

**T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**PRENATAL DÖNEMDE UYGULANAN TIAZOLİDİNEĞON GRUBU İLAÇLARIN
RAT (Wistar albino) HİPOKAMPUSUNDA PİRAMİDAL HÜCRE SAYISI ÜZERİNE
ETKİLERİNİN STEREOLOJİK OLARAK ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

Dilek SAĞIR

Biyoloji Anabilim Dalı

**EKİM 2012
SAMSUN**



**T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**PRENATAL DÖNEMDE UYGULANAN TIAZOLİDİNE DİYON GRUBU İLAÇLARIN
RAT (Wistar albino) HİPOKAMPUSUNDA PİRAMİDAL HÜCRE SAYISI ÜZERİNE
ETKİLERİNİN STEREOLOJİK OLARAK ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

**Dilek SAĞIR
(0621544)**

Tezin Savuma Tarihi : 12 Ekim 2012

Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Banu EREN

Bu Doktora Tez Çalışması Ondokuz Mayıs Üniversitesi PYO.FEN.1904.09.023 no'lu Proje ile Desteklenmiştir.

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalında

Dilek SAĞIR Tarafından Hazırlanan

**PRENATAL DÖNEMDE UYGULANAN TIAZOLİDİNEĞİON GRUBU
İLAÇLARIN RAT (Wistar albino) HİPOKAMPUSUNDA PİRAMİDAL HÜCRE
SAYISI ÜZERİNE ETKİLERİNİN STEREOLOJİK OLARAK ARAŞTIRILMASI**

**başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından 12/10/2012 tarihinde yapılan sınav ile
DOKTORA tezi olarak kabul edilmiştir.**

Başkan : Prof. Dr. Adem GÜLEL
Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Jüri Üyeleri : Prof. Dr. Y. Sancar BARIŞ
Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Prof. Dr. Haluk KEFELİOĞLU
Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Prof. Dr. H. Mehtap KUTLU
Anadolu Üniversitesi

Yrd.Doç. Dr. Banu EREN
Ondokuz Mayıs Üniversitesi

....../....../2012

Prof. Dr. Recep TAPRAMAZ

Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Doktora çalışmam süresince ilgi ve desteğini esirgemeyen, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım ve her zaman yanımda olan değerli danışman hocam Yrd.Doç.Dr. Banu EREN’e teşekkür ederim.

Tez konusunun belirlenmesi aşamasından sonuçlanmasına kadar değerli fikirleri ile bana yol gösteren ve desteklerini her zaman hissettiğim Tez İzleme Komitesi’nde yer alan hocalarım, Prof. Dr. Adem GÜLEL’e ve Prof. Dr. Y. Sancar BARIŞ’a teşekkür ederim.

Çalışmalarım sırasında her zaman destek ve yardım gördüğüm Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof.Dr.Süleyman Kaplan’a ve çalışmamın stereolojik analizlerinin yapılması için, laboratuvarlarında bulunan stereoloji analiz sistemini kullanmamı sağlayan Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Cafer MARANGOZ’a, teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarımda yardım ve desteklerini esirgemeyen arkadaşlarım, doktora öğrencisi Burcu DEMİREL, Dr. Ayşe BAŞARDI ve Arş. Gör. Dr. Sevcin MERCAN’a teşekkür ederim.

Her zaman maddi ve manevi desteğini sağlayan, her türlü fedakarlık ve anlayışla daima yanımda olan sevgili aileme ve eşim Hasan SAĞIR’a çok teşekkür ederim.

Ayrıca doktora çalışmam süresince “Yurt İçi Doktora Burs Programı” ile bana maddi destek sağlayan TUBİTAK’a teşekkürü bir borç bilirim.

Ekim 2012

Dilek SAĞIR

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ.....	v
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELER LİSTESİ.....	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xi
SİMGE VE KISALTMALAR LİSTESİ	xiii
ÖZET.....	xv
SUMMARY	xvii
1. GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER.....	7
2.1 Limbik Sistem	7
2.2 Hipokampus	8
2.2.1 Hipokampusun Embriyolojik Gelişimi	9
2.2.2 Hipokampus Anatomisi.....	9
2.2.3 Hipokampus Histolojisi.....	11
2.2.3.1 <i>Cornu ammonis</i>	11
2.2.3.2 <i>Gyrus dentatus</i>	13
2.2.4 Hipokampal Yollar.....	16
2.2.4.1 Afferent Yollar	16
2.2.4.2 Efferent Yollar	16
2.2.5 Hipokampus Gelişimi.....	17
2.2.5.1 <i>Cornu ammonis</i> 'in Hipokampal Alt Cisimlerinin Gelişimi	18
2.2.5.2 <i>Gyrus dentatus</i> Gelişimi.....	20
2.2.5.2.1 Granüler Hücreler.....	20
2.2.5.2.2 Mossy Lifleri.....	20
2.2.6 Hipokampusun Fizyolojisi ve Kimyası.....	22
2.2.7 Hipokampusun Fonksiyonları	22
2.3 Tiazolidinedionlar	24
2.3.1 Rosiglitazon	24
2.3.1.1 Rosiglitazonun Etki Mekanizması	25
2.4 Beyindeki PPAR'lar.....	26
2.4.1 PPAR'ların Beyindeki Fizyolojik Fonksiyonu	27
2.5 Stereoloji	31
2.5.1 Stereolojide Tarafsızlık ve Etkinlik	32
2.5.2 Stereolojide Ön Çalışma	33
2.5.3 Kesitlerde Boyut Azalması	34
2.5.3.1 Kesit Yöneliminin Etkisi.....	36
2.5.3.2 Tanecik Yöneliminin Etkisi	37
2.5.3.3 Tanecik Büyüklüğünün Etkisi.....	38
2.5.4 Sistematik Rastgele Örnekleme (SRÖ).....	39
2.5.5 Disektör ve Disektör Sayım Yöntemi	39

2.5.5.1 Tarafsız Sayım Çerçevesi.....	39
2.5.5.2 Fiziksel ve Optik Disektör Yöntemi.....	41
2.5.6 Fiziksel ve Optik Parçalama.....	43
2.5.7 Cavalieri Prensibi ve Hacim Hesaplanması	46
2.5.7.1 Noktalı Alan Ölçüm Cetvelleri	47
3. MATERYAL VE YÖNTEMLER.....	49
3.1 Araştırma Uygulamalarının Yapıldığı Yer.....	49
3.2 Etik Kurul İzni.....	49
3.3 Farelere Uygulanan Maddeler	49
3.4 Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal Maddeler	50
3.5 Çalışmalarda Kullanılan Aletler	50
3.6 Deney Protokolü.....	50
3.7 Histolojik İşlem Basamakları	54
3.7.1 Perfüzyon ve Beyin Diseksiyonu	54
3.7.2 Işık Mikroskopik Doku Takip İşlemi	55
3.7.3 Kesitlerin Alınması ve Kesitlerin Krezil Violet ile Boyanması	56
3.7.4 Kesitlerde Hipokampus Sınırının Tespiti	57
3.7.5 Kesitlerde Nöronların Tespiti	57
3.8 Stereolojik İşlem Basamakları	58
3.8.1 Stereolojik Metotlar.....	58
3.8.1.1 Kesit Örnekleme İşlemi.....	58
3.8.1.2 Stereoloji Analiz Sistemi.....	59
3.8.1.3 Stereolojik Analizlerin Detayları	60
3.9. İstatistiksel Analiz	63
4. BULGULAR	65
4.1 Deney Sırasındaki Gözlemler.....	65
4.2 Histolojik Bulgular	66
4.2.1 Kontrol Yenidoğan Sıçan Yavrularına Ait Bulgular	66
4.2.2 Kontrol 4 Haftalık Sıçan Yavrularına Ait Bulgular	67
4.2.3 Kontrol 12 Haftalık Sıçan Yavrularına Ait Bulgular	67
4.2.4 Rosiglitazon Yenidoğan Gruplarına Ait Bulgular	68
4.2.5 Rosiglitazon 4 Haftalık Gruplarına Ait Bulgular	68
4.2.6 Rosiglitazon 12 Haftalık Gruplarına Ait Bulgular	68
4.3 Stereolojik Bulgular	79
4.3.1 Yenidoğan Gruplarının Karşılaştırılması	81
4.3.2 4 Haftalık Grupların Karşılaştırılması	82
4.3.3 12 Haftalık Grupların Karşılaştırılması	83
4.3.4 Kontrol Yaş Gruplarının Karşılaştırılması	84
4.3.5 Rosiglitazon Düşük Doz Yaş Gruplarının Karşılaştırılması	85
4.3.6 Rosiglitazon Yüksek Doz Yaş Gruplarının Karşılaştırılması	86
5. TARTIŞMA	87
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	95
7. KAYNAKLAR.....	97
ÖZGEÇMİŞ	107

ÇİZELGELER LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 3.1: Çiftleşme için gruplara ayrılan dişi sıçan sayıları.	51
Çizelge 3.2: Gebe sıçanlardan elde edilen yavru sıçan sayıları.	53
Çizelge 3.3: 4 haftalık ve 12 haftalık hayvanlar için yapılan ön çalışma ile belirlenen değerler.	61
Çizelge 3.4: Yenidoğan hayvanlar için yapılan ön çalışma ile belirlenen değerler...	61
Çizelge 4.1: Tüm gruplardaki gebe sıçanlardan elde edilen ortalama yavru sıçan sayıları.	65
Çizelge 4.2: Gebe sıçanlardan elde edilen yavru sıçan sayılarının, gruplar arası karşılaştırılması ile elde edilen p değeri.	65
Çizelge 4.3: Bütün grupların beyin dokularının hipokampuslarındaki ortalama piramidal hücre sayıları, standart sapmaları, değişim katsayıları ve her bir gruptaki sıçan sayısı.	80
Çizelge 4.4: Bütün grupların beyin dokularının hipokampuslarındaki piramidal hücre sayılarının gruplar arası karşılaştırmalarından elde edilen p değerleri.	80
Çizelge 4.5: Yedi doğan gruplarının ikili karşılaştırmalarından elde edilen p değerleri.	81
Çizelge 4.6: 4 haftalık yaş gruplarının ikili karşılaştırmalarından elde edilen p değerleri.	82
Çizelge 4.7: 12 haftalık yaş gruplarının ikili karşılaştırmalarından elde edilen p değerleri.	83
Çizelge 4.8: Kontrol yaş gruplarının ikili karşılaştırılmasından elde edilen p değerleri.	84
Çizelge 4.9: Rosiglitazon düşük doz yaş gruplarının ikili karşılaştırmalarından elde edilen p değerleri.	85
Çizelge 4.10: Rosiglitazon yüksek doz yaş gruplarının gruplar arası karşılaştırmalarından elde edilen p değeri.	86

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1: Diseke edilen ve deniz atına benzetilen hipokampus.....	8
Şekil 2.2: İnsan hipokampusun genel görüntüsü	10
Şekil 2.3: Hipokampusun enine kesitinin şematik görüntüsü.....	11
Şekil 2.4: Hipokampusun <i>Cornu ammonis</i> ve <i>Dentat gyrus</i> tabakaları	14
Şekil 2.5: Hipokampusun floresan mikroskobik görünümü.....	15
Şekil 2.6: Hipokampusun bağlantıları.	17
Şekil 2.7: Nöral öncül ve kök hücreler	19
Şekil 2.8: Hipokampus'un sagittal kesiti	19
Şekil 2.9: Yetişkin <i>gyrus dentatus</i> 'unda nöroenezis.	20
Şekil 2.10: Mossy sinapslarının elektron mikroskobik görüntüsü	21
Şekil 2.11: Rosiglitazonun açık formülü	25
Şekil 2.12: İki boyutlu kesitlerle yapılan örneklemelerde ortaya çıkan boyut azalması	35
Şekil 2.13: Biyolojik kesitlerde boyut azalması.	36
Şekil 2.14: Kesit yöneliminin izdüşüm sayısına etkisi	37
Şekil 2.15: Partikül yöneliminin kesitlerdeki izdüşüm sayısına etkisi	37
Şekil 2.16: Doku içerisinde bulunan farklı büyüklükteki partiküller ve iki boyutlu düzlemlerdeki izdüşümleri	38
Şekil 2.17: Tarafsız sayım çerçevesi	40
Şekil 2.18: Bu çalışmada kullanılan tarafsız sayım çerçevesi	40
Şekil 2.19: Optik disektör sondasının üç boyutlu şematik çizimi	42
Şekil 2.20: Noktalı Alan Ölçüm Cetveli.....	47
Şekil 3.1. A: Gebe sıçanlara gavaj yoluyla ilaç verilmesi, B: Bir gebe sıçandan elde edilen yavrular.....	52
Şekil 3.2: Yenidoğan grubundaki sıçanlar	53
Şekil 3.3: 4 haftalık ve 12 haftalık yaş grubundaki sıçanlar	54
Şekil 3.4. A: Sıçanlara, intrakardiyak perfüzyon yöntemiyle önce %0.9 NaCl daha sonra, %10'luk tamponlanmış nötral formalin verilmesi, B: Sıçan beyni diseksiyonu, C: Diseke edilen 12 haftalık sıçan beyni, D: Diseke edilen yenidoğan sıçan beyni.	55
Şekil 3.5: Hipokampusun CA3 bölgesindeki nöronlar	58
Şekil 3.6. Stereoloji analiz sistemi.....	60
Şekil 3.7: Her bir hayvanın hipokampusundaki toplam nöron sayısının hesaplandığı Excel'de hazırlanan sayfa.	62
Şekil 3.8: Her bir hayvana ait hata katsayısı ve her bir gruptaki değişim katsayısının hesaplandığı Excel'de hazırlanan sayfa.....	63
Şekil 4.1: Çıplak gözle görülür bir anomalinin olmadığı yavru sıçanlar.....	66
Şekil 4.2: Kontrol yenidoğan grubuna ait beyin dokusundaki hipokampusun ışık mikroskobik kesit görüntüleri.....	70
Şekil 4.3: Kontrol 4 haftalık grubuna ait beyin dokusundaki hipokampusun ışık mikroskobik kesit görüntüleri.....	71

Şekil 4.4: Kontrol 12 haftalık grubuna ait beyin dokusundaki hipokampusun ışık mikroskopik kesit görüntüleri.	72
Şekil 4.5: Rosiglitazon düşük doz yenidoğan grubuna ait beyin dokusundaki hipokampusun ışık mikroskopik kesit görüntüleri.	73
Şekil 4.6: Rosiglitazon düşük doz 4 haftalık grubuna ait beyin dokusundaki hipokampusun ışık mikroskopik kesit görüntüleri.	74
Şekil 4.7: Rosiglitazon düşük doz 12 haftalık grubuna ait beyin dokusundaki hipokampusun ışık mikroskopik kesit görüntüleri	75
Şekil 4.8: Rosiglitazon yüksek doz yenidoğan grubuna ait beyin dokusundaki hipokampusun ışık mikroskopik kesit görüntüleri	76
Şekil 4.9: Rosiglitazon yüksek doz 4 haftalık grubuna ait beyin dokusundaki hipokampusun ışık mikroskopik kesit görüntüleri	77
Şekil 4.10: Rosiglitazon yüksek doz 12 haftalık grubuna ait beyin dokusundaki hipokampusun ışık mikroskopik kesit görüntüleri.	78
Şekil 4.11: Kontrol, rosiglitazon düşük doz ve rosiglitazon yüksek doz gruplarının kendi yaş grupları içerisinde (Yenidoğan, 4 haftalık ve 12 haftalık) karşılaştırılması.	79
Şekil 4.12: Yenidoğan, 4 haftalık ve 12 haftalık yaş gruplarının kontrol ve deney grupları arasında karşılaştırılması.	79
Şekil 4.13: Yenidoğan gruplarına ait beyin dokularının hipokampuslarındaki piramidal hücre sayılarının karşılaştırılması.	81
Şekil 4.14: 4 haftalık yaş gruplarına ait beyin dokularının hipokampuslarındaki piramidal hücre sayılarının karşılaştırılması.	82
Şekil 4.15: 12 haftalık yaş gruplarına ait beyin dokularının hipokampuslarındaki piramidal hücre sayılarının karşılaştırılması.	83
Şekil 4.16: Tüm kontrol yaş gruplarına ait beyin dokularının hipokampuslarındaki piramidal hücre sayılarının karşılaştırılması.	84
Şekil 4.17: Tüm rosiglitazon düşük doz yaş gruplarına ait beyin dokularının hipokampuslarındaki piramidal hücre sayılarının karşılaştırılması.	85
Şekil 4.18: Tüm rosiglitazon yüksek doz yaş gruplarına ait beyin dokularının hipokampuslarındaki piramidal hücre sayılarının karşılaştırılması.	86

SİMGE VE KISALTMALAR LİSTESİ

(a)	: Tarafsız Sayım Çerçevesinin Alanı
AC	: Ak cevher
A_i	: “i” Numaralı Kesitteki Yapının İzdüşümünün Yüzey Alanı
a/p	: Bir Noktanın Temsil Ettiği Alan
HCl	: Hidro Klorik Asit
Na₂HPO₄	: Disodyum Hidrojen Fosfat
NaH₂PO₄	: Sodyum DihidrojenFosfat
NV	: Sayısal yoğunluk
t	: Ortalama Kesit Veya Dilim Kalınlığı
V_{ref}	: Yapının Toplam Veya Diğer Bir İfade İle Referans Hacim
(v(dis))	: Disektörün Hacmi
"Q⁻	: Disektör taneciği
ΣQ⁻	: Toplam disektör taneciği sayısı
ΣV_{dis}	: Toplam disektör hacmi
ACTH	: Adrenokortikotropik hormon
CA (1,2,3,4)	: Cornu Ammonis
DG	: Dentat Girus
EEG	: Elektroensefalografi
FDA	: Amerikan Gıda ve İlaç Birliği
G	: Glia hücresi
HK	: Hata katsayısı
IL	: İnterlöklinler
CCK	: Kolesistokinin
LTP	: Long term potentiation
Mossy lifleri	: ML
MSS	: Merkezi sinir sistemi
N	: Nöron
NSCs	: Nöral kök hücreler
NHR	: Nükleer hormon reseptörleri
NSAID	: Non-steroid anti-inflamatuvar ilaçların
PPREs	: Peroksizom-proliferatör yanıt elemanları
PPAR	: Peroksizom proliferatör aktive edici reseptör
RXR	: Retinoid X reseptörlü heterodimerler
RD	: Rosiglitazon düşük doz grubu
RY	: Rosiglitazon yüksek doz grubu
SEM	: Standart Error Mean
SRÖ	: Sistematik Rastgele Örnekleme
SS	: Standart sapma
TNF	: Tümör nekroz faktör
YD	: Yenidoğan grubu
4H	: 4 haftalık yavru grubu
12H	: 12 haftalık erişkin grubu

PRENATAL DÖNEMDE UYGULANAN TIAZOLİDİNE DİYON GRUBU İLAÇLARIN RAT (Wistar albino) HİPOKAMPUSUNDA PİRAMİDAL HÜCRE SAYISI ÜZERİNE ETKİLERİNİN STEREOLOJİK OLARAK ARAŞTIRILMASI

ÖZET

Rosiglitazon, tip 2 diyabetin tedavisinde kullanılan tiazolidinediyon (TZD) ailesinin bir üyesidir ve peroksizom proliferatör tarafından aktive edilen reseptör-gamma (PPAR- γ)'ya bağlanarak, aktivasyonunu sağlar. Bu çalışmada bir PPAR- γ agonisti olan rosiglitazonun, prenatal dönemde uygulanmasının, hipokampustaki piramidal hücre sayısını nasıl etkilediği, histokimyasal ve stereolojik metotlarla araştırıldı.

