL, Chepurnova NE, Chepurnov SA (2001). PTZ induced seizures in rats: effects of age and strain. Physiol Behav, 72, 3, 421-6.

Laywell, E.D., Rakic, P., Kukekov, V.G., Holland, E.C. & Steindler, D.A. Identification of a multipotent astrocytic stem cell in the immature and adult Mouse brain. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1997, 13883–13888 (2000).

Luthman J, Humpel C (1997). Pentylenetetrazol kindling decreases N-methyl-d-aspartate and kainate but increases gamma-aminobutyric acid-A receptor binding in discrete rat brain areas. Neuroscience letters, 239, 1, 9-12.

Löscher W Animal models of epilepsy for the development of antiepileptogenic and disease-modifying drugs. A comparison of the pharmacology of kindling and post-status epilepticus models of temporal lobe epilepsy. Epilepsy research, (2002). 50,1, 105-123.

Löscher W Critical review of current animal models of seizures and epilepsy used in the discovery and development of new antiepileptic drugs. Seizure, (2011). 20, 5, 359-368.

Liu, M. A. Curtis, H. M. Gibbons, E. W. Mee, P. S. Bergin, H. H. Teoh, B. Connor, M. Dragunow and R. L. M. Faull1 Doublecortin expression in the normal and epileptic adult human brain European Journal of Neuroscience, Vol. 2008.28, pp. 2254–2265.

Meldrum BS. The role of glutamate in epilepsy and other CNS disorders. Neurology (1994) 44:14-23.

Manns JR, Eichenbaum H. Evolution of the Hippocampus. Elsevier, Editor.Evolution of Nervous Systems: A Comprehensive Reference. London; 2007.

Marangoz C. Deneysel epilepsi modelleri. OMÜ Tıp Dergisi, (1997). 14, 3, 147-186.

Macdonald RL, Barker JL (1978). Specific antagonism of GABA-mediated postsynaptic inhibition in cultured mammalian spinal cord neurons A common mode of convulsant action. Neurology, 28, 4, 325-330

Ming, GL, Song H. Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. Annu Rev Neurosci 2005;28: 223–50.

Morimoto K Seizure-triggering mechanisms in the kindling model of epilepsy: collapse of GABA-mediated inhibition and activation of NMDA receptors. Neuroscience Biobehavioral Reviews, (1990). 13, 4, 253-260.

Nakahira E, Yuasa S. Neuronal generation, migration, and differentiation in the mouse hippocampal primordium as revealed by enhanced green fluorescent protein

gene transfer by means of in utero electroporation. J Comp Neurol. 2005;483(3): 329-340.

Ngugi, Barker JL Specific antagonism of GABA-mediated postsynaptic inhibition in cultured mammalian spinal cord neurons A common mode of convulsant action. Neurology, (2010). 28, 4, 325-330.

Pavlova T, Stepanichev M, Gulyaeva N. Pentylenetetrazole kindling induces neuronal cyclin B1 expression in rat hippocampus. Neuroscience letters, (2006). 392, 1, 154-158.

Peter LW ve Roger W .,1980 Gray's Anatomy 36th edition Churchille Linigstone 1980.

Praag HV, Schinder AF, Christie BR, Toni N, Palmer TD, Gage FH. Functional neurogenesis in the adult hippocampus, Nature (2002) 415:1030–1034.

Park JH, Cho H, Kim H, Kim K. Repeated brief epileptic seizures by pentylenetetrazole cause neurodegeneration and promote neurogenesis in discrete brain regions of freely moving adult rats. Neuroscience, (2006). 140, 2, 673-684.

Patsoukis A, Sutula TP Is epilepsy a progressive disorder? Prospects for new therapeutic approaches in temporal lobe epilepsy. The Lancet Neurology, (2004). 1, 3, 173-181.