Çalışmada 18 dişi sıçan (Wistar albino) kontrol, rosiglitazon düşük doz (RD) ve rosiglitazon yüksek doz (RY) olmak üzere 3 gruba ayrıldı. Gebe oldukları belirlenen RD grubundaki dişi sıçanlara 2mg/kg, RY grubundaki dişi sıçanlara ise 5mg/kg dozdaki rosiglitazon gebeliğin ilk 16 günü boyunca günde bir kez gavaj yoluyla verildi. Elde edilen yavrular yenidoğan (YD), 4 haftalık (4H) ve 12 haftalık (12H) olmak üzere 3 yaş grubuna ayrıldı. Yapılan histolojik işlemlerden sonra, optik parçalama yöntemi kullanılarak stereolojik analizler gerçekleştirildi.

Işık mikroskopik incelemelerde, tüm gruplara ait beyin dokularındaki hipokampus bölgelerinin hem genel histolojik yapısı hem de piramidal hücrelerin morfolojileri literatürde tanımlandığı şekildeydi. Yapılan stereolojik sayımlar sonucunda kontrol gruplarında ve RD gruplarında, hipokampustaki piramidal hücre sayısında, yeni doğumdan sonra 12. haftaya kadar önemli bir azalma olurken, RY grubunda önemli bir değişikliğin olmadığı tespit edildi. Ayrıca yenidoğan grupları kendi içerisinde karşılaştırıldığında RYYD grubundaki piramidal hücre sayısının RDYD ve KYD gruplarından daha az olduğu belirlendi.

Elde edilen bu sonuçlar; rosiglitazonun doza bağımlı olarak bifazik etki gösterdiği ve yüksek dozda nöronlarda antiapoptotik etki göstererek nöron koruyucu aktivite sergilerken, nöral kök hücrelerde yüksek dozda apoptozisi uyarak hücre ölümüne neden olduğu ya da nöral kök hücrelerin nörona farklılaşmalarını engellediği şeklinde yorumlanabilir.

Anahtar Kelimeler: Rosiglitazon, Hipokampus, Stereoloji, PPAR- γ , Nörogenezis.

STEREOLOGICAL INVESTIGATION of THE EFFECTS of PRENATALLY ADMINISTERED THIAZOLIDINEDIONES on THE NUMBER of PYRAMIDAL CELLS in RAT (Wistar albino) HIPPOCAMPUS

SUMMARY

Rosiglitazone belongs to the thiazolidinedione (TZD) class of drugs indicated for the treatment of diabetes mellitus type 2 and it works as an insulin sensitizer by binding to the peroxisome proliferator activated receptor gamma (PPAR- γ). In this study, the effect of prenatally administered PPAR- γ agonist rosiglitazone on the number of pyramidal cell in hippocampus was investigated using histochemical and stereological techniques.

A total of eighteen female rats (Wistar albino) were divided into 3 groups as control (C), low-dose rosiglitazone (LDR) and high-dose rosiglitazone (HDR). Pregnant female rats in the LDR group received 2mg/kg dose of rosiglitazone via gavage daily for the first 16 days of pregnancy whereas rats in HDR group received 5mg/kg. Baby-rats were divided into three age groups as newborn (NB), 4-week (4W) and 12-week (12W). After histological process, stereological analyses were performed with systematic random sampling using the optical fractionation method.

In the light microscopic examination of rats, general histological structure and morphology of pyramidal cells of the hippocampal brain tissues of all groups were consistent with those described in the literature. While stereological counts revealed a significant reduction in the number of hippocampal pyramidal cells in control and LDR groups until 12th week after birth, no significant change was observed in HDR group in terms of the number of hippocampal pyramidal cells. In addition, when newborn groups were compared, the number of pyramidal cells in HDR NB group was less than those in LDR NB and CNB groups.

The results obtained can be interpreted that rosiglitazone exerts dose-dependent biphasic effect and exhibit neuron protective and anti-apoptotic activity against neurons at high doses but causes cell death by inducing apoptosis of neural stem cells or prevents differentiation of neural stem cells to neurons.

Key Words: Rosiglitazone, Hippocampus, Stereology, PPAR- γ , Neurogenesis

1. GİRİŞ

Gebelik süresince ilaç kullanımı hem annenin, hem de fetüsün sağlığını yakından ilgilendiren önemli bir konudur. Günümüzde birçok ilacın potansiyel teratojenik etkisi henüz ortaya konulamadığı için gebelikte ilaç kullanımının dikkatli ele alınması gerekir (Bakker ve diğ., 2006). Bazı durumlarda gebelik sırasında ilaç kullanımı zorunludur. Örneğin epilepsi, diyabet, inflamatuvar bağırsak hastalığı, astım, hipertansiyon gibi kronik hastalığı olan kadınlar gebeliklerinden önce almakta oldukları tıbbi tedaviye, gebelikleri sırasında da devam etmek zorunda kalabilirler (Moor, 1999; Wiebe, 2000).

Gebelikte ilaç kullanımı konusundaki bilgi, hamilelerde ilaçların etkilerine yönelik prospektif klinik çalışma yapmak etik olmayacağı için sınırlıdır. Gebelik döneminde alınan ilaçların ve metabolitlerin büyük bir kısmı fetusa geçmektedir. Büyük molekülü, yağda az çözünen, fazla oranda iyonize olan veya plazma proteinlerine önemli ölçüde bağlanan ilaçların plasentayı aşması ve anne ile fetus arasında difüzyon dengesine ulaşılması uzun süre alabilir ve bu şekilde verilen tek bir ilaç dozu zararsız olabilir. Ancak özellikle ilaçla kronik tedavi sırasında bu konunun önemi artar. İlacın anne karnındaki derişimi arttıkça fetusa ulaşma ve zararlı olma riski de artar. Amerikan Gıda ve İlaç Birliği (FDA) hali hazırda var olan klinik deneyimlere göre ilaçları olası teratojenik etkilerinin ciddiyeti açısından 5 kategori içinde A'dan X'e doğru sınıflandırmıştır. A kategorisi normal dozlarında herhangi bir teratojenik etkiye sahip olması beklenmeyen ilaçları, X kategorisi ise teratojenik etkiye sahip olması olasılığı son derece yüksek olan ve bu nedenle gebelikte hiçbir şekilde kullanılmaması gereken ilaçları içerir. C kategorisindeki ilaçlar ise; hayvanlarda embriyosit ve teratojenik etkileri gösterilmiş ancak hamilelerde klinik deneyimin yetersiz olduğu, ya da deney hayvanlarında veya hamilelerde incelenmeyen ilaçlardır.

Tiazolidinedionlar (TZD) son yıllarda üzerinde en fazla araştırma yapılan, tip 2 diyabetin tedavisinde kullanılan insülin duyarlılaştırıcı ajanlardır. TZD'ler, insülin direncini azaltarak glisemik kontrolü sağlarlar. TZD'ler lipofilik olduklarından

çekirdeğe girebilirler ve peroksizom proliferatör tarafından aktive edilen reseptör-gamma (PPAR- γ)'ya bağlanarak, aktivasyonunu sağlarlar. (Day, 1999).

Troglitazon, 1997'de kullanıma giren Tiazolidinedion grubunun ilk ajanıdır. Fakat troglitazon 2000 yılında hepatotoksik etkisinden dolayı piyasadan geri çekilmiştir. Tiazolidinedion ailesinin kullanımda olan iki üyesi rosiglitazon ve pioglitazondur. Bunlar FDA tarafından gebelikte kullanımları açısından C kategorisine giren ilaçlardır. Yani bu ilaçların gebelikte kullanımının fetus üzerine etkileri hakkında yeterli çalışma ve bilgi bulunmamaktadır (Sawickive Glod, 2004).

Rosiglitazonun gebelikte kullanımı doktorlar tarafından tavsiye edilmemiştir. Çünkü çalışılan hayvan modellerinde geç gebeliğin ortalarında rosiglitazon kullanımının fetal ölüm ve gelişme bozukluğuyla sonuçlandığı gösterilmiştir. Öte yandan rosiglitazonun gebelikte kullanımıyla ilgili iki hasta rapor edilmiştir. Bu raporlardan ilkinde; diyabetik ve hipertansif bir kadının, gebe olduğunun farkında olmadan ilk 7 hafta 4mg/gün rosiglitazon kullandığı ancak gebeliğinin 36. haftasında normal sağlıklı bir bebek doğurduğu rapor edilmiştir (Yarisve diğ., 2004). İkinci raporda ise; multigravid diyabetik bir kadına, gebeliğin 13. haftasına kadar herhangi bir ilaç tedavisi uygulanmayıp sadece egzersiz ve diyet uygulandığı, 13. haftadan 17. haftaya kadar 4mg/gün rosiglitazon kullanıldığı, 17. haftada rosiglitazonun kesildiği ve insülin tedavisi başlandığı, gebe kadının gebeliğin 37. haftasında herhangi bir malformasyon olmaksızın sağlıklı bir bebek doğurduğu bildirilmiştir (Kalyoncu ve diğ., 2005). Her ne kadar bu 2 rapor rosiglitazonun gebelikte kısa süreli kullanımının herhangi bir yan etkiye neden olmadığını gösterse de, gebelikte kullanımındaki güvenilirliği ile ilgili bir yargıya varmak zordur.

Gebeliğin ilk üç ayında rosiglitazonun plasental transferi ile ilgili bir çalışma da Chan ve diğ., (2005) tarafından bildirilmiştir. Bu çalışmada, 31 gebe kadına gebeliklerinin 8-12. haftaları arasında rosiglitazon verilmiş ve gebe kadınların gebelikleri cerrahi müdahale ile sonlandırılmıştır. 19 fetal örnekte (% 61.3) rosiglitazon tespit edilmiştir. Bu da plasental transfer ve fetal olarak rosiglitazona maruz kalmanın yüksek riske sahip olduğunu göstermektedir.

Son yıllarda gebelikte rosiglitazon kullanımı ile ilgili yapılan diğer önemli çalışmalardan birisi de Klinkler ve diğ., (2006)' nin yapmış oldukları çalışmadır. Araştırmacılar yapmış oldukları bu çalışmada rosiglitazonun gebelikte kullanımının fare fetusunda fenotipik bir bozukluğa neden olmadığını veya in vitro fare blastosist gelişimine zarar vermediğini göstermişlerdir.

Gebelikte rosiglitazon kullanımının güvenilirliğiyle ilgili yapılan çalışmaların yanında rosiglitazonun henüz tam olarak açıklanamamış olan etki mekanizmasını araştırmak amacıyla onun agonist olarak işlev gördüğü peroksizom proliferatör ile aktive olan reseptörlerle (PPAR'lar) ilgili de çalışmalar yapılmıştır.

PPAR'ların fizyolojik ve patofizyolojik süreçlerdeki biyolojisi, öncelikle periferik organ ve dokularda çalışılmıştır. Son yıllarda, PPAR'ların çeşitli merkezi sinir sistemi (MSS) hastalıklarının patogeneğinde önemli bir rol oynadığı da belirlenmiştir. PPAR'ların aktivasyonunun ve özellikle de PPAR γ izoformunun, periferik makrofajlarda ve insan otoimmün hastalık modellerinde enflamasyonu bastırdığına dair sonuçlar bulunmuştur. Bu bulgular bilim insanlarını, enflamatuvar bileşeni aynı olan birçok merkezi sinir sistemi bozukluklarında önemli olan bu etkileyici aktivitelerin deneysel olarak değerlendirilmesi için araştırma yapmaya teşvik etmiştir (Heneka ve Landreth, 2007).

Inestrosa ve diğ., (2005)' nin yapmış oldukları moleküler ve histolojik çalışmaların sonuçlarıyla, ratların hipokampal nöronlarında PPAR- γ 'nın eksprese edildiğini ve PPAR- γ agonistleri olan troglitazon, rosiglitazon ve siglitazon tarafından β -amiloid nörodejenerasyonunun engellendiğini göstermişlerdir.

Collino ve diğ., (2006)' nin yapmış oldukları çalışmanın sonuçları, serebral iskemi/reperfüzyona maruz bırakılan ratlarda, PPAR- γ agonistleri olan rosiglitazon ve pioglitazonun, aşırı inflamatuvar yanıtı ve oksidatif stresi engelleyerek hipokampusta koruyucu etki sergilediklerini göstermiştir.

Birçok araştırmacı nörodejenaratif hastalıklara karşı PPAR γ agonistlerinin nörokoruyucu etkileri üzerine odaklanmış olmasına rağmen, PPAR γ agonistlerinin nöroenezis üzerine etkileriyle ilgili sadece bir kaç çalışma vardır.

Bütün bunların yanında, rosiglitazonun farklı hücre tiplerinde ve farklı kullanım dozlarında farklı etkiler gösterdiğide diğer önemli konulardan biridir. PPAR- γ agonistlerinin endotelial hücreleri, vasküler düz kas hücrelerini ve kanser hücrelerini de içeren farklı tipteki hücrelerde apoptozisi indüklediği rapor edilmiştir (Okura ve diğ., 2000; Ho ve diğ., 2007). Diğer yandan, rosiglitazonun kardiyomiyositler, β -adacık hücreleri ve nöronları apoptozise karşı koruduğu da raporlanmıştır (Lin ve diğ., 2005; Kilter ve diğ., 2009; Wu ve diğ., 2009). Bu raporlardaki çelişkili sonuçlar belirsizdir ancak bu durum, PPAR- γ agonistlerinin farklı konsantrasyonlarda kullanımı, farklı hücre tipleri ve/veya agonistlerin PPAR- γ 'dan bağımsız etkileriyle açıklanabilir.

Rosiglitazon, hipoksi/reoksijenasyon-indüklü nöronal apoptozis üzerine bifazik bir etki göstermektedir. İn vitro düşük konsantrasyonlarda (<50µM) ve in vivo düşük dozlarda (<50ng) nöronal apoptozise karşı koruyucu etki gösterirken, yüksek dozlarda herhangi bir koruyucu etki göstermemektedir (Wu ve diğ., 2009). TZD'lerin konsantrasyona bağlı olarak hücre ve doku koruyuculuğu üzerine bifazik etki mekanizması tam olarak açıklanamamıştır ve bu konuda daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.

Çalışmamızda yöntem olarak seçtiğimiz stereoloji, üç boyutlu örneklerin (biyolojik yapılar, metalurjik örnekler vb.) iki boyutlu kesitlerinden elde edilen verilere dayanarak, onların gerçekteki üç boyutlu özellikleri ile ilgili bilgilerin elde edilmesini ve yorumlar yapılmasını sağlayan bilim dalıdır (Ünal ve diğ., 2002a). Biyolojik yapılarla ilgili çalışmalarda, sayısal verilerin önemi büyüktür. Özellikle hücre, çekirdek, mitokondri vs. gibi doku bileşenlerinin sayısı, karşılaştırmalı çalışmalar, toksikoloji ve gelişim biyolojisi başta olmak üzere, yapısal nicelik ile fonksiyon arasındaki ilişkilerin incelendiği tüm dallarda önemli veriler sağlar (Gundersen, 1986). Bir organ veya yapıdaki belli bazı partiküllerin sayılarını belirlemek için yıllar boyunca değişik metotlar kullanılmıştır (Abercrombie, 1946; Weibel, 1969; Haug, 1986). Ancak zaman içerisinde bu metotlarla ilgili yapılan hatalar fark edilmiş ve bunlar dikkate alınarak, günümüzde modern stereolojik metotlar geliştirilmiştir. Bugün kullanmış olduğumuz bu metodla elde edilen sayısal verilerin güvenilirliği ve geçerliliği konunun uzmanları tarafından da kabul edilmektedir (Ünal ve diğ., 2002a).

Yapılan bu çalışmada, tip 2 diyabet tedavisinde yaygın olarak kullanılan, PPARγ agonisti olarak aktivite gösteren, beyinde nörodejeneratif hasarlara karşı koruyucu etki gösterdiğine ve nörogenezis üzerinde de etkili olduğunu gösteren sadece bir kaç çalışmanın olduğu belirlenen rosiglitazon kullanıldı. Bununla beraber yapılan literatür taramasında rosiglitazonun hangi dozda kullanıldığının hücre veya doku düzeyinde göstereceği etki üzerinde önemli bir faktör olduğu gözlemlendi. Bu nedenle çalışmada, rosiglitazonun iki farklı dozunun prenatal dönemde uygulanmasının beyinde nörogenezisin prenatal dönemde başlayıp postnatal dönemde de devam ettiği bilinen hipokampusta, postnatal dönemde piramidal hücre sayısı ve morfolojisi üzerine etkilerinin stereolojik ve histolojik olarak araştırılması amaçlandı.

Yapılan literatür araştırmasında, prenatal dönemde farklı dozlarda uygulanan rosiglitazonun postnatal dönemde hipokampustaki piramidal hücre sayısı üzerine etkilerinin çalışıldığı stereolojik bir çalışmaya rastlanmadı. Bu nedenle çalışma sonuçlarının mevcut literatür bilgilerine katkı sağlayacağı ve bundan sonra bu konuda yapılacak çalışmalara ışık tutacağı kanısındayız.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Limbik Sistem

Limbik sistem başta hipotalamus olmak üzere bir kısım subkortikal yapılar (hipokampus, amigdala, septal alan, paraolfaktör alan, talamusun anterior çekirdekleri) ve bunların etrafındaki korteks alanlarından (*cortex orbito frontalis*, *gyrus subcallosus*, *gyrus cingulate*, *gyrus parahippocampalis*, *uncus*) oluşmaktadır (Gökhan ve Çavuşoğlu, 1989).

Limbik sistem genel olarak duygular, dürtüler ve davranışlarla ilgili bir sistemdir. Bunun yanında hipotalamus, hemen hemen tüm otonom fonksiyonlar için ana kumanda merkezini oluşturur.

Yapılan çalışmalarla, limbik sistemin hem susama ve acıkma ile birlikte öfke ve saldırganlığa hem de tokluk ve sakinliğe yol açan merkezlere sahip olduğu gösterilmiştir (Gökhan ve Çavuşoğlu, 1989). Yukarıda söz edilen dürtüler dışında limbik sistemin bazı alanlarının cezalandırma ve ödüllendirme merkezleri bulundurduğu, bu merkezlerin özellikle amigdala ve hipokampusta olabileceği iddia edilmektedir (Gökhan ve Çavuşoğlu, 1989). Bu özelliklere ek olarak öğrenme ve hafızalama merkezlerinin yine limbik sistemin ve özellikle de hipokampusun bir fonksiyonu olması konunun önemini artırmaktadır.

2.2. Hipokampus

Filogenetik olarak en eski beyin kısımlarından birisi olan hipokampus, insanda lateral ventrikül alt boynuzunun tabanında bulunur. Kesitlerde C harfi şeklinde olan bu yapıya görünümü itibarıyla deniz atına benzetildiğinden dolayı hipokampus adı verilmiştir (Şekil 2.1). Algı ve bellek sistemleri arasında bağlantı kuran hipokampus, beynin birçok bölgesinden duyu lifleri almakta ve aldığı bu duyuları, forniks aracılığıyla hipotalamus, talamus ve septal sahaya iletmektedir. Bunun yanı sıra, hipokampus subkortikal alanlarla olan bağlantısı sayesinde, beynin birçok bölgesi ile iletişim halindedir. Öğrenme ve hafıza fonksiyonları üzerinde önemli role sahip olan hipokampus, yeni elde edilen bilgilerin depolanması ve anıların kısa süreli hafızadan uzun süreli hafızaya geçirilmesinde görev alır. Bu nedenle hipokampusta meydana gelebilecek bir hasar, belirtilen fonksiyonlarda bozukluklara neden olabilir. Sonuç olarak da; hipokampus lezyonlarında, anıların kısa süreli bellekten uzun süreli belleğe alınmasında sorun olduğu gözlenmiştir. Bunun yanı sıra, verbal veya sembolik anıların hafızada tutulmasının da mümkün olamayacağı ifade edilmiştir (Barr ve Klerman, 1988; Sadler, 1993; Aktan, 1997; Moore ve Persaud, 1998; Songur, 2001; Songur ve diğ., 2001).



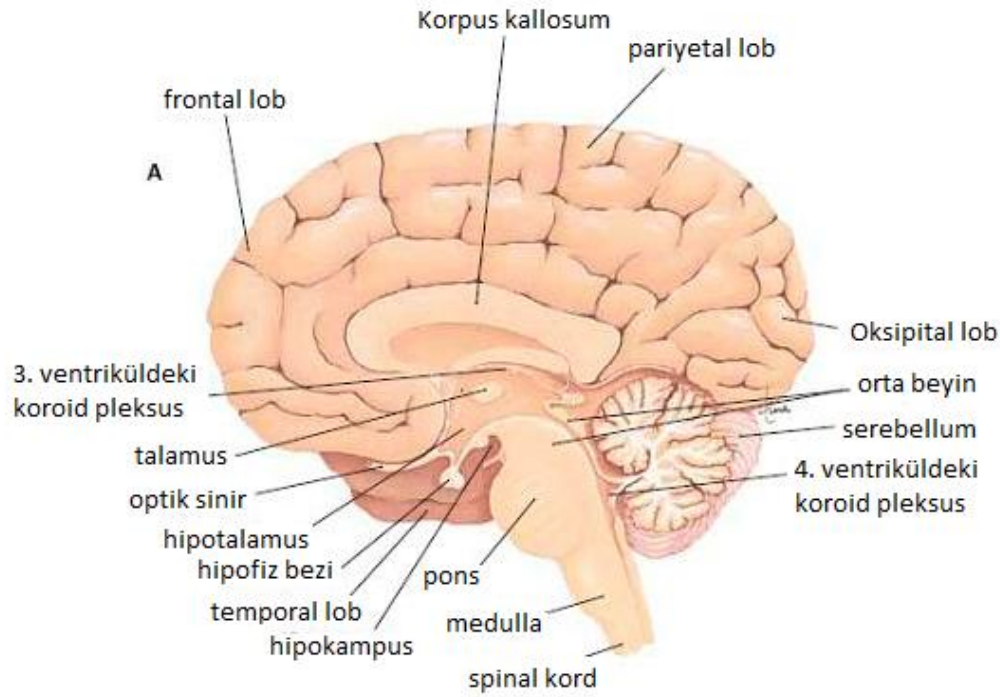
Şekil 2.1.Diseke edilen ve deniz atına benzetilen hipokampus (Touretzky, 2011).

2.2.1 Hipokampusun embriyolojik gelişimi

Serebral hemisfer duvarının diensefalon tavanına bitişik olduğu bölgede nöroblast gelişimi olmaz ve bu alan ince kalır. Bu bölgede, ikinci ayın ortalarında hemisferin duvarı üzerinde vasküler mezenşimle kaplı ependimal hücre tabakası oluşması ile koroid pleksus meydana gelir. Oluşan koroid pleksus, koroidal fissür olarak adlandırılan bir çizgiyi izleyerek lateral ventrikül içine girer. Bununla birlikte koroidal fissürün hemen üzerinde bulunan hemisfer duvarı kalınlaşır ve hipokampusu oluşturur. Hipokampus daha sonra kendi içinde katlanmış olarak lateral ventrikülün içine doğru genişler (Sadler, 1996).

2.2.2. Hipokampus anatomisi

Hipokampus, gri cevher tabakasından oluşmuştur ve lateral ventrikülün alt boynuz tabanı boyunca uzanır. Ventriküle bakan yüzü konveks, hemisferin alt kısmına bakan yüzü ise konkavdır. Uzunluğu yaklaşık 5 cm'dir (Şekil. 2.2) (Arıncı ve Elhan, 2001). Genişlemiş ön kısmına *pes hippocampi* adı verilir ve bu bölgede *digitationes hippocampi* olarak isimlendirilen iki ya da üç adet çıkıntı bulunur. Hipokampusun konveks olan ventriküler yüzeyi kendi hücrelerinden gelen aksonların oluşturduğu alveus ile örtülüdür. Bu lifler medialde şerit şeklinde birbirine yaklaşarak *fimbria hippocampi*'yi oluşturur. Fimbria hippocampi'nin arka ucu alveus ile birlikte *crus fornicis*'i meydana getirir. Ön ucu ise *uncus gyri hippocampi*'nin beyaz cevherinde sonlanır. Alveus'tan gelip *fimbria hippocampi*'ye dahil olan lifler, *fornix*'in başlangıcını oluşturmaktadır (Carpenter ve Sutin, 1983; Barr ve Klerman, 1988; Nolte, 1988; Arıncı ve Elhan, 2001; Songur, 2001; Songur ve diğ., 2001; Türkoğlu, 2005).



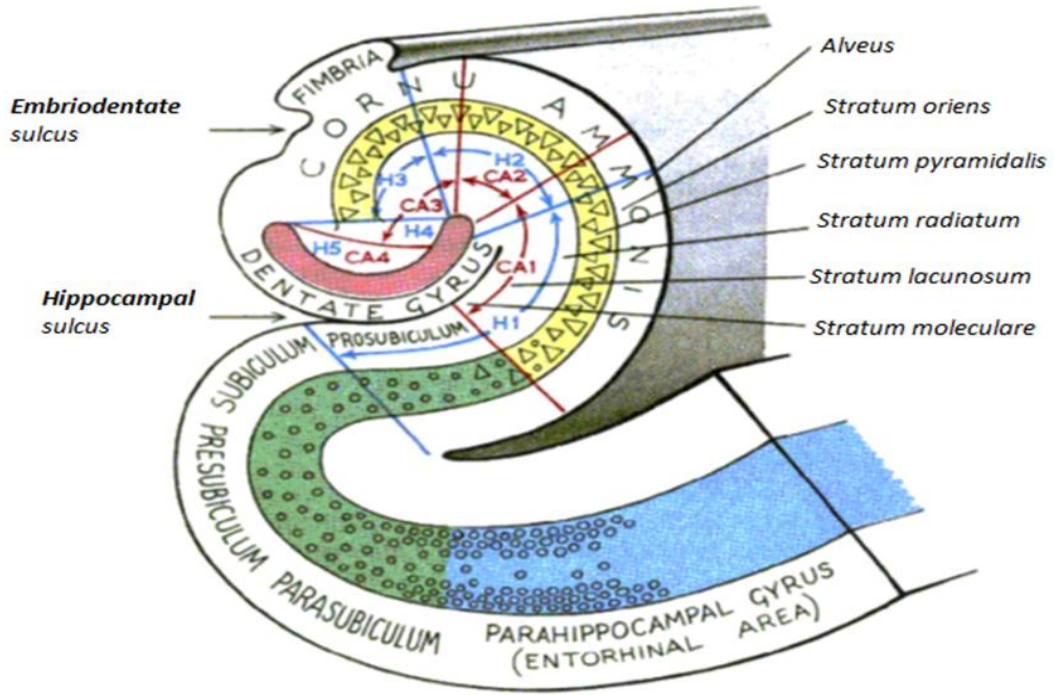
Şekil 2.2. İnsan hipokampusun genel görüntüsü (Scanlon ve Sanders, 2006).

Hipokampus genelde hipokampal formasyon içerisinde ifade edilir. Bu yapıda *gyrus dentatus*, *cornu ammonis* bölgeleri olan CA1, CA2, CA3 (CA4 genellikle hilus olarak geçer ve *gyrus dentatus*'un bir parçası olarak düşünülür), ve “subiculum” bulunur. Esas sınırlı anatomiye CA1, CA2 ve CA3 bölgeleri oluşturur (Songur ve diğ., 2001).

CA1 *subiculum*'a en yakın olan bölge, CA3 ise *gyrus dentatus*'a en yakın olan hipokampus alanıdır (Mayer, 1971; Barry ve diğ., 1995; Songur, 2001; Songur ve diğ., 2001). CA4 bölgesi de, CA3 ile *gyrus dentatus* arasında yerleşmiştir (Barry ve diğ., 1995).

Hipokampusun piramidal hücre boyutlarının en fazla olduğu alanı CA3'tür. Bu bölgede bulunan hücrelerin bir başka özelliği de dentat granüler hücrelerden gelen “mossy lifleri”ni (yosunsu lifler) almasıdır. Piramidal hücre yoğunluğunun en çok olduğu alan ise CA2'dir ve bu kısımda mossy lifleri görülmez. CA2'ye supramamillar bölge ve *hypothalamus*'tan yoğun lifler gelir. CA1 ise hipokampus'un en karmaşık bölgesidir. Boyutları birbirinden farklı piramidal hücrelerin bulunduğu bu alanda, hücrelerin %10'unu internöronlar meydana getirir (Songur, 2001; Barry ve diğ., 1995).

2.2.3. Hipokampus histolojisi



Şekil 2.3. Hipokampusun enine kesitinin şematik görüntüsü (Williams ve diğ., 1989).

İlk bakıldığı zaman hipokampusun bilaminar bir özellikte olduğu görülür. Bu tabakalardan ilki; **Cornu Ammonis (CA)** olup çoğunlukla hipokampus terimi ile ifade edilen yapıdır. İkincisi ise; **Gyrus Dentatus (GD)** olarak adlandırılan oluşumdur (Şekil 2.3, 2.4) (Williams, 1995).

2.2.3.1. Cornu ammonis (CA)

Cornu ammonis (CA) sahip olduğu hücre tiplerinin farklı yapısal özelliklerinden dolayı, kendi içinde **cornu ammonis** CA1, CA2, CA3 ve CA4 olarak adlandırılan alt alanlara bölünerek incelenmektedir. Bunlardan **CA1 bölgesi subiculum'a**, **CA4 bölgesi ise gyrus dentatus'a** yakın olan bölgedir (Şekil 2.4).

Subiculum'a yakın olan CA1 bölgesindeki piramidal hücreler tipik olarak üçgenimsi şekilde, genellikle küçük ve dağınık yerleşim gösterirler. Bu bölgeyle ilgili diğer bir özellik ise insan CA1 bölgesinin *stratum pyramidale*'si uzun ve dar, sıçanlarda ise ilgili bölgenin küçük ve yoğun olmasıdır. İnsan CA1 bölgesinin

stratum pyramidale'sinde iki alt tabaka seçilebilmektedir. Bu alt tabakalar *stratum profundum* ve *stratum superficiale* olarak adlandırılır (Braak, 1974).

CA'in ikinci parçası olan CA2 bölgesinde yoğun bir şekilde yerleşim eğilimine sahip büyük ve ovoid piramidal hücrelerin varlığı dikkati çeken ilk özelliktir (Şekil 2.4). Bu bölgede dikkati çeken diğer bir özellik ise *stratum pyramidale* tabakasının yoğun, küçük ve dar olmasıdır (Şekil 2.4) (Amaral ve diğ., 1984)

CA'in üçüncü parçası olan CA3 bölgesinde yerleşik bulunan piramidal hücreler, CA2 bölgesinin içindeki piramidal hücrelere benzerlik göstermelerine rağmen yoğunlukları daha azdır. CA3 bölgesinde dikkati çeken en önemli özellik ise bu bölgede miyelinleşmemiş liflerin ve *gyrus dentatus*'tan kaynaklanan "mossy" liflerinin bulunmasıdır.

CA4 bölgesi; *gyrus dentatus*'un iç bükey kavitesinin içinde yerleşmiştir. Bu bölgedeki hücreler büyük boyutlu, ovoid yapıda, miktar olarak ise birkaç tane olup birbirleri arasında dağınık tarzda yerleşmişlerdir (Şekil 2.4). CA4 bölgesinin karakteristik özelliği ise; "mossy" miyelinli liflerin dağınık yerleşime sahip olmalarıdır (Duvernoy, 2005).

Cornu ammonis'in mikroskobik yapısı incelendiğinde, ventriküler yüzeyden derine doğru toplam yedi tabakadan meydana geldiği görülür (Şekil 2.3, 2.4) (Aktan, 1997).

Bu tabakalar sırasıyla;

- 1- *Alveus*,
- 2- *Stratum oriens*,
- 3- *Stratum pyramidalis*,
- 4- *Stratum lucidum*,
- 5- *Stratum radiatum*,
- 6- *Stratum lacunosum* ve
- 7- *Stratum moleculare*'dir.