Parent JM, Yu TW, Leibowitz RT, Geschwind DH, Sloviter RS, Lowenstein DH.Dentate granule cell neurogenesis is increased by seizures and contributes to aberrant network reorganization in the adult rat hippocampus. J Neurosci. 1997;17(10): 3727-

Pitkänen A, Sutula TP Is epilepsy a progressive disorder? Prospects for new therapeutic approaches in temporal lobe epilepsy. The Lancet Neurology, (2005). 1, 3, 173-181.

R.J. Racine, Modification of seizure activity by electrical stimulation, I. After-discharge threshold, Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol. 32 (1972.a) 269–279.

R.J. Racine, Modification of seizure activity by electrical stimulation, II. Motor seizure, Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol. 32 (1972.b) 281–294.

Rolando C ve Taylor V. Neural stem cell of the hippocampus: Development, physiology regulation, and dysfunction in disease. Curr Top Dev Biol. 2014;107:183-206

Russo E, Citraro R, Donato G, Camastra C, Iuliano R, Cuzzocrea S, Constanti A, De Sarro G. mTOR inhibition modulates epileptogenesis, seizures and depressive behavior in a genetic rat model of absence epilepsy. Neuropharmacology 2013;69: 25-36.

Rogawski MA, Loscher W The neurobiology of antiepileptic drugs. Nat Rev Neurosci (2004) 5:553–564

Richards, D. A., Lemos, T., Whitton, P. S. and Bowery, N. G. Extracellular GABA in the ventrolateral thalamus of rats exhibiting spontaneous absence epilepsy: a microdialysis study. J. Neurochem. (1995) 65, 1674±1680.

Rickmann, M., Amaral, D.G. & Cowan, W.M. Organization of radial glial cells during the development of the rat dentate gyrus. J. Comp. Neurol. 264, 449–479 (1987).

Scott BW, Chan KF, Wong G, Ahmed M, Chieverton L, Liu RR, Wood J, Burnham WM. Cytogenesis in the adult rat dentate gyrus is increased following kindled seizures but is unaltered in pharmacological models of absence seizures. Epilepsy Behav. 2010;18(3): 179-185.

Scharfman HE, Goodman JH, Sollas AL. Granule-like neurons at the hilar/CA3 border after status epilepticus and their synchrony with area CA3 pyramidal cells: functional implications of seizureinduced neurogenesis. J Neurosci (2002) 20(16):6144–6158.

Sanai N, Alvarez-Buylla A, Berger MS. Neural stem cells and the origin of gliomas. N Engl J Med 2005;353: 811–22.

Seaberg RM, van der Kooy D. Adult rodent neurogenic regions: the ventricular subependyma contains neural stem cells, but the dentate gyrus contains restricted progenitors. J Neurosci 2002;22:1784–93.

Schröder H, Becker A, Hollt V (1998). Sensitivity and density of glutamate receptor subtypes in the hippocampal formation are altered in pentylenetetrazol-kindled rats. Exp Brain Res, (1998) 120, 4, 527-530.

Song J, Christian KM, Ming GL, Song H. Modification of hippocampal circuitry by adult neurogenesis. *Dev Neurobiol*. 2012; 72: 1032-1043

Sommer L, Ma Q, Anderson DJ. Neurogenins, a novel family of atonal-related bHLH transcription factors, are putative mammalian neuronal determination genes that reveal progenitor cell heterogeneity in the developing CNS and PNS. Mol Cell Neurosci. 1996;8(4): 221-241.

Subramanian L, Tole S. Mechanisms underlying the specification, positional regulation and function of the cortical hem. Cerebral Cortex. 2009;19 (Suppl 1)i90-5.

Shandra, Godlevsky Seizures accelerate functional integration of adult-generated granule cells. J Neurosci. 2005;26: 4095-4103.

Tulving E. Episodic Memory: From Mind to Brain. Annu Rev Psychol2002;53(1):1–25.

Taupin P. BrdU immunohistochemistry for studying adult neurogenesis: Paradigms, pitfalls, limitations, and validation. Brain Research Reviews (2007) 53:198–214.

Vida I, Frotscher M. A hippocampal interneuron associated with the mossy fiber system.Proc. Natl. Acad. Sci. 2000; 97: 1275-1280.