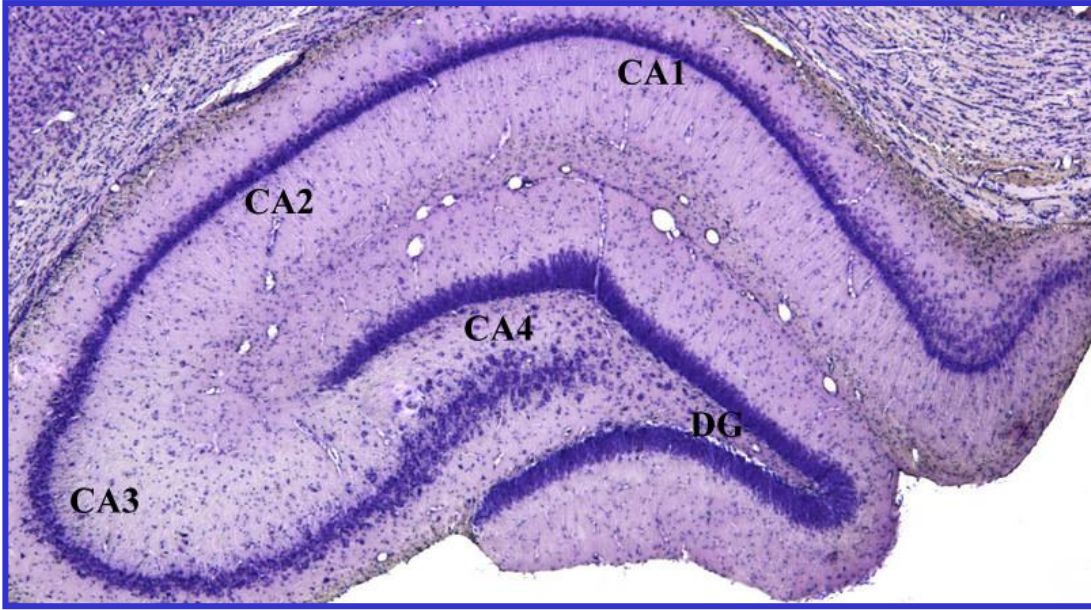
- 1- **Alveus:** *Subiculum* ve hipokampusu ait piramidal hücre aksonlarını içerir.
- 2- **Stratum oriens:** Esas olarak piramidal hücrelerin bazal dendritleri ile internöronların yerleştiği tabakadır. Buradaki çoğu nöron aksonları *alveus* liflerine katılır. Diğer hücre aksonları ise, en derinde yer alan moleküler tabakaya kadar uzanır (Barr ve Klernam 1988; Barry ve diğ., 1995).

- 3- ***Stratum pyramidalis***: Karakteristik olarak bu tabakada büyük piramidal ve Golgi tip II hücreleri çoğunluktadır. Piramidal hücrelerin tabanı hipokampusun ventriküler yüzeyine dönüktür ve bazal - apikal dendritleri komşu tabakalara kadar uzanır. Aksonları ise *stratum oriens*'ten geçerek alveus liflerine katılırlar. Hipokampusa asıl şeklini veren buradaki piramidal hücrelerin dizilimidir (Raismanve diğ., 1965).Piramidal tabakada, değişik yollar takip eden kısa aksonlu hücreler de mevcuttur. Sepet hücreleri bu grup hücreler arasında yer alırlar. *Stratum oriens* ile *Stratum pyramidale* arasındaki geçiş alanında bulunan bu hücreler hipokampus'un iç aktivitesini düzenlerler. Sepet hücrelerinin aksonları *alveus hippocampi*'ye uğramadan zıt yönde ilerler ve piramidal hücrelerin çevresinde yoğun bir ağ yapar. Daha sonra *stratum radiatum*'a geçer (Songur, 2001; Colonnier, 1966).
- 4- ***Stratum lucidum***: CA3 alanındaki piramidal hücreler ile bağlantı sağlayan yosunsu (mossy) lifler içerir. Diğer primatlara göre insanlarda daha belirgin olup CA1 ile CA2 alanlarında bulunmaz (Barry ve diğ., 1995).
- 5- ***Stratum radiatum***: Geniş bir ağ yapısına sahiptir ve bu tabakada, piramidal tabakanın sınırından ışınsal uzanan dallar bulunur (Carpenter ve Sutin, 1983).
- 6- ***Stratum lacunosum***: *Area entorhinalis*'ten gelen önemli afferent lifler burada sonlanır.
- 7- ***Stratum moleculare***:İnce sinir lifleri ve çok az sayıda nöron içerir (Şekil 2.5).

Hipokampus'un son üç tabakası "*stratum moleculare*" adı altında tek bir katman olarak da kabul edilmektedir. Bazı kaynaklar ise 6. ve 7. tabakaları *stratum lacunosum-moleculare* ismiyle ifade edilmektedir (Barr ve Klernam, 1988; Carpenter ve Sutin, 1983; Barryve diğ., 1995; Colonnier, 1966).

2.2.3.2. *Gyrus dentatus (dentat girus, dental gyri, fascia dentata, gyrus involutus)*

Gyrus dentatus (DG), hippokampal gövdenin koronal kısmında yerleşik tir ve hipokampus gövdesinin koronal kesitinde dar, konkav bir tabakadır. Kemirgenlerde granül hücre tabakası "V" yada "U" seklindedir. Konkavitesi, ammon boynuzunun CA4 bölgesini sarmaktadır (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Hipokampusun *Cornu ammonis* (CA) ve *Dentat girus* (DG) tabakaları.

3 tabakadan oluşur:

1. *Stratum moleculare*,
2. *Stratum granulosum*, granül hücrelerin bulunduğu granül hücre tabakası (asıl tabaka),
3. *Stratum polymorpha*, granül hücre tabakasının altında ise yaygın bir şekilde çeşitli hücre tiplerinin bulunduğu tabaka olan polimorfik hücre tabakası (hilus).

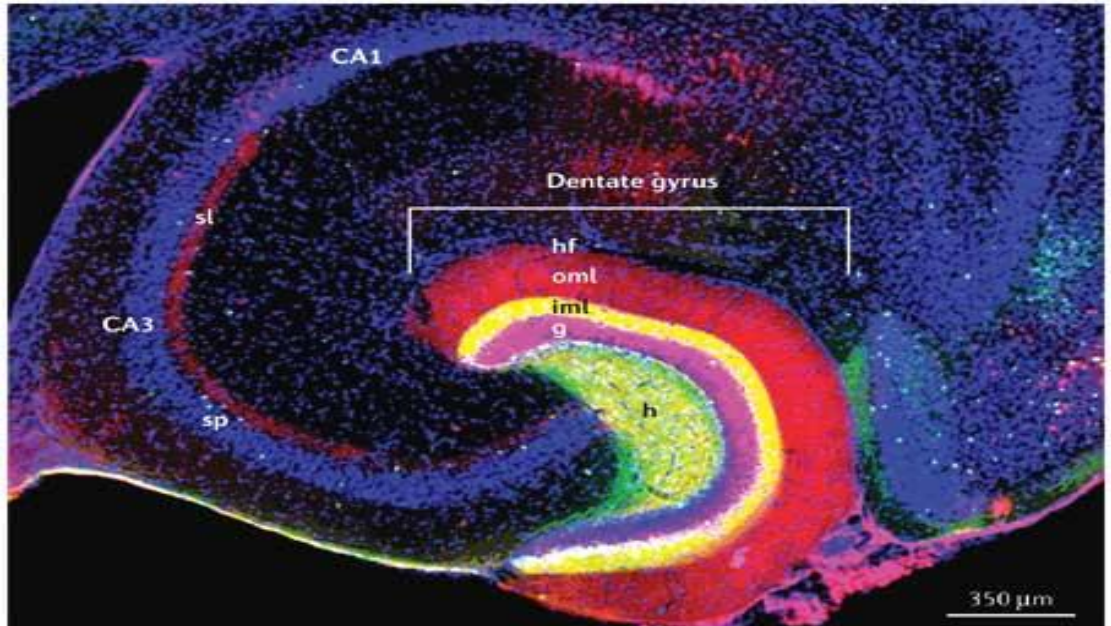
Stratum moleculare, granül hücre tabakasının üstünde hücre içermeyen geniş bir tabakadır. Dendritik uzantılar ile akson lifleri içerir (Şekil 2.5) (Johnston ve Amaral, 1998; Duvernoy, 2005).

Stratum granulosum, bu tabaka *gyrus dentatus*'un esas hücresel tabakasıdır ve granül hücresi gövdelerini içerir. Granül hücreleri küçük (10 µm civarı çapa sahip), yuvarlak görünümlü hücre gövdelerine sahiptir. Granül hücrelerinin sayısı yaklaşık 9 milyon kadardır. Bu hücreler 4-6 kadar sıra yaparak granül hücre tabakasını oluştururlar (Johnston ve Amaral, 1998; Duvernoy, 2005). Burada bulunan granüller hücrelerin dentritleri, perforan yollarla, *Str. moleculare*'ye geçip oradaki hücrelerin aksonları ile sinaps yapar. Aksonları ise “mosy” lifleridir ve *str. polimorfe* ve *cornu ammonis*'in *str. lusidum* tabakalarında bulunan piramidal hücrelerin dentritleri ile sinaptik bağlantı kurarlar (Williams ve diğ., 1989; Canan, 1997).

Stratum polymorph, ya da diğer adıyla plexiform layer, CA4 bölgesi için granüler tabaka ile birleşir ve granüler nöronların aksonları tarafından karşıdan karşıya geçirilir. Moleküler ve polimorfik tabakalarda birkaç tane ara nöron vardır. CA4 bölgesi ise yalnızdır. Bazen “end-folium”, “end-blade” ve *fascia dentata*’nın hilusu olarak da isimlendirilir (Duvernoy, 2005).

Hipokampus, parahipokampal girusun bir kısmını oluşturan subiculum ile devam eder (Duvernoy, 2005; Johnston ve Amaral, 1998). Subiculum pek çok segmente ayrılır;

1. *Prosubiculum* (CA1 ile devam eder),
2. *Subiculum proper*,
3. *Presubiculum*,
4. *Parasubiculum* (parahipokampal girusun kenarından entorinal alana geçer) (Johnston ve Amaral, 1998; Duvernoy, 2005).



Şekil 2.5. Hipokampusun hilar bölgesindeki (**h**) mossy hücreleri. **İml:** iç moleküler tabaka, **oml:** dış moleküler tabaka, **sp:** CA1 ve CA3 alanlarındaki piramidal tabaka **sl:** stratum lusidum, **hf:** hipokampal yarık, **g:** granüler tabaka (Förster ve diğ., 2006).

2.2.4. Hipokampal yollar

2.2.4.1. Afferent yollar

Hipokampus bölgesi gerek direk gerekse dolaylı yollardan tanımlanan tüm duyuşal uyarınları barındıran afferent bağlantılara sahiptir (Songur ve diğ., 2001). *Area entorhinalis*'ten gelen duyular dört yolla hipokampus'a iletilir:

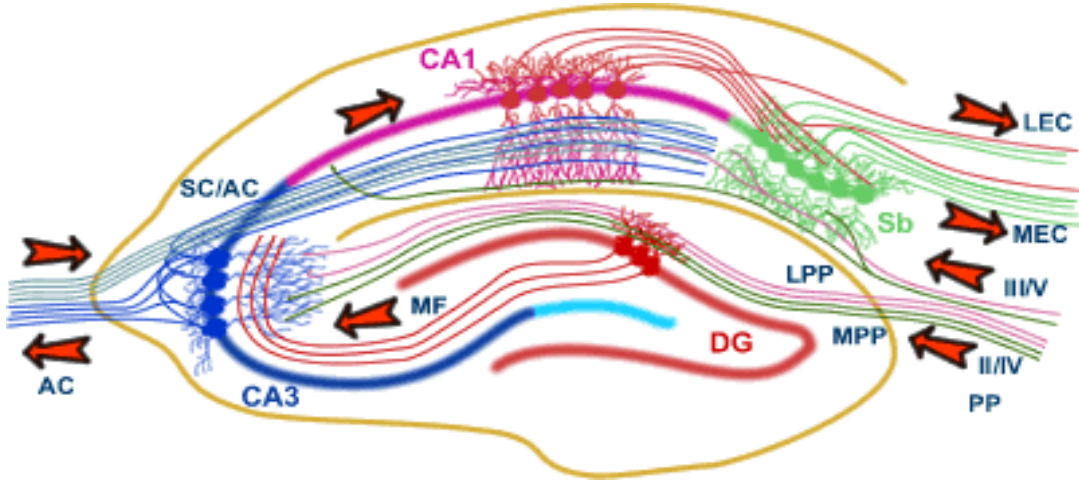
- 1- Perforant yollar: Entorhinal korteksten gelen akson uzantılarının CA4 bölgesi hariç, CA1-2 ve 3 bölgelerine uzandıkları belirlenmiştir.
- 2- Alvear yol: *Gyrus dentatus* boyunca CA3 bölgesine ulaşan "mossy" liflerinin meydana getirdiğı yoldur.
- 3- Schaffer kollateralleri adı verilen yol, CA3 ve CA2 alanlarından kalkıp CA1 alanında sonlanan piramidal hücre uzantılarından meydana gelmektedir.
- 4- Dağılan liflerin oluşturduğu yol: Beynin subkortikal alanlarından çıkıp *cornu ammonis*'in (CA) ilk tabakası olan alveustan geçerek hipokampusun CA1 alanı ve subiculum'un iç tabakasına uzanan yoldur (Şekil2.6).

Yukarıda tarifi yapılan dört ana afferent kaynak dışında da hipokampus'un, *gyrus parahipokampalis*'in korteksinden, *nuclei anteriores thalami*, *area hypothalamica posterior*, *corpus mamillare*, *area septalis*, *substantia innominata*, *ventral tegmental area*, *nuclei raphe* ve *nucleus parabrachialis*'ten de lifler aldığı gösterilmiştir (Steward ve Scoville, 1976; Barr ve Klerman, 1988; Songur ve diğ., 2001; Taupin, 2007).

2.2.4.2. Efferent yollar

Hipokampusun en büyük efferent yolu fornixdir. Hipokampus ve *subiculum*'dan başlayan miyelinli lifler, *alveus*'tan *fimbria hippocampi*'ye geçer. Sayıları 1.2-2.7 milyon arasında değişen bu lifler, *splenium corporis callosi*'nin altında *crus fornicis*; *thalamus*'un arkasında ise *corpus fornicis* olarak devam eder (Brodal,1981; Barr ve Klerman, 1988; Aktan, 1997; Songur, 2001). *Corpus fornicis*'ten sonra, *columna fornicis* ismiyle uzanan aksonlar, *foramen interventriculare* önünde kavis yaparak *nuclei anterioresthalami* ve *nucleus dorsalis lateralis thalami*'ye lifler verir. Bu liflere *postcommissural* lifler adı verilir (Steward ve Scoville, 1976; Songur ve diğ., 2001). Buradan hipotalamusa uzanan liflerin çoğı *corpus mamillare*'de ve hipotalamusun ventromedial nukleusunda sonlanır. *Columna fornicis*'ten *commissura anterior*'a ayrılan az sayıdaki *fornix* lifleri ise *area septalis*, *substantia*

innominata ve area *hypothalamica rostralis*'e geçerler. Bu liflere ise *precommissural* lifler adı verilir (Songur ve diğ., 2001; Barr ve Klernam, 1988; Brodal,1981).



Şekil 2.6. Hipokampusun bağlantıları. CA: *Cornu ammonis*, SC/AC: Schaffer kollateralleri ve kominikan yol, Sb: *Subiculum*, DG: *Dentat girus*, PP: Perforan yol, EC: Entorhinal korteks, MF: Mossy fibrilleri, LEC: CA1'den çıkıp entorhinal kortekse giden lateral fibriller, MEC: *subiculum*'dan çıkıp entorhinal kortekse giden median fibriller, III/V: Entorhinal korteksten CA1ve *subiculum*'a gelen fibriller, II/IV: Perforan yoldan *gyrus dentatus*'a ve CA3'e gelen fibriller, LPP: Lateral perforan yol, MPfP: Median perforan yol (Touretzky, 2011).

2.2.5. Hipokampus gelişimi

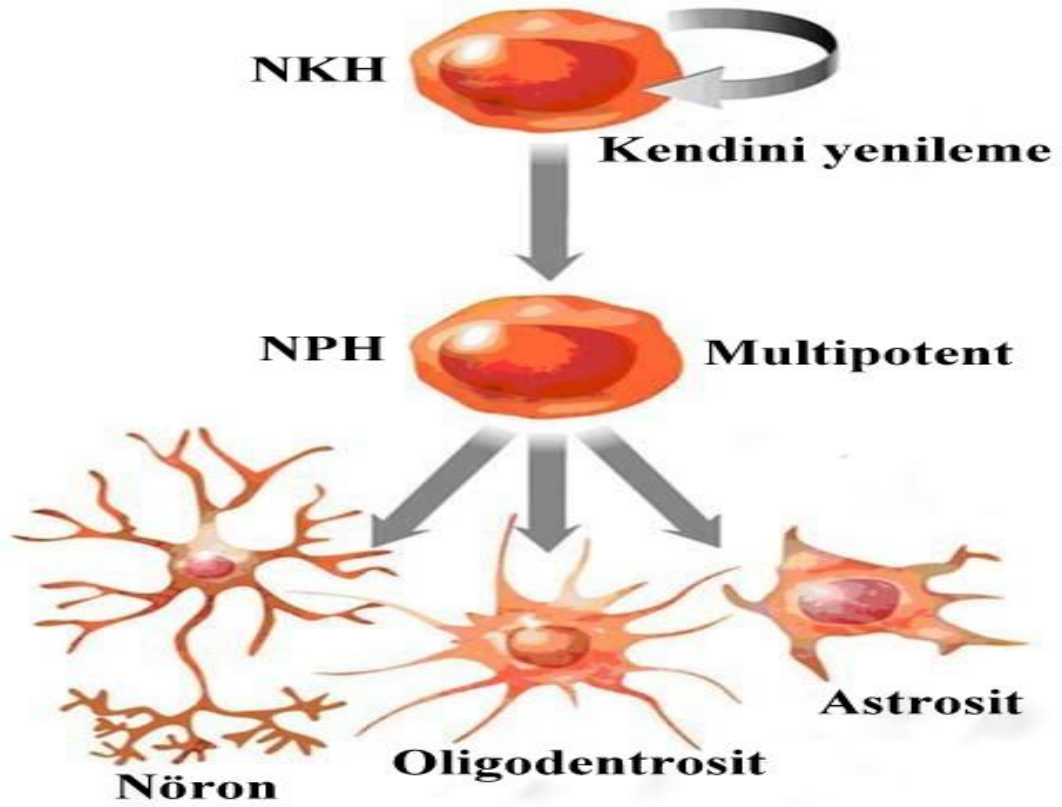
Memeli sinir sisteminin gelişimi, birçok sinir hücrelerinin ortaya çıkması ile prenatal dönemde başlar. Oysaki sinir sisteminin olgunlaşma süreci, mesela gliogenesis ve myelinasyon, doğumdan sonraki on yıllık süreç boyunca devam eder (Taupin, 2007). Hipokampus'da, granüler ve piramidal hücrelerin gelişim şekilleri birbirlerinden farklılıklar gösterir (Taupin, 2007). *Cornu ammonis*'in gelişimi, çoğu piramidal hücrelerin prenatal bir şekilde ortaya çıkması ile birlikte prenatal periyot içerisinde başlar. *Cornu ammonis*'in olgunlaşma süreci doğumdan sonraki 2-3. haftaya kadar devam eder (Taupin, 2007).

Beynin diğer alanlarının aksine; *gyrus dentatus*'un (DG) granüler hücrelerinin çoğu postnatal bir şekilde yaşamın ilk ikinci haftası esnasında ortaya çıkar. Granüler hücrelerin aksonları olan “mossy” liflerinin gelişimi ise postnatal bir gelişim gösterir (Taupin, 2007). “Mossy” liflerinin sinapslarının *stratum lucidum* ve CA3 bölgesinin piramidal hücrelerinin dendritleriyle bağlantı kurması, postnatal gelişimin ikinci haftası civarında CA3 bölgesindeki piramidal hücrelerin dendritik ağ örgülerinin

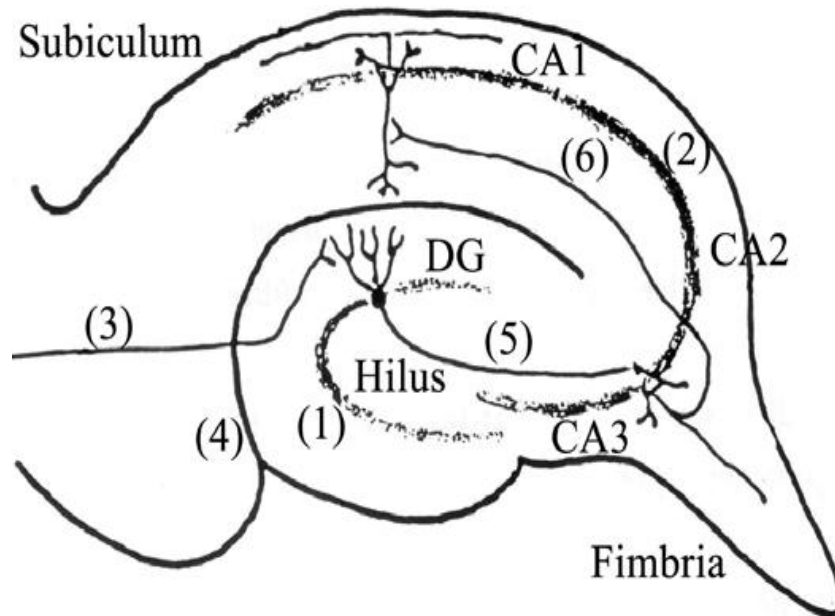
ortaya çıkmasına rastlamaktadır (Taupin, 2007). Postnatal dönemde hipokampusun CA3 internöronları ve hilar'dan kaynaklanan GABA, CA3 piramidal hücreleri üzerine bir depolarizan aktivitesi yaratır. Postnatal dönemde granül hücreleri de geçici olarak GABAerjik eksitator fenotipi ekspres eder. CA3 piramidal hücreleri üzerine GABAdepolarizan etkinliği ve granül hücreleri tarafından GABAerjik eksitator fenotipinin eksprese edilmesi, onların gelişim sırasında fizyolojik önemlerinin ve rollerinin ne olduğu sorusunu ortaya çıkarmaktadır (Taupin, 2007).

2.2.5.1. *Cornu ammonis*'in hipokampal alt cisimlerinin gelişimi

CA'nın gelişimi prenatalperiyotta başlar. Farelerde hipokampal piramidal hücrelerin orjiniinde yer alan nöronal progenitor (öncü) hücreler, embriyonik günlerin yaklaşık 10,5. günlerinde ortaya çıkarlar (Şekil 2.7, 2.8) (Taupin, 2007). Hipokampal piramidal hücrelerin orjiniindeki nöronal progenitor hücreleri, ventriküler zondan orjin alan nöral kök hücrelerinden köken alırlar. Sözü edilen progenitor hücrelerinin çoğu, embriyonun 14.5 gününe kadar, CA'nın orjinalinde olan piramidal hücreleri ortaya çıkarmasına izin verecek olan yerde, kortikal bir tabaka formunda ve onların son tahmin edilen pozisyonlarına göç etmiş oldukları görülmektedir (Şekil 11). Piramidal hücrelerin gelişiminin doğumdan sonraki 2–3 haftaya kadar uzadığı, özellikle de CA3'un piramidal hücrelerinin dendritik ağlarının postnatal dönemin ikinci haftası civarında tamamlandığı gösterilmiştir (Taupin, 2007).



Şekil 2.7. Nöral öncül ve kök hücreler. Nöral Kök Hücreler (NKH), Nöral Projenitör Hücreler (NPH) (Taupin, 2007).

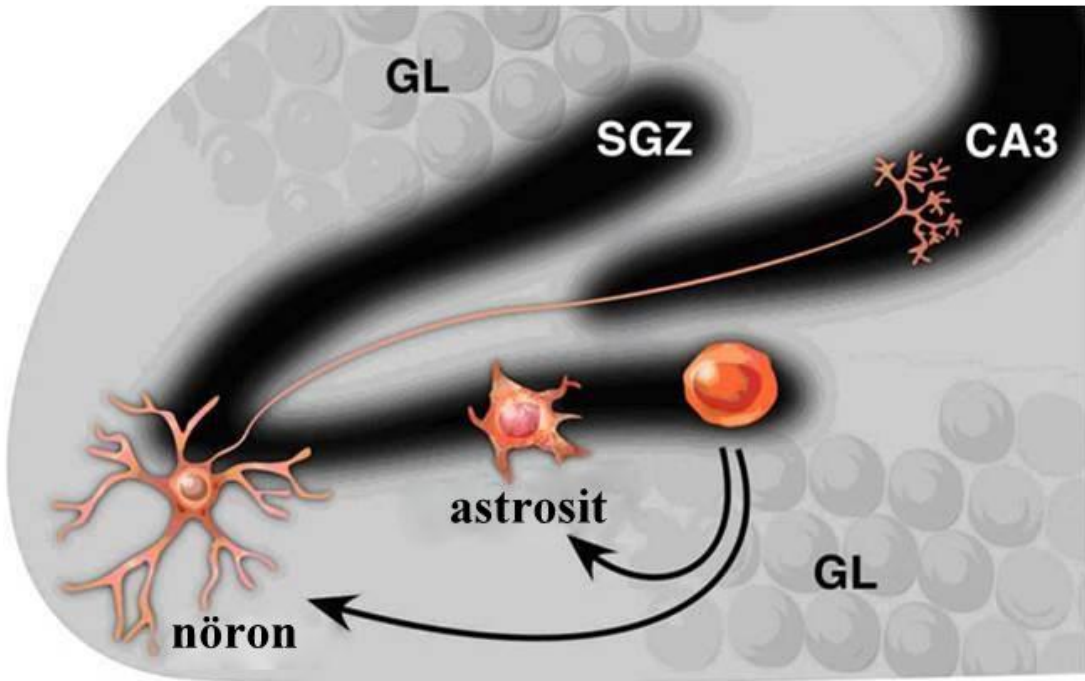


Şekil 2.8. Hipokampus'un sagittal kesiti. *Dentat girus* (DG), *Cornu ammonis* (CA) ve *Cornu ammonis*'in alt bölgeleri olan CA1, CA2, CA3 ve CA4 alanları (Taupin, 2007).

2.2.5.2. *Gyrus dentatus*'un gelişimi

2.2.5.2.1. Granüler hücreler

Hipokampusun, granüller ve piramidal hücrelerin gelişim şekilleri birbirlerinden farklılıklar gösterir. CA bölgelerinin piramidal hücreleri, diğer birçok beyin sinir hücreleri gibi, prenatal dönemde meydana gelir, DG granül hücrelerinin büyük bir çoğunluğu ise doğumdan sonraki ilk iki hafta içinde meydana gelir (Taupin, 2007). Dentat granül hücrelerinin ilk öncül hücreleri, CA3 piramidal hücrelerin öncül hücreleriyle aynı zamanda üretilir. Granül hücrelerinin yaklaşık %15'i doğum öncesinde, % 70'i doğumdan sonraki ilk iki haftada, % 15'i de postnatal 16. günden sonra oluşur (Şekil 2.9) (Taupin, 2007).



Şekil 2.9. Yetişkin *dentate gyrus*'unda nörogenezis. Granüler tabaka (GL), Subgranüler zon (SGZ) (Taupin, 2007).

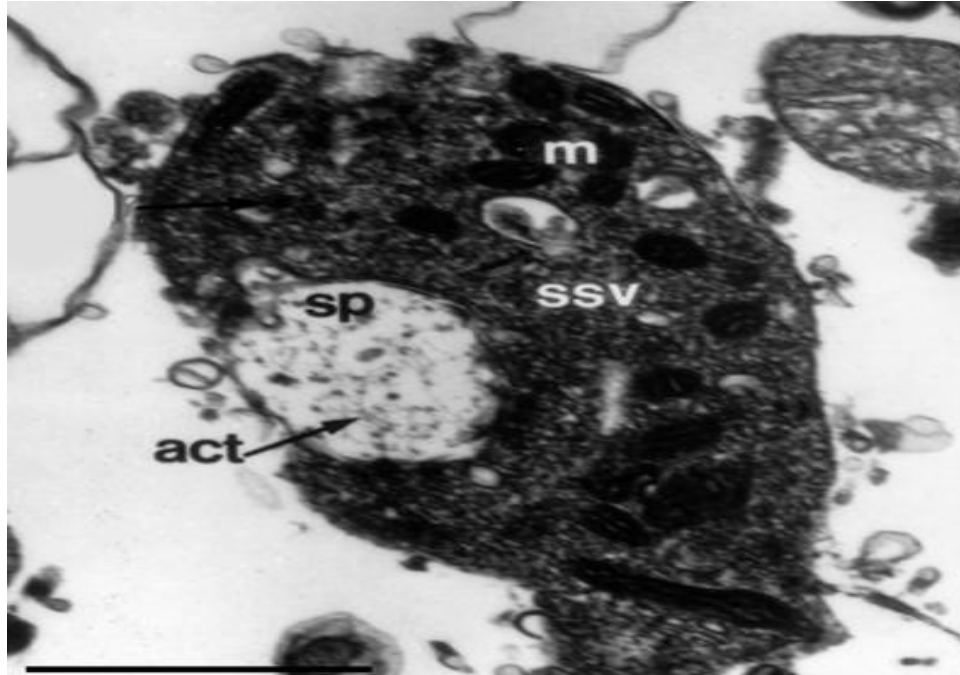
2.2.5.2.2. “Mossy” lifleri

Granül hücrelerinin aksonları olarak bilinen “mossy” lifleri, postnatal bir gelişime sahiptirler (Taupin, 2007). Mossy lifleri (ML) sinapsları stratum lucidum içinde, CA3 bölgesinin piramidal hücrelerinin dendritleri ile ilişkili bir şekilde yerleşmişlerdir (Şekil 2.10). CA3 piramidal hücreleri ile ML sinapslarının gelişimleri üç adımda gerçekleşir:

Kemiricilerde **ilk faz** esnasında, postnatal 3. gün ve postnatal 9. gün arasında CA3 bölgesinin *stratum lucidum*'una ulaşan granüler hücrelerin kozaları büyür. mossy liflerinin sonlanmış sinirleri CA3 piramidal hücrelerinin dendritleri ile hem simetrik hem de asimetrik olarak ilk sinaps bağlantılarını kurar. Bu zaman esnasında “mossy” liflerinin sonlanmış sinirleri boyca uzamaya başlar. Postnatal gelişimin 9. gününde ML sinapsları CA3 piramidal hücrelerinin dendritik ağ örgülerinin invaginasyon sürecini başlatmış olur (Taupin, 2007).

İkinci faz esnasında postnatal 10. gün ve postnatal 14. gün arasında ML sonlanmalarında sinaptik veziküllerin yoğunluğunda bir artma ile daha kompleks olmaya başlar. Bir arada olacak bir şekilde CA3 piramidal hücreler üzerinde dendritik ağ örgüleri görülmeye başlar (Taupin, 2007).

Postnatal 14. gün **üçüncü faz** esnasında, ML sinapsları onların olgunluklarını tamamlarlar. Özellikle ML terminalleri süreci tarafından CA3 dendritik ağ örgülerinin invaginasyon süreci, sinaps ML-CA3 piramidal hücrelerinde simetrik ve asimetrik kontakların miktarlarında bir artma ile ilerler. Postnatal 21. güne kadar, ML sonlanmalarının çapları 10 µm'ye ulaşır ve tamamen olgun görünüm kazanırlar. Yumru veya kabarcık şeklindeki oluşum içinde invagine olmuş dendritik ağ örgüleri ve yüksek veziküler yoğunluğu ile kompleks bir morfolojiye sahip olurlar (Taupin, 2007).



Şekil 2.10.“Mossy” sinapslarının elektron mikroskopik görüntüsü. Mitokondri (m), Aktin filemanları (act), Dendritik spin (sp), Küçük sinaptik vezikül (ssv) (Taupin, 2007).

2.2.6. Hipokampusun fizyolojisi ve kimyası

Hipokampusta monoaminerjik, kolinerjik, GABAerjik afferentler bulunur. Örneğin: hipokampustan en çok salgılanan eksitator transmitterlerin glutamat ve aspartat olduğu bilinir. *Stratum lacunosum* ve *stratum oriens*'te somatostatin-immünoreaktif lifler, *stratum pyramidalis*, *stratum radiatum* ve *stratum oriens*'te glutamat dekarboksilaz (GAD)-immünoreaktif lifler, *stratum pyramidalis*'te ise kolesistokinin (CCK)-immünoreaktif lifler bulunmaktadır. Bunun yanında; CA3'e giden "mossy" liflerinde bir opoid peptid olan dinorfin, hipokampusun çoğu bölgelerinde ise VIP (vazoaktif intestinal polipeptid) yaygın olarak bulunur (Barry ve diğ., 1995).

Yakın hafıza olarak tutulan bilgilerin sağlamlaştırılması uykunun REM safhasında meydana gelir. Bu safhada, hipokampusa işaret eden serotonerjik rafe nukleusları aktiftir. Derin uykuda yapılan neokorteksteki EEG kayıtları düzenli ve senkronize ritim gösterir. Ancak hipokampal EEG kayıtları desenkronizedir. Uyanıklık durumunda ise neokortikal EEG kayıtları desenkronize olmasına rağmen; hipokampal EEG kayıtları yavaş ve düzenli bir ritim gösterir. Hipokampusun EEG dalgaları ritmik sinüzoidal tipteki 'teta dalgaları'dır. Bu durum yapının spontan aktivitesini ve bilincin değişik devrelerle ilişkili olduğunu göstermektedir (Barr ve Klerman, 1988; Brodal, 1981).

Hipokampus; uzun süreli bir sinaptik ilişki türü olan "LTP (long term potentiation) ve iskemiye seçici duyarlılık" gibi konularda oldukça dikkat çeken bir yapıdır. Ayrıca hipokampusun diğer bir özelliği ise hipereksitabilitesidir. Örneğin; hafif elektriksel uyarılar, hipokampus bölgelerinde uyarı kesildikten sonra saniyeler süren lokal epileptik nöbetlere neden olur. Bu da hipokampusun belki normal koşullarda bile uzun süren sinyaller yaydığını gösterir (Guyton, 1987; Wieraszko ve Ball, 1993; Cizkova ve diğ., 1996).