Velisek L, Kusa R, Kuluvana M, Mares P (1990). Exitatory amino acid antagonist and pentylenetetrazol-induced seizures during ontogenesis: I. The effects of 2-amino-7-phosphonoheptonate. Life Sci, 46, 1349-1357.

Vergnes M, Boehrer A, Reibel S, Simler S, Marescaux C. Selective susceptibility to inhibitors of GABA synthesis and antagonists of GABA(A) receptor in rats with genetic absence epilepsy 2000; 48, 1347-1356.

Yao J, Mu Y, Gage FH. Neural stem cells: mechanisms and modeling. *Protein Cell*. 2012; 3: 251-261.

White HS. Preclinical development of antiepileptic drugs: past, present, and future directions. Epilepsia, (2003). 44, 7, 2-8.

Wyszynski, Ding MP, Zhu-Ge ZB, Zhu YY, Jin CL, Chen Z . Carnosine, a precursor of histidine, ameliorates pentylenetetrazole-induced kindled seizures in rat. Neurosci Lett, 1997,400, 1, 146-149.

Wu XH, Ding MP, Zhu-Ge ZB, Zhu YY, Jin CL, Chen Z (2006). Carnosine, a precursor of histidine, ameliorates pentylenetetrazole-induced kindled seizures in rat. Neurosci Lett, 400, 1, 146-149.

Zhu LJ, Chen Z, Zhang LS, Xu SJ, Xu A, Luo JH. Spatiotemporal changes of the N-methyl-D-aspartate receptor subunit levels in rats with pentylenetetrazole-induced seizures. Neuroscience letters, (2004). 6, 356, 1, 53-56.

Zhao M., Momma S, Delfani K, et al. Evidence for neurogenesis in the adult mammalian substantia nigra. Proc Natl Acad Sci USA. 2003;100: 7925-30.

9. Özgeçmiş

Adı	Cansu	**Soyadı**	Kandemir
Doğum Yeri	İzmir	**Doğum tarihi**	04-09-1991
Uyruğu	TC	**Tel**	05452875166
E-mail	Cansukandemir91@gmail.com		

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	**Mezuniyet yılı**
Doktora/Uzmanlık		
Yüksek Lisans		
Lisans	Celal Bayar Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji	2014
LİSE	Şirinyer Lisesi	2009

Yabancı Dilleri	**Okuduğunu Anlama ***	**Konuşma ***	**Yazma ***
İngilizce	İyi	İyi	İyi

Yabancı Dil Sınav Notu								
YÖK-DİL	ÜDS	IELTS	TOFEL IBT	TOFEL PBT	TOFEL CBT	FCE	CAE	CPE
65								

	Sayısal	Eşit ağırlık	Sözel
ALES	65.55	70.466	72.776

Bilgisayar kullanma becerisi		
Office	Çok iyi	

Kurslar

Deney Hayvanı Kulanımı ve Etik Yaklaşım, Marmara Üniversitesi Tıp fakültesi DEHAMER, 2016.

Çalışmalar

Ceren Şahin Özkartal, Feyza Arıcıoğlu, Erdem Tüzün, Rümeysa Keleş, **Cansu Kandemir**, Serap Şirvancı, Cem İsmail Küçükali. Agmatine produces antidepressant effect via modulation of neuroinflammation in chronic unpredictable mild stress model of rats: Implication in inflammatory perspective of depression. 9th International Congress on Psychopharmacology & 5th International Symposium on Child and Adolescent Psychopharmacology (9th ICP – 5th ISCAP), April 26-30, 2017, Antalya, Turkey

Aricioglu F, Arkan G, **Kandemir C**, Şirvancı S**,** Sahin-Ozkartal C, Utkan T. Ketamine suppress microglial-activation and induce antidepressant-like effect in

rats. 9th International Congress on Psychopharmacology & 5th International Symposium on Child and Adolescent Psychopharmacology (9th ICP – 5th ISCAP) April 26-30, 2017, Antalya, Turkey

Aricioglu F., Bastaskin T, **Kandemir C**, Şirvancı S**,** Sahin C, Utkan T. Antiinflammatory properties of Brilliant Blue G on chronic unpredictable mild stress-induced changes in rat hippocampus. 25th European Congress of Psychiatry (EPA 2017) 1-4 April 2017, Floransa.

Aricioglu F, Arkan G, **Kandemir C**, Şirvancı S**,** Sahin C, Utkan T. Harmane suppressmicroglial neuroinflammatory response and induce antidepressent-like effect in rats. 25th European Congress of Psychiatry (EPA 2017) 1-4 April 2017, Floransa

Yilmaz B, **Kandemir C**, Şirin E, Özdemir G, Ak D, Karahan N, Akakın D, Muratlı H. Histopathological evaluation of mechanoreceptors in the metatarsophalangeal joint capsule in hallux valgus cases. 15thInternational congress of histochemstry and cytochemstry (ICHC 2017) 18-21 MAY 2017,Antalya Turkey.

Adakul B, Ertaş B, Ozbeyli D, **Kandemir C**,Cevik O, Ercan F , Sener G. Riboflavin Treatment Reduces Apoptosis and Oxidative DNA Damage in a Ischemia/Reperfusion Induced Renal Damage in Rats. 15thInternational congress of histochemstry and cytochemstry (ICHC 2017) 18-21 MAY 2017,Antalya Turkey.

MARMARA ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

PROJE ONAY FORMU

BAŞVURU BİLGİLERİ	**PROTOKOL KODU**	70.2017.mar	**ÇALIŞMA:** TEZ
	PROJE ADI	Kindling uygulanmış Wistar ve genetik absans epilepsili sıçanlarda nörogenezin incelenmesi	
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ ADI	Prof. Dr. Serap Şirvancı	
	ARAŞTIRMA MERKEZİ	DEHAMER	
	DESTEKLEYİCİ		

KARAR BİLGİLERİ	**TARİH: 09.010.2017** Yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve gerçekleştirilmesinde sakınca bulunmadığı için kurulumuzca onaylanmasına oy birliği ile karar verilmiştir. Onay sonrasında yapılacak her türlü proje değişiklikleri (katılımcılar, başlık vb.) veya protokol değişikliklerinin Etik Kurula bildirilerek proje onayının yenilenmesi gerekmektedir.
ETİK KURUL BİLGİLERİ	
ÇALIŞMA ESASI	Deney hayvanları ile yapılacak olan bilimsel araştırma, test, sağlık hizmetleri uygulamaları ve eğitim-öğretim gibi temel etkinliklerde kullanılan yöntem ve materyaller ile ilgili etik standartları gözetmek, etik ilkeler doğrultusunda görüş bildirmek, araştırma önerilerini incelemek ve sertifikası olmayanların deney hayvanı kullanmalarını engellemektir.

ÜYELER

Ünvanı/ Adı/ Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu/ Ek Üyeliği	Onaylanan Proje ile İlişkisi	Toplantıya Katılım	İmza
Prof.Dr. Göksel ŞENER	Farmakoloji	M.Ü. Eczacılık Fakültesi ve Hayvan Deneyleri Etik Kurul Başkanı	Var Yok	Evet Hayır	
Prof.Dr. Levent KABASAKAL	Farmakoloji	M.Ü. Eczacılık Fakültesi ve Hayvan Deneyleri Etik Kurul Üyesi	Var Yok	Evet Hayır	
Prof.Dr. Ayşen YARAT	Biyokimya	M.Ü. Diş Hekimliği Fakültesi ve Hayvan Deneyleri Etik Kurul Üyesi	Var Yok	Evet Hayır	
Prof.Dr. Serap ŞİRVANCI	Histoloji Embriyoloji ABD	M.Ü. Tıp Fakültesi ve Hayvan Deneyleri Etik Kurul Üyesi	Var Yok	Evet Hayır	Araştırmacı
Prof.Dr. Rezzan GÜLHAN	Farmakoloji	M.Ü. Tıp Fakültesi ve Hayvan Deneyleri Etik Kurul Üyesi	Var Yok	Evet Hayır	
Doç.Dr. Gürkan SERT	Tıp Tarihi ve Etik	M.Ü. Tıp Fakültesi ve Hayvan Deneyleri Etik Kurul Üyesi	Var Yok	Evet Hayır	
Vet. Dr. Dilek ÖZBEYLİ	Veteriner Hekim	M.Ü. Tıp Fakültesi ve Hayvan Deneyleri Etik Kurul Üyesi	Var Yok	Evet Hayır	
Bio. Arif GÜMÜŞ	Biyoloji	Sivil Toplum Kuruluşu Üyesi ve Kurumla ilişkisi olmayan TC vatandaşı üye	Var Yok	Evet Hayır	
Cihanşah MURATOĞLU	Serbest Danışmanlık	Kurumla ilişkisi olmayan TC vatandaşı üye	Var Yok	Evet Hayır	