2.2.7. Hipokampusun fonksiyonları

Hipokampusun yapısının karmaşıklığı ve beyindeki birçok bölge ile yakın ilişkisi nedeniyle fonksiyonunun açıklanmasında güçlük çekilmektedir (Kandel, 1979; Cooper, 1981; Nolte, 1988). Bu nedenle, hipokampusun tek başına yaptığı fonksiyonları tanımlamak yerine, karmaşık fonksiyonlardaki rolü üzerinde durmak daha doğru olacaktır (Brodal, 1981; Carpenter, 1983). Hipokampusun, 1948 yılına kadar sadece koku ile ilgili bağlantılarının olduğu sanılırken, (Arıncı ve Elhan, 2001)

daha sonra koku yollarının gelişmediği bazı insanlarda da hipokampusun normal bir düzeyde geliştiği gözlemlendi. Anatomistler bu konu üzerinde yaptıkları çalışmalar ile, hipokampus gelişiminin olfaktor bulbusun gelişimine paralel olmadığını göstermişlerdir (Brodal, 1981; Carpenter, 1983).

Görme, işitme, koku, dokunma, iç organ duyuları gibi hemen her türlü duyuşsal uyarı, küçük bir alan dahi olsa, hipokampusu aktive etmektedir. Aktive olan hipokampus da ventral talamus, hipotalamus ve limbik sistemin diğer bölgelerine sinyaller göndermektedir. Böylece, hareketlerin davranış biçimine dönüşmesinden önce, limbik sistemi etkileyen hipokampus, davranışların şekillenmesine yardımcı olur (Brodal, 1981). Bu nedenden dolayı hipokampusun, gelen duyuşsal sinyalleri içerisinden geçiren bir kanal rolü oynadığı düşünülebilir (O'keefe ve Coway, 1978; Guyton, 1987).

Hipokampusun hafıza, özellikle de kısa süreli hafıza ile ilgili olduğu bilinmektedir (Green, 1960). Kısa süreli hafıza, yeni bilgilerin depolanma kapasitesini ifade etmektedir. Bu nedenle mekanizma ne olursa olsun verbal veya sembolik uzun süreli anıların kalıcı olması için sağ ve sol hipokampusun olması gereklidir (Brodal, 1981; Carpenter ve Sutin, 1983; Guyton, 1987). Ayrıca, sağ hipokampus görsel, sol hipokampus ise sözel hafıza ile ilgili fonksiyonlarda daha fazla aktivite göstermektedir. Bu bölgelerdeki lezyonlarda da ilgili hafızalarda kayıplar meydana geldiği bildirilmektedir (Taner, 1999; Kandel ve diğ., 2000).

Hipokampusun endokrin fonksiyonlarda da etkili olduğu bildirilmektedir. Örneğin; hipokampusun ön bölgesinde östradiolü konsantre eden nöronlar olduğu saptanmıştır. Sıçan deneylerinde ise; hipokampusun uyarılması sonucu ovulasyonda inhibisyonun meydana geldiği gösterilmiştir. Ayrıca forniksin kesilmesi ile de adrenokortikotropik (ACTH) hormon salınımında bozukluklar olduğu saptanmıştır (Aktan, 1997).

Hipokampusun şu fonksiyonlara da katıldığı kabul edilmektedir: Heyecan uyandıran reaksiyonlar veya heyecanın kontrolü, iç organlara ait aktivitenin düzenlenmesi ve serebral korteks üzerine olan retiküler aktivitenin ayarlanması (Green ve Shimamota, 1953).

2.3. Tiazolidinedionlar

Tiazolidinedionlar (TZD) tip 2 diyabetin tedavisinde kullanılan ve son yıllarda üzerinde en fazla araştırma yapılan insülin duyarlılaştırıcı ajanlardır. TZD'lar, insülin direncini azaltarak glisemik kontrolü sağlarlar. Bu bileşikler ortak olarak bir tiyazolidin-2-4-dion yapısına sahiptirler ve her biri farklı bir yan zincire sahiptir (Hard ve Jabbour, 2004). TZD'lar lipofilik olduklarından çekirdeğe girebilirler ve peroksizom proliferatör tarafından aktive edilen reseptör-gamma (PPAR- γ)'ya bağlanarak, aktivasyonunu sağlarlar. (Day, 1999).

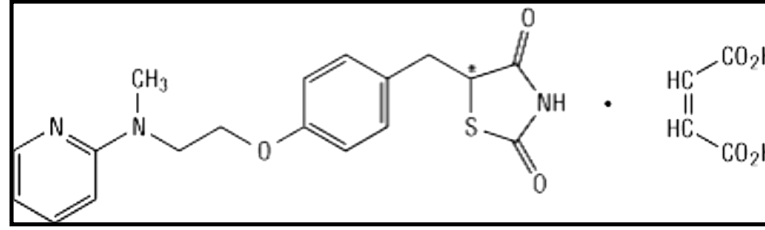
TZD'lar sadece yağ dokusu, iskelet kası ve karaciğerde insülin direncini düzeltmekle kalmayıp ateroskleroz ve inflamasyon gibi altta yatan patofizyolojik mekanizmaların iyileştirilmesinde de rol oynarlar (Bruemmer ve Ronald, 2003; Alarcon ve diğ., 2004; Calkin ve diğ., 2005).

Troglitazon, 1997'de kullanıma giren tiazolidinedion grubunun ilk ajanıdır. Fakat 2000 yılında, troglitazon hepatotoksik etkisinden dolayı piyasadan geri çekilmiştir. Tiazolidinedion ailesinin kullanımda olan iki üyesi vardır. Bunlar rosiglitazon ve pioglitazondur. FDA'nın 2010 yılında yayınladığı raporda rosiglitazonun kalp krizi ve kardiyovasküler hastalıklara bağlı olarak ölüm riskini arttırdığı belirtilmiştir. Bu nedenle Türkiye'de rosiglitazon içeren ilaçlar piyasadan çekilmiştir. Amerika'da ise bazı kısıtlamalarla birlikte klinik kullanımına devam edilmektedir (Sawicki ve Glod, 2004).

2.3.1. Rosiglitazon

Rosiglitazon, peroksizom proliferatör tarafından aktive edilen reseptör-gamma (PPAR- γ) agonisti olan tiazolidinedion ailesinin bir üyesidir. Kapalı formülü $C_{18}H_{19}N_3O_3S \cdot C_4H_4O_4$ şeklindedir ve açık adı ($\pm$)-5-[[4-[2-(metil-2-piridinilamino) etoksi]fenil] metil]-2, 4-tiazolidindion (Z)-2-butendioat (1:1) olarak okunur. Molekül ağırlığı 473.52 (357.44 serbest baz) g/mol'dür (Şekil 2.11).

Rosiglitazone maleat beyaz-kirli beyaz renkte toz halinde olup, erime noktası 122-123°C, pKa değerleri 6.8 ve 6.1'dir (Physicians' Desk Reference 2005).



Şekil 2.11. Rosiglitazon'un açık formülü (URL-1).

2.3.1.1. Rosiglitazonun etki mekanizması

Peroksizom proliferatör tarafından aktive edilen reseptör (PPAR) nükleer reseptör süper ailesinin bir üyesidir. Şimdiye kadar, farklı (ayrı) genler tarafından kodlanan (dizgileşmiş) üç izoform tanımlanmıştır; PPAR γ , PPAR α ve PPAR δ . Çeşitli yağ asitleri ve doğal ekosanoidler PPAR- γ için endojen ligand görevi görürler. Fibratlar ve thiazolidinedionlar ise lipid ve glukoz metabolizmasını etkileyen güçlü sentetik ligantlardır (Berger, 2002). PPAR reseptörüne ligant bağlandıktan sonra, reseptör spesifik bir konformasyonel değişime uğrar, bu değişim bir veya daha fazla koaktivatör protein alınmasına olanak sağlar. PPAR aktive edildikten sonra diğer bir nükleer reseptör olan 9-cis-retinoik asit reseptörüyle (RXR) heterodimer oluşturur. Bu heterodimer PPAR/RXR (karşılık gelen element PPRE) DNA'nın spesifik bölümlerine bağlanır (Chawla ve diğ., 2001). Bunun yanı sıra, PPAR reseptörleri DNA'ya bağlanmada diğer transkripsiyon faktörleriyle de (interlökinler IL-2, IL-6, tümör nekroz faktör TNF- α , metalloproteaz) etkileşebilir ve bazı sitokinlerin gen ekspresyonunu engelleyerek anti-inflamatuvar özellik gösterir (Chinetti ve diğ., 2000). PPAR- γ adipoz dokularda yoğun bir şekilde eksprese edilmesinin yanında vasküler endotel, monositler, makrofajlar, pankreatik β -hücrelerinde, aterosklerotik lezyonlarda da bulunmaktadır (Chinetti ve diğ., 2000; Marx ve diğ., 2004). Daha çok PPAR- α 'nın eksprese edildiği karaciğer, kalp ve iskelet kası gibi dokularda ekspresyonları azdır. Buna göre adipoz doku diğer bölgelere göre insülin duyarlılığını arttıran ve plazma serbest yağ asiti konsantrasyonunu azaltan thiazolidinedionlar için asıl hedef bölgesidir (Schoonjans ve Auwerx, 2001; Özser, 2012).

Artmış yağ asitlerinin kastaki glukoz metabolizmasını azalttığı ve serbest yağ asitlerinin damar duvarında yer alan makrofaj lipoprotein lipaz üzerinde düzenleyici

etkileri olduğu bilinmektedir. Bunun sonucu olarak plazma yağ asitlerinde azalmanın tiazolidinedionların olumlu etkilerine katkıda bulunduğu söylenebilir. Tiazolidinedionların insülin direncini azaltan adinopektin sekresyonunu arttırdığı yapılan *in vi vo* ve *in vitro* çalışmalarla gösterilmiştir. Tiazolidinedion obez ve insülin direnci olan hastalarda artmış olan TNF- α gibi adiposit kaynaklı sitokinleri azaltarak insülin direncini düzeltir. Tiazolidinedionların etkisi tek bir doku veya sistem üzerinde değil, farklı dokular ve bunların birbirleri üzerindeki etkileriyle ortaya çıkmaktadır (Howard ve diğ., 1996; Fukuzawa ve diğ., 1999; Moore ve diğ., 2001; Özser, 2012).

2.4. Beyindeki PPAR'lar

Peroksizom proliferatör ile aktive olan reseptörlerin (PPAR'lar) fizyolojik ve patofizyolojik süreçlerdeki biyolojisi, öncelikle periferik organ ve dokularda çalışılmıştır. Son yıllarda, PPAR'ların çeşitli merkezi sinir sistemi (MSS) hastalıklarının patogeneğinde önemli bir rol oynadığı belirlenmiştir. PPAR'ların aktivasyonunun ve özellikle de PPAR γ izoformunun, periferik makrofajlarda ve insan otoimmün hastalık modellerinde enflamasyonu bastırdığına dair sonuçlar bulunmuştur. Bu bulgular, enflamatuvar bileşeni bir olan birçok MSS bozukluklarında önemli olan bu etkileyici aktivitelerin deneysel olarak değerlendirilmesi için araştırma yapılmasına teşvik etmiştir (Heneka ve Landreth, 2007).

Tüm PPAR izoformlarının aktivasyonunun, özellikle de PPAR γ 'nin, Multipl Skleroz'un murin *in vitro* ve *in vivo* modellerinde koruyucu olduğu tespit edilmiştir. Bu bulguların insan hücrelerinde de doğrulanması, Multipl Skleroz hastalarında PPAR γ aktivasyonunu değerlendiren klinik çalışmaların başlatılmasına yol açmıştır. Keza, Alzheimer hastalığının nörodejenerasyona ve β -amiloidpeptidlerin ekstraselüler birikimine karşılık ortaya çıkan belirgin bir enflamatuvar bileşeni vardır. Non-steroid anti-enflamatuvar ilaçların (NSAID), Alzheimer hastalığı geliştirme riskini azalttığı gerçeği, (aynı zamanda PPAR γ 'ye bağlandığı ve onu aktive ettiği gerçeği), Alzheimer hastalığında Non-steroid anti-enflamatuvar ilaçların (NSAID) koruma boyutunun PPAR γ tarafından aracılık edileceğine dair hipotezlere yol açmıştır. Alzheimer hastalığı ile ilişkili transgenik hücrel hayvan modelleri

kullanılarak gerçekleştirilen in vitro ve in vivo çalışmalardan gelen birkaç kanıt, bu hipotezi destekler niteliktedir (Heneka ve Landreth, 2007).

PPAR agonistlerinin, anti-amiloidojenik, antienflamatuar ve insülin duyarlılaştırıcı etkileri ortaya çıkartma yeteneği, gözlemlenen etkileri açıklayabilmektedir. PPAR agonistlerini kullanan bir dizi klinik çalışmada ümit verici sonuçlar elde edilmiştir ve etkileşimin tam mekanizmasını tanımlama amacını güden daha ileri çalışmalar da hazırlık aşamasındadır. Parkinson ve Amiyotrofik lateral skleroz gibi diğer nörodejeneratif hastalıkların hayvan modelleri (ikisi de önemli derecede MSS enflamasyonu ile bağlantılıdır) olumlu sonuçlar vermektedir. PPAR'ların beyin gelişimi, idamesi ve fonksiyonundaki fizyolojik rolü hakkında çok az şey bilinmektedir. Transgenik fare modellerindeki lezyonlar ancak, PPAR'ların MSS gelişimi ve işlevi için önemli roller oynayabileceğine dair kanıtlar sunmaktadır (Heneka ve Landreth, 2007).

2.4.1. PPAR'ların beyindeki fizyolojik fonksiyonu

Peroksizom proliferatör ile aktive olan reseptörler (PPAR'lar), nükleer hormon reseptörleri (NHR) olarak adlandırılmış, ligand ile uyarılabilir transkripsiyon faktörleridir. Steroid, tiroid ve retinoid reseptörlerini içeren NHR üst familyasının diğer üyeleri gibi, PPAR'ların bir ligand bağlayabilme yeteneklerinin metazoan evrimi sırasında edinildiği düşünülmektedir. Çünkü bu proteinler tüm metazoan filumlar içinde mevcuttur. Üç farklı PPAR izotipi (PPAR α , PPAR δ 'da denilen PPAR β ve PPAR γ) değişik türlerde tanımlanmıştır ve bunlar yapısal olarak homologdurlar. Kemirgenlerde, PPAR'lar, doku farklılaşmasının bir çok safhasında ve adipoz doku, beyin, plasenta ve deri farklılaşması gibi farklı bölgelerde kemirgen gelişiminde yer almaktadırlar (Desvergne ve Wahli, 1999). Bu nedenle, PPAR α , β / δ ve γ 'nin, geniş ligand bağlama özgünlüğüne sahip ortak bir PPAR geninden geliştirildiği düşünülmektedir (Escriva ve diğ., 2000).

PPAR'lar çoklu mekanizmalar aracılığıyla gen ekspresyonunu düzenlemekte ve retinoid X reseptörlü (RXRs) koşullu heterodimerler olarak fonksiyon görmektedirler. Üst familyanın diğer üyeleri gibi, PPAR'lar, dört bölgeden oluşmaktadırlar. DNA bağlayıcı kısım son derece korunmuştur ve çinko kısmı NHR üst familyasının tüm üyelerinin ortak bir özelliğidir. DNA bağlama bölgesi, C-terminal ligand bağlama bölgesine, eklem bölgesiyle bağlıdır. E/F alanı, PPAR'ların RXRs ve reseptörlerin ligand-bağımlı transaktivasyon fonksiyonunun

dimerizasyonundan sorumluyken, N-terminali, reseptör aktivitesinin ligand-bağımsız düzenlemesinden sorumludur (Kersten ve Wahli, 2000).

PPAR'lar, hedef genlerinin promotorlarında mevcut olan peroksizom-proliferatör yanıt elemanları (PPREs) olarak adlandırılan korunmuş DNA dizilerine bağlanarak gen ekspresyonunu uyarmaktadırlar. Ligandların yokluğunda, bu heterodimerler fiziksel olarak, gen transkripsiyonunu baskılayan korepresör kompleksleri ile ilişkilidirler (Desvergne ve Wahli, 1999). Ancak, ligandın reseptöre bağlanması ile Ncor içeren koresepsör kompleksleri reddedilmekte ve koaktivatör kompleksleri ile değiştirilmektedir. Bu koaktivatörler, daha sonra bazal transkripsiyonel aparatlara bağlanarak bu genlerin transkripsiyonunu aktive etmektedirler.

PPAR'lar ayrıca pro-enflamatuvar gen ekspresyonunu inhibe etmekte ve bunu DNA bağlanma yeteneklerine bağımlı olmayan mekanizmalar aracılığıyla gerçekleştirmektedirler. Transrepresif aktiviteleri ve NF κ B-regüle genler için nasıl seçici olduklarına dair bir dizi mekanizma önerilmiş ve bunlardan hiç biri tamamıyla tatmin edici olmamıştır (Jones ve Daynes, 2002). NF κ B-regüle enflamatuvar genler, represe bir durumda N-Cor içeren korepresör kompleksler vasıtasıyla idame ettirmektedirler. Pro-enflamatuvar uyarılmaya maruz kalma sonucunda, bu kompleks ayrıştırılmakta ve gen ekspresyonu başlatılmaktadır. PPAR γ agonistleri mevcut olduğunda, agonistler PPAR γ 'ya bağlanmakta ve bu ligand-reseptör kompleksi daha sonra parça eklenmesiyle modifiye edilmektedir. Modifiye edilen bu reseptör daha sonra NF κ B-regüle genlerin promotorlarında yerleşik olan NCor komplekslerine bağlanmakta ve korepresör kompleksin çıkarılmasını önleyerek, enflamatuvar gen ekspresyonunu engellemektedir (Ogawa ve diğ., 2005; Ghisletti ve diğ., 2007).