BEYİN ARAŞTIRMALARI DERNEĞİ
İTÜ
16. ULUSAL SİNİRBİLİM KONGRESİ
20 - 23 MAYIS 2018
İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
AYAZAĞA KAMPÜSÜ
www.usk2018.org

PS-003

Stroop testi esnasında beyin işlevselliğinin fNIRS ile incelenmesi

Burçin Tatlıeşme[1], Ali Murad Özmen[1], Erim Habib[2], Ata Akın[1]
[1]Mehmet Ali Aydınlar Acıbadem Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tıp Mühendisliği Bölümü, İstanbul
[2]İstanbul International Community School

AMAÇ: Stroop Testi esnasında fNIRS verilerinden prefrontal korteksin işlevsel bağlantısallığının nicel olarak belirlenmesi.

GEREÇ VE YÖNTEM: Bu çalışmada dikkat, yanıt kontrolü ve çalışma belleği ödevlerini iyi bir şekilde ölçebilecek Stroop testi yapan, nöropsikolojik hastalık teşhisi bulunmayan, 15 yetişkin (20±2 yaş, 10 erkek) denekten PFK üzerinden 16 kanallı fNIRS sistemiyle (ARGES Cerebro, Hemosoft) ölçümler alındı. Denekler ekrandaki renk ismi ve rengi arasında uyuşma varlığı-yokluğu durumunu tuşlara basarak tayin etmeye çalıştı. fNIRS sisteminin 16 kanalından gelen HbO verileri arasında kısmi korelasyon analiziyle her kişi için işlevsel bağlantısallık matrisi yaratıldı. Bu matrisin en kuvvetli %10 korelasyon katsayısıyla çizge teorisi metriklerinden olan global verimlilik (GE) değeri hesaplandı.

BULGULAR: Denek verileri, teste başlamadan alınan (Rest1), test esnasındaki (Test) ve test sonrasındaki (Rest2) GE değerlerine göre iki gruba ayrıldı. Gruplar ayrılırken test öncesi GE değerinin, test anındakine göre büyük/küçük olması dikkate alındı. Örneğin ilk grup için GEHbO(Rest1)= 0,139±0,019> GEHbO(Test)= 0,104±0,0085 ve GEHbO(Rest2)= 0,1236±0,0187'yken; ikinci grup için GEHbO(Rest)= 0,1051±0,0099< GEHbO(Test)= 0,1348±0,0233 ve GEHbO(Rest2)= 0,134±0,023 şeklindeydi. İlk grubun testte 40 üzerinden aldığı ortalama skor 37±2,8 ve süresi 32±5 saniye olarak ölçülürken; ikinci grubun ortalama skoru 37±2,5 ve süresi 30±6 saniyeydi. Tek taraflı t-testi analizinde ilk gruptaki GE değerleri (p(Rest1&Test)= 0,0056, p(Rest1&Rest2)= 0,0735 ve p(Test&Rest2)= 0,0695) anlamlı olarak farklılık gösterdi. Benzer şekilde ikinci gruptaki GE değerleri (p(Rest1&Test)= 0,0016, p(Rest1&Rest2)= 0,003 ve p(Test&Rest2)= 0,532) anlamlı farklılık taşıyordu.

SONUÇ: İlk grupla (GEHbO(Rest1)> GEHbO(Test)), ikinci grup (GEHbO(Rest1)< GEHbO(Test)) kıyaslandığında; GEHbO(Rest1) yüksekken skorda düşme ancak sürede artış görüldü, GEHbO(Test) daha yüksek değere sahipken skorda artmayla birlikte sürede kısalma gözlendi. Test süresince yüksek GE olması deneklerin daha kısa sürede daha doğru yanıtlar vermesiyle sonuçlanıyor. Ancak test öncesi dinlenme süresinde teste göre daha fazla GE gösteren denekler, daha uzun süre harcayıp daha az doğru yanıt veriyor. Bu verilerden yola çıkarak GE'nin 'odaklanma, inhibisyon becerisinde artış' anlamlarına geldiği söylenebilir. Teste odaklanan beyinde işlevsel bağlantısallığın daha verimli olacak şekilde değişmesi sonuçlarımızı destekler niteliktedir.

Anahtar Kelimeler: fNIRS, işlevsel bağlantısallık, global verimlilik, stroop

PS-004

Kindling uygulanmış wistar albino sıçanlarda nörogenezin incelenmesi

Cansu Kandemir[1], Melis Yavuz[2], Özlem Tuğçe Kaya[1], Filiz Onat[2], Serap Şirvancı[1]
[1]Marmara Üniversitesi, Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, İstanbul
[2]Marmara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, İstanbul

AMAÇ: Dünyada yaklaşık 50 milyon kişiyi etkileyen epilepsinin en sık görülen tipi temporal lob epilepsisidir (TLE). Hayvanlarda uygulanan kimyasal ve elektriksel kindling yöntemleri ile TLE modeli oluşturulabilmektedir. Bu çalışmada kimyasal kindling uygulanmış erişkin Wistar sıçan hipokampusunda immünofloresan yöntemlerle nörogenezi incelemek amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM: 250-300 gr ağırlığında erişkin erkek Wistar albino sıçanlara kimyasal kindling oluşturmak amacıyla gün aşırı subkutan yol ile PTZ (35 mg/kg) uygulandı (Wistar kindling 7. gün grubu n=6; 14. gün grubu n=6). Yalancı-opere kontrol gruplarına aynı yolla serum fizyolojik enjeksiyonu yapıldı (Wistar yalancı-opere 7. gün grubu n=6; 14. gün grubu n=6). Ardı ardına beş kez evre 5 nöbet geçiren hayvanlar kindled olarak kabul edildi. Son evre 5 nöbetten sonra 7. ve 14. günlerde derin anestezi altında intakardiyak perfüzyon yapıldı. Perfüzyon işleminden sonra hayvanlar dekapite edilerek beyin dokuları çıkarıldı ve aynı fiksatifte 4°C'de gece boyunca bekletildi. Dokular -80°C'de donduruldu ve kriyomikrotom ile 5 µm kalınlığında kesitler alındı. İmmünofloresan metodlarla yeni oluşan nöronları göstermek amacıyla anti- doublecortin (DCX), glial hücreleri göstermek için anti-glial fibriller asidik protein (GFAP) boyamaları yapıldı ve boyanan kesitler floresan mikroskobunda incelendi.

BULGULAR: Kontrol ve kindling gruplarında girus dentatus subgranüler tabakasında DCX pozitif hücreler görüldü. Kindling gruplarında GFAP pozitif hücrelerde kontrol grubuna göre artış saptandı.

SONUÇ: Bu çalışmanın bulguları kontrol ve kindling uygulanmış erişkin sıçan beyninde nörogenez varlığına işaret etmektedir. Kindling gruplarındaki GFAP artışı ise astrogliozisi düşündürmüştür.

Anahtar Kelimeler: doublecortin, hipokampus, kindling, nörogenez