PPAR'lar, esas olarak lipid sensörler olarak hareket etmektedirler. Diyet lipid alımına karşılık olarak tüm vücut metabolizmasını düzenlemekte ve daha sonraki metabolizma ve depolamayı yönetmektedirler (Michalik ve diğ., 2006).

Familyanın prototipik üyesi olan PPAR α 'ın, başlangıçta peroksizom proliferatörleri tarafından indüklendiği ve üç ilişkili reseptörün alt familyasını ifade ettiği bildirilmekteydi. Bu reseptörlerin doğal ligandları, diyet lipidleri ve bunların metabolitleridir. Ayrı reseptörlerle etkileşen spesifik ligandların belirlenmesi zor

olmaktadır çünkü onların aktiviteleri nispeten daha düşüktür ve reseptörlerin geniş ligand özgüllükleri vardır.

PPAR α , yağ asitlerini ve kolesterolü yıkarak ve de glukoneogeneze yol açarak, serum trigliserid seviyelerinin düşmesini uyarabilme yeteneği sayesinde enerji homeostazını düzenlemektedir. Bu reseptör, yağ asitlerini bağlayarak ve onların sonraki metabolizmalarını başlatarak bir lipid sensörü gibi davranmaktadır. PPAR γ , yağ asitleri, eikozanoidler ve diğer doğal lipid ligandlar da dahil olmak üzere birçok lipidleri bağlamaktadır. Baskınlık özelliği, adiposit farklılaşmasını uyarmak ve lipid metabolitlerinin bu doku içinde depolanmasını yönlendirmektir. PPAR γ , lipid ve karbonhidrat metabolizmasının kritik metabolik kesişiminde faaliyet göstermektedir. PPAR γ aktivasyonu, serum glikoz seviyelerindeki azalma ile bağlantılıdır. İkincil bir etkisi ise; endokrin faktörleri düzenlemektedir. Bu ikinci aktivitesi, tip II diyabet tedavisi için belirli PPAR γ agonistlerinin gelişimine yol açmıştır (Willson ve diğ., 2001). PPAR β / δ , VLDL türetilmiş yağ asitleri bağlamakta ve prostaglandinA₁ (Barish, 2006), dahil olmak üzere eikozanoidlere tepki vermekte ve özellikle kasta, yağ asit oksidasyonunda yer almaktadır.

PPAR'ların kendi spesifik ligandlarına bağlanması, korepresör salınımına ve koaktivatör alımına imkan veren konformasyonel değişikliklere yol açmaktadır. Tüm PPAR'lar, ortak bir nükleer reseptöre atfedilebilseler de, her bir PPAR izotipinin ligand bağlanmasına dair olarak kendine has özellikleri vardır. Tip II diyabet tedavisi için yaygın bir biçimde öngörülen sentetik tiazolidinedionlar (TZDs), selektif PPAR γ ligandlarıdır. Doğal olarak oluşan PPAR γ ligandları, eikozanoidler ve siklopentanon prostaglandin 15d-PGJ₂ içermektedirler. En iyi karakterize edilen PPAR γ agonistleri, Amerikan Gıda ve İlaç Birliği (FDA) tarafından tip II diyabet tedavisi için onaylanmış olan, pioglitazon (Actos) ve rosiglitazon (Avandia) gibi TZD'lerdir. GW78456 gibi, non-TZD bazlı bir takım PPAR γ agonistleri de vardır. PPAR α ligandları, hipertrigliseridemi tedavisi için yaygın olarak kullanılan fibratları ve sentetik agonistler, WY14 643 ve GW7647 içermektedir. PPAR β / γ agonistleri ise, prostaksilin PGI₂ ve GW0742, GW501516, GW7842 gibi sentetik ajanları içermektedir. Tüm bu üç PPAR izotipleri de farklı afiniteleri ve verimlilikleri ile çoklu doymamış yağ asitleri ile aktive edilebilmektedirler (Krey ve diğ., 1997). Bazı

doğal ve sentetik ligandların afinitesine dikkat çeken bir çalışma da Bernado ve Minghetti, (2006) tarafından özetlenmiştir.

PPAR α ve γ transkripti, sıçan ve farelerin fetal gelişimi sırasında geç olarak ortaya çıkmaktadır (gebeliğin 13.5'uncu gününde). Bu durum onların yetişkin dağılımlarına benzer ekspresyonda olmaktadır. PPAR α , karaciğer, böbrek, bağırsak, kalp, iskelet kası, adrenal bezi (böbrek üstü bez) ve pankreasta bulunmaktadır. PPAR γ ekspresyonu ise kahverengi adipoz doku (gebeliğin 18.5'uncu günü) ve MSS (gebeliğin 13.5 ile 15.5'inci günü) ile sınırlıdır. Diğer iki izotip ile karşılaştırıldığında, PPAR β / δ fetal gelişim sırasında her yerde ve daha erken eksprese edilmektedir (Keller ve diğ., 2000). Erişkin kemirgen organlarında, PPAR α 'nın dağılımı ekspresyonunun fetal yapısına benzemektedir (Escher ve diğ., 2001).

İnsan gelişimi sırasında, PPAR'ların ekspresyonu ile ilgili çok az şey bilinmektedir (Auboeuf ve diğ., 1997; Mukherjee ve diğ., 1997; Palmer ve diğ., 1998). Bu veriler, insan PPAR α 'sının en çok yağ asitlerini katabolize eden yetişkin karaciğeri, kalp, böbrek, kalın bağırsak ve iskelet kası gibi dokularda eksprese olduğunu göstermektedir. PPAR β / δ mRNA, sindirim borusu ve plesentada çok yüksek ekspresyonlarda bulunmaktadır.

PPAR γ , beyaz adipoz dokuda bolca eksprese edilmektedir ancak iskelet kası, kalp ve karaciğerde daha düşük seviyelerdedir. Şaşırtıcı bir şekilde kemirgenlerin aksine, PPAR γ 'nın insan aterom'undaki makrofajlarda mevcut olduğu gösterilmesine rağmen, insan PPAR γ 'ların lenfoid dokularda mevcut olmadığı gösterilmiştir.

Üç PPAR izotipi de, geç sıçan embriyogenezinde sinir sisteminde bir arada eksprese edilmektedir. PPAR β / δ ise en yaygın izotiptir. Üç PPAR izotipinin ekspresyonu, farelerde gebeliğin (gestasyon) 13.5 ile 18.5'uncu günleri arasında en üst düzeye çıkmıştır. Diğer taraftan, PPAR β / δ , beyinde son derece eksprese olmakta, PPAR α ve γ ekspresyonu ise beyinde doğum sonrasında azalmaktadır (Braissant ve diğ., 1996). Retinada, üç reseptör de eksprese edilmektedir (Braissant ve diğ., 1996; Braissant ve Wahli, 1998; Cullingford ve diğ., 1998). Her ne kadar bu yapıdaki bir ekspresyon PPAR'ların santral sinir sisteminin oluşumu sırasında bir rol oynayabildiğini önermekte ise de, onların bu dokudaki fonksiyonları hala tam olarak anlaşılamamıştır. Hem in vitro hem de in vivo gözlemler, PPAR β / δ 'nın beyinde yaygın bir izoform olduğunu ve bütün hücre tiplerinde bulunduğunu göstermektedir.

Oysaki PPAR α çoğunlukla astrositlerde oldukça düşük seviyelerde ifade edilmektedir (Basu-Modak ve diğ., 1999).

PPAR γ da dahil olmak üzere tüm PPAR'lar, yetişkin ve gelişmekte olan beyinde ve omurilikte tanımlanmıştır. Hatta nöronlardaki bu PPAR aktivitesinin direkt olarak nöron hücre canlılığını ve farklılaşmasını etkileyebileceği öne sürülmüştür (Heneka ve diğ., 2000; t'Veld ve diğ., 2001; Park ve diğ., 2004; Smith ve diğ., 2004; Cimini ve diğ., 2005). PPAR β / δ , birçok beyin bölgesinin nöronlarında bulunmaktayken, PPAR α ve γ daha kısıtlı beyin alanlarına lokalize edilmiştir (Woods ve diğ., 2003; Moreno ve diğ., 2004). PPAR'ların lokalizasyonu, nöral hücre kültürlerinde incelenmektedir. PPAR β / δ , olgunlaşmamış oligodendrositlerde eksprese edilmektedir ki; burada bunun aktivasyonu farklılaşmayı, miyelin olgunlaşmasını ve dönüşümü desteklemektedir (Saluja ve diğ., 2001; Cimini ve diğ., 2003). γ izotipi mikrogli'a'da baskın izoformdur. Beyin alanına ve hayvan yaşına bağlı olarak farklı derecelerde de olsa, astrositler bu üç PPAR izotiplerine de sahiptirler (Cullingford ve diğ., 1998; Cristiano ve diğ., 2001). PPAR'ların MSS'deki (merkezi sinir sistemi) rolü çoğunlukla lipid metabolizması ile ilişkilidir. Ancak bu reseptörler nöral hücre farklılaşması ve ölümünün yanı sıra enflamasyon ve nörodejenerasyonla da ilişkilidirler. PPAR γ 'ların beyindeki ekspresyonu, enflamasyon ve nörodejenerasyon ile ilişkili olarak kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır (Heneka ve diğ., 2000). PPAR α 'nın asetilkolin metabolizmasına (Farioli-Vecchiol ve diğ., 2001) karıştığı ve uyarıcı amino asit nörotransmisyonu ve oksidatif stres savunması ile ilişkili olduğu ileri sürülmektedir.

2.5. Stereoloji

Stereoloji, üç boyutlu örneklerin (biyolojik yapılar, metalurjik örnekler vb.) iki boyutlu kesitlerinden elde edilen verilere dayanarak, onların gerçekteki üç boyutlu özellikleri ile ilgili bilgilerin elde edilmesini ve yorumlar yapılmasını sağlayan bilim dalının adıdır (Ünal ve diğ., 2002a).

Biyolojik yapılarla ilgili çalışmalarda, sayısal verilerin önemi büyüktür. Özellikle hücre, çekirdek, mitokondri vs. gibi doku bileşenlerinin sayısı; karşılaştırmalı çalışmalar, toksikoloji ve gelişim biyolojisi başta olmak üzere, yapısal nicelik ile fonksiyon arasındaki ilişkilerin incelendiği bilim dallarında önemli veriler sağlar (Gundersen, 1986). Bir organ veya yapıdaki belli bazı partiküllerin sayılarını

belirleyebilmek amacıyla yıllar boyunca değişik metotlar kullanılmıştır. Modern stereolojik metotların ortaya çıkmasına kadar olan süreç içerisinde yapılan çalışmalarda, yapılardan elde edilmiş kesit veya dilimler üzerinde ilgilenilen taneciklerin (hücre, çekirdek vb.) izdüşümleri sayılmış ve bir takım düzeltme faktörlerinin de kullanılmasıyla, ilgilenilen taneciğin gerçek sayısının bulunmasına çalışılmıştır (Abercrombie, 1946; Weibel, 1969; Haug, 1986). Düzeltme faktörleri terimi, çok önceleri fark edilmiş olan bir yanlışlığı düzeltmek amacıyla ortaya atılmış olan bir dizi düşünceyi ifade etmektedir. Stereolojik prensiplerin jeoloji disiplinde başlayıp biyolojik bilimler üzerinden süren yolculuğu sayesinde, bu gün tarafsız ve etkin bir dizi metotla, gerçek tanecik sayısına ulaşılabilir (Haug, 1986).

2.5.1. Stereolojide tarafsızlık ve etkinlik

Stereolojik çalışmaların esasını, tarafsız örnekleme planları oluşturmaktadır. Herhangi bir yapı üzerinde gerçekleştirilen herhangi bir niceliksel çalışmayı istatistiksel anlamda güvenli kılan en önemli öge, bileşenler üzerinde yapılan örnekleme ve ölçümlerin **tarafsız** (unbiased; ölçümler sonucu gerçek değerden sistematik sapma göstermeyecek şekilde) olmasıdır. Dolayısıyla tüm stereolojik yöntemler, istatistiksel bir yapıya ve buna bağlı olarak da bir takım kurallara bağlıdır (Gundersen ve Jensen, 1987; West, 1999; Gundersen ve diğ., 1999).

Stereolojideki önemli bir diğer prensip de **etkinlik** prensibidir. Bunun anlamı, sadece gerektiği kadar birey ve örnek kullanarak, yeterli doğrulukta sonuçlar elde etmeyi sağlamaktır. Herhangi bir sayısal niceliği kesin bir biçimde tesbit etmenin en iyi yolu, populasyonun tümünü örnek olarak alıp, niceliği tümüyle ölçmektir (örneğin bir organda bulunan hücrelerin sayısını belirlemek için organın içerdiği tüm hücreleri teker teker saymak gibi). Fakat biyolojik yapılar için bu tip bir yaklaşımın uygulanması genellikle olası değildir. Mümkün olsa da, sonuçların elde edilmesi çok fazla zaman alacağından, sonuçların pratik bir değeri kalmayacaktır. Bu nedenle, hız ve doğruluğu optimum düzeyde birleştirebilen bir ölçüm ve karşılaştırma yöntemine ihtiyaç duyulmuştur. Modern stereolojinin de bize sağladığı tam olarak budur (Gundersen ve Jensen, 1987; West, 1999; Gundersen ve diğ., 1999).

2.5.2. Stereolojide ön çalışma

Stereolojik çalışmalarda asıl çalışmaya başlamadan önce bir ön çalışma yapılarak çalışmanın tamamında kullanılacak bir örnek plan belirlenmektedir. Ön çalışmada istenen hata miktarına göre yaklaşık olarak ne sıklıkta bir örnekleme yapılması gerektiği saptandıktan sonra bu örnekleme çalışmadaki diğer tüm bireyler için de aynı şekilde uygulanmaktadır (Canan,1998). Belirlenen bu çalışma planı daha sonra aynı tür bireylerde ve aynı organ veya doku üzerinde yapılacak diğer tüm stereolojik çalışmalar için de kullanılmaktadır. Başka bir ifadeyle eğer yapılması düşünülen çalışmaya benzer bir çalışma planı daha önce kaynaklarda mevcut ise yeniden bir örnekleme planı yapmak gerekmez. Ancak stereolojik çalışma yapan araştırmacıların bir kısmı kendi çalışmaları için her zaman bir örnekleme planı yapmayı tercih etmektedirler (Canan,1998).

Ön çalışmanın mantığı deneme-yanılma yöntemine dayanmaktadır. Bir kaç hayvan üzerinde yapılacak değişik sıklıktaki örneklemeler istatistiksel analizlere tabi tutularak, en uygun örnekleme şekli belirlenmektedir ve bu örnekleme şekli daha sonra tüm çalışmaya aynen uygulanmaktadır.

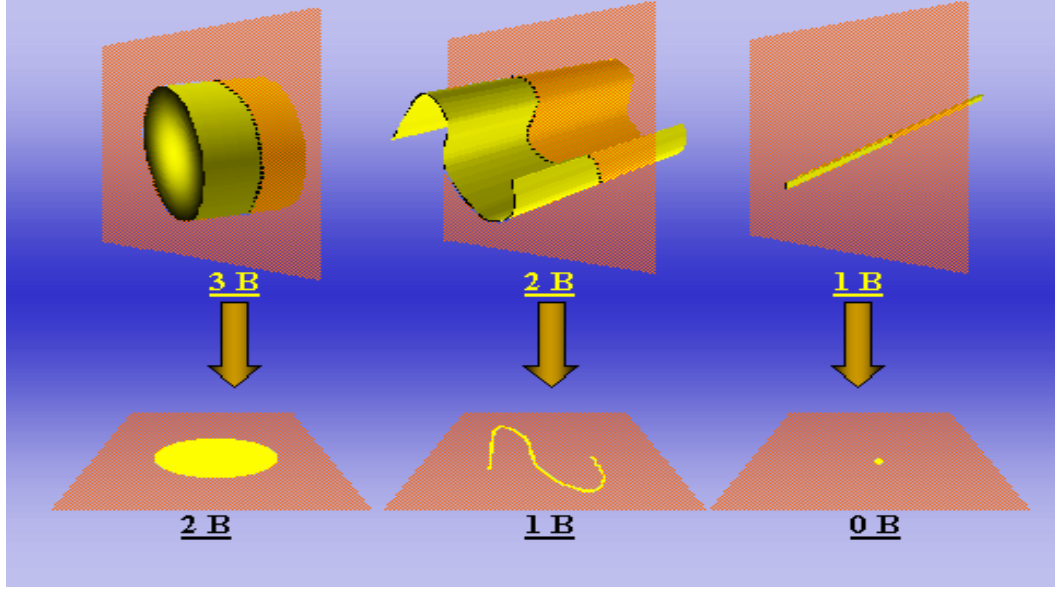
Yapılacak istatistiksel analizlerin başında, çalışmanın içerdiği toplam hata miktarının hesaplanması gelmektedir. Örnekleme ile çalışan bir ölçüm yöntemi gerçekte belli bir miktar hata payına da sahip olmaktadır. Hata miktarı, yapılan örnekleme büyüklüğüne göre değişmektedir. Çok fazla sayıda örnek alınan sık bir örnekleme üzerinden yapılan hesaplamalar daha düşük bir hata miktarına sahip olurken, daha seyrek ve az örnek alınarak yapılan çalışmalarda hata miktarı daha fazla olmaktadır. Bir çalışmadaki toplam hata miktarı, hata katsayısı (Coefficient of Error) ile belirlenir. Genellikle, 0.05 değerinin altında bir hata katsayısı, stereolojik bir çalışmanın güvenilirliği için yeterli kabul edilmektedir (Gundersen ve Jensen, 1987; West, 1999; Gundersen ve diğ., 1999).

Hata katsayısını 0.05 değerinin altında ya da bu değerde tutabilmek için genellikle grupta en az 5 hayvanın olması gerekmektedir (Hayvan sayısı n ise, biyolojik varyasyona bağlı hata katsayısı $1/2 n$ 'dir) (Gundersen ve Jensen, 1987). Çalışılan birey sayısını artırmak gerçek değere daha fazla yaklaşmayı sağlayacaktır. Fakat çok fazla sayıda bireyde çalışmak, hem stereolojik metodların "etkinlik" prensibine uymadığı için, hem de deney hayvanlarının fazla miktarda harcanmasını gerektirdiğinden çoğu zaman tercih edilmemektedir.

Bu durumu, istatistiksel bir bakış açısından düşünmek gerekir. Hiç bir zaman unutulmamalıdır ki; yapılan çalışmalarda hesaplanan değerlerin birbirlerinden olan farkı anlamında düşünülebilecek hata katsayısı, biyolojik çalışmalar için hiç bir zaman "sıfır"a indirilememektedir. Bunun nedeni ise; bu değere en büyük katkısı olan unsurun, çalışılan organların alındığı canlılar arasında bulunan "biyolojik değişkenlik (varyasyon)" olmasıdır. Yani, yapılan çalışmalarda, tek bir birey için örnekleme sayısı ne kadar arttırılırsa arttırılsın, biyolojik varyasyondan, yani canlılar arasındaki sayısal ve yapısal farklılıklardan kaynaklanan hesaplama hatasını belli bir sabit değerin altına indirmek olanaksız olmaktadır (Gundersen ve Jensen, 1987). Dahası, biyolojik varyasyonun hata payına katkısı, çalışılan organizmaya göre de değişmektedir. Sözgelimi, sıçanlarda yapılan bir çalışmada, istenilen hata katsayısı, 5 adet hayvanın çalışmaya dahil edilmesi ile sağlanabilirken, aynı hata katsayısı değerini insan örneklerinden elde edebilmek için ~25 örnek üzerinde çalışmak gerekmektedir (West, 1993). Dolayısıyla, yapılan her çalışma belli bir hata katsayısı sınırı içinde gerçekleştirilecek ve bu sınırlar içinde elde edilen veriler, araştırmacı için yeterli güvenlikte olacaktır.

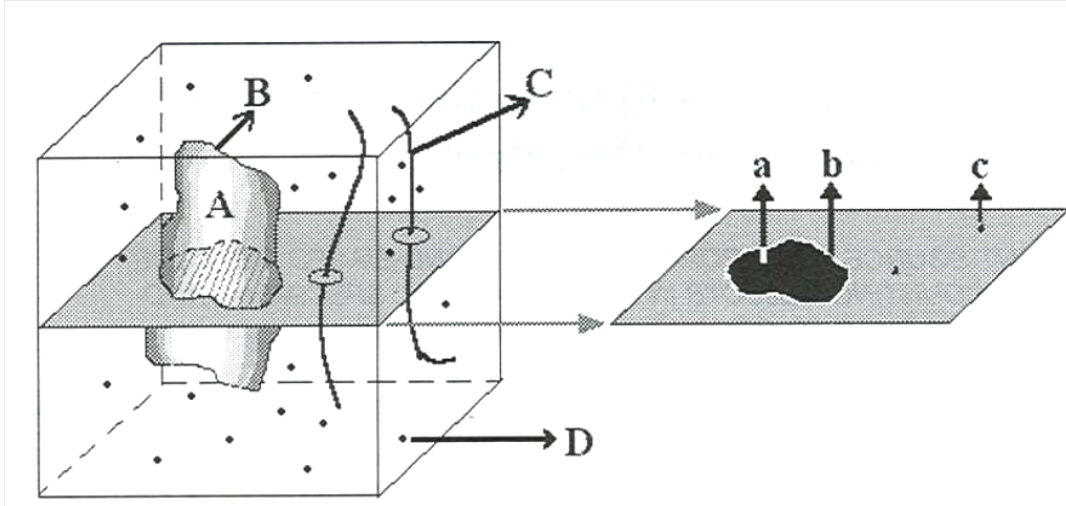
2.5.3. Kesitlerde boyut azalması

Biyolojik yapıların incelenmesi sırasında iki boyutlu kesitlerin görüntülerinin üzerinde doğrudan inceleme ve yorum yapmanın bir takım sakıncaları vardır. Bu sakıncalardan bir tanesi *boyut azalması* prensibinin yeterince anlaşılamamış olması, diğeri ise araştırmacının incelenecek biyolojik yapıların iki boyutlu kesit düzlemlerinde ortaya çıkan izdüşümlerin arasında matematiksel bir ilişki kurma çabasıyla kaynaklanmaktadır (Şekil 2.12) (Ünal ve diğ., 2002a).



Şekil 2.12. İki boyutlu kesitlerle yapılan örneklemelerde ortaya çıkan boyut azalması (Canan, 1998)

Kesit alma işleminin ve sonuçta elde edilen "kesit" kavramının daha yakından irdelenmesi, boyut kaybı olayının önemini ortaya koymaktadır. Şekil 2.13'de, üç boyutlu bir hacim içerisinde alınan iki boyutlu bir kesit şematize edilmiştir. Burada, üç boyutlu katı bir eleman olan (A) parçacığı, iki boyutlu bir düzlemle (kesit) kesildiğinde, ortaya iki boyutlu bir izdüşümü çıkmaktadır (a). Benzer şekilde, iki boyutlu bir yüzey (sözelimi bir zar) (B), iki boyutlu bir kesit düzleminde tek boyutlu bir çizgi olarak (b); tek boyutlu bir çizgi (C), sıfır boyutlu bir nokta olarak (c) görülürken, sıfır boyutlu nokta (D) ise iki boyutlu kesitte görülemeyecektir. Yani herhangi bir yapının iki boyutlu bir kesit düzlemi ile kesilmesi sonucunda ortaya çıkan izdüşüm, esas yapının sahip olduğu boyut sayısından bir eksik boyuta sahip olacaktır (Weibel, 1969; Ünal ve diğ., 2002a).

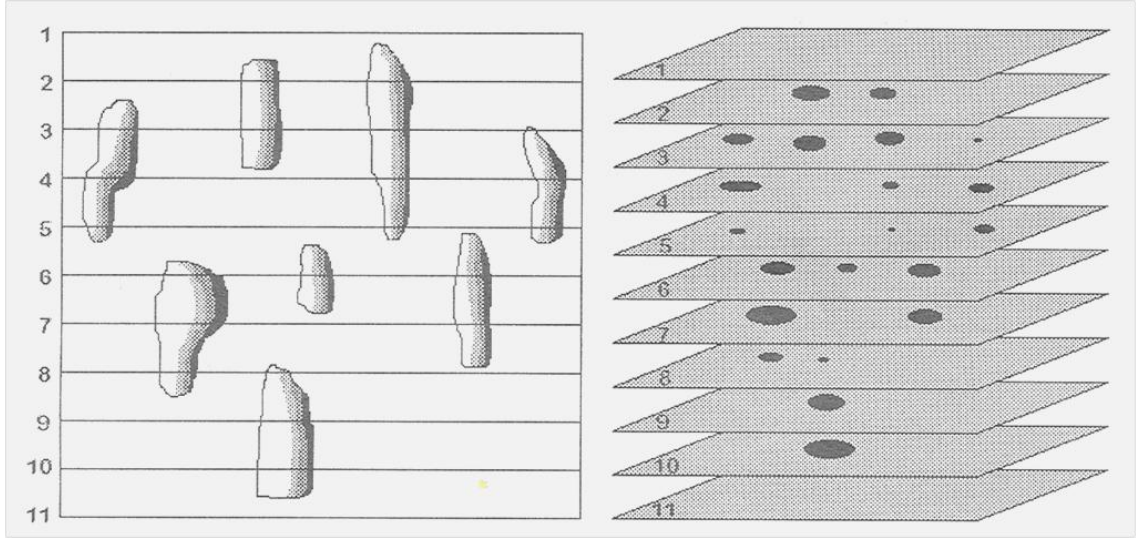


Şekil 2.13. Biyolojik kesitlerde boyut azalması. Üç boyutlu bir yapıdan geçen iki boyutlu bir düzlemde (sağ kısım) biyolojik materyalin görünüşü (Ünal ve diğ., 2002a).

İki boyutlu kesitlerin değerlendirilmesinde boyut azalması dışında kesit izdüşümlerine de dikkat edilmesi gerekmektedir. İki boyutlu düzlemlerdeki yapının kesit izdüşümlerinin niceliği, taneciğin yapı içinde sahip olduğu yerleşimine, yapının veya taneciğin büyüklüğüne, kesitin alınış yönüne ve kesitin kalınlığına bağlı olarak değişmektedir (Mayhew ve Gundersen, 1996; Ünal ve diğ., 2002a).

2.5.3.1. Kesit yöneliminin etkisi

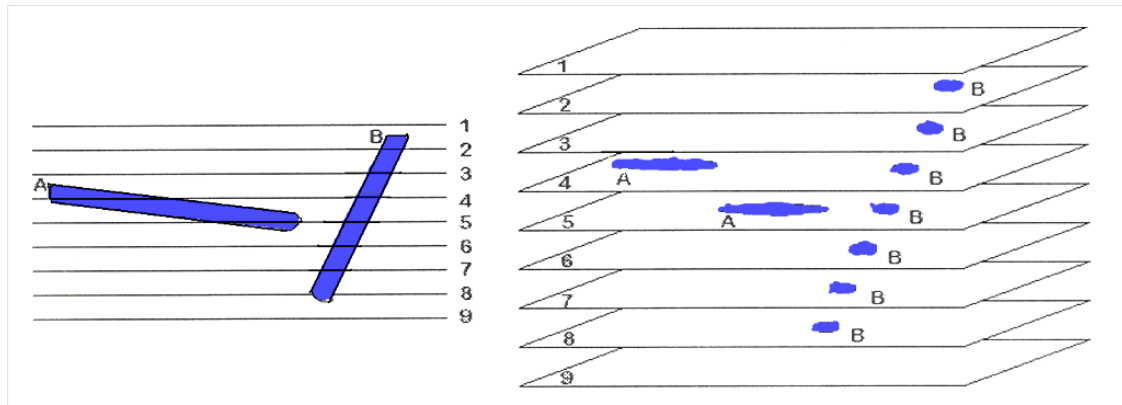
Dokudan alınan kesitlerin alınış yönüne bağlı olarak elde edilen iki boyutlu düzlemlerde gözlenen izdüşüm sayısı, tanecik sayısı arasında doğrudan bir ilişki kurulamamaktadır. Bu bir örnekle açıklanacak olursa; şekil 2.14 'de doku içinde 8 tanecik olmasına rağmen ilgili yapıdan alınan 11 kesitte gözlenen izdüşüm sayısının 21 olduğu görülmektedir. Kesitlerde ortaya çıkan izdüşüm sayısının biyolojik yapıdaki tanecik sayısının bir ifadesi olduğu ön kabulü ile yapılacak bir çalışmada, sistematik sayım hatalarının yapılması kaçınılmazdır (West, 1993). Eğer araştırmacı tüm kesitlerde değilse, kesitler arasından yapacağı bir örneklemeden sonra izdüşümleri sayacak olursa yapılan örnekleme neticesinde bulunan sonuç, bazen tesadüfen tanecik sayısını doğru bulsa bile, bu sonuç alınacak kesitlerin yönelimine bağlı olarak değişeceğinden ve doğruluğundan emin olunamayacağından dolayı güvenilir olmayacaktır (West,1993; Ünal ve diğ., 2002a).



Şekil 2.14. Kesit yöneliminin izdüşüm sayısına etkisi (Mayhew ve Gundersen 1996).

2.5.3.2. Tanecik yöneliminin etkisi

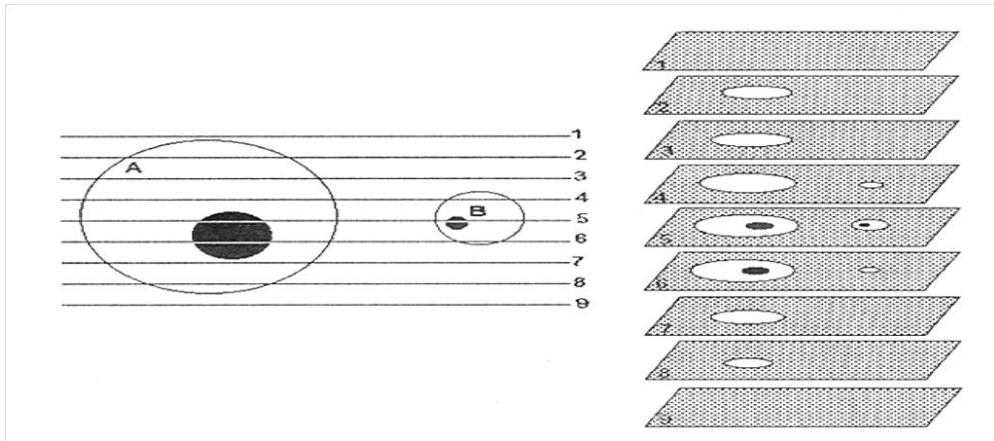
Taneciklerin kesitlerde ortaya çıkan izdüşümlerinin sayısı kesit alma yönü ile doğrudan ilişkili olduğu gibi, doku içerisindeki taneciklerin yönelimleri ile de direkt bir ilişkiye sahiptir (Şekil 2.15). Doku içinde yatık duran A taneciği ve dik duran B taneciğinin aynı yönde alınan kesitlerdeki izdüşümlerine bakılacak olursa, A taneciğinden 2, B taneciğinden ise 7 kesit düzleminde izdüşümlerinin olduğu görülmektedir. Oysa doku içerisindeki taneciklerin gerçek sayısı ikidir. Bu durum taneciklerin doku içindeki yönelim farklılıklarından kaynaklanmaktadır. Şekil 2.15'de gösterildiği gibi, doku içindeki tanecik yerleşim ve yönelim farklılıkları, alınan kesit düzlemlerinde gözlenen izdüşümlerin sayısına etki etmektedir (Mayhew ve Gundersen, 1996; Ünal ve diğ., 2002a).



Şekil 2.15. Partikül yöneliminin kesitlerdeki izdüşüm sayısına etkisi (Mayhew ve Gundersen 1996).

2.5.3.3. Tanecik büyüklüğünün etkisi

Bu konu bir örnekle açıklanacak olursa; şekil 2.16’da bir büyük ve bir küçük hücre ile bunların çekirdeklerinin kesitlerde ortaya çıkan izdüşümleri gösterilmektedir. Bu hücrelerden geçtiği varsayılan kesitler çizgiler halinde ve bu kesitlerdeki tanecik izdüşüm görüntüleri de şeklin sağında gösterilmiştir. Görüldüğü gibi, büyük tanecikler, aynı aralıkta kesitlerle örneklendiklerinde küçük olanlardan daha fazla sayıdaki kesitte ortaya çıkma şansına sahiptirler. Belirtilen şekildeki büyük hücre 5, çekirdeği 2, küçük hücre 3, çekirdeği ise 1 kesitte ortaya çıkmıştır. Tanecik büyüklüğü göz önüne alınmadığı takdirde, doğrudan izdüşüm sayısından tanecik sayısına ulaşmanın mümkün olmadığı görülmektedir (Coggeshall, 1992; Ünal ve diğ., 2002a).



Şekil 2.16. Doku içerisinde bulunan farklı büyüklükteki partiküller ve iki boyutlu düzlemlerdeki izdüşümleri (West, 1993).

Biyolojik materyallerde sağlıklı ölçüm ve değerlendirmenin yapılabilmesi için en önemli ve vazgeçilmez şartlardan birisi de, örneklemenin doğru olarak yapılmasıdır. Yapılan çalışmaya bağlı olarak, ilgili yapının (organ, doku, çekirdek, vb) tüm bileşenlerinde ölçüm yapmak, her zaman mümkün olmayabilir. Bu gibi durumlarda obje bileşenlerine ayrılarak incelenmektedir. Örneğin; sayıları milyonlarla ifade edilen merkezi sinir sistemi içerisindeki nöron gruplarının tümünü saymak yerine, tarafsız ve etkin biçimde yapılacak bir örnekleme neticesinde elde edilen bölümlerde yapılacak sayımlar çoğu zaman yeterli olmaktadır (Gundersen ve Jensen,1987).

2.5.4. Sistematik rastgele örnekleme (SRÖ)

Stereolojik metotların en önemli stratejik temelini “**Sistematik Rastgele Örnekleme**” (SRÖ) modeli oluşturmaktadır. Bu model, temelde bileşenlerine ayrılarak incelenmesi gereken yapılarda bir örnekleme yapılacağı zaman, tüm bileşenlerine yapıyı temsil edebilme açısından eşit olasılıklı şans verilmesi temeline dayanmaktadır. Çalışmalarda doğru sonuca ulaşmanın şartlarından en başta geleni işlemlerin her aşamasında sistematik rastgele örnekleme koşuluna bağlılıktır. Burada "**sistematik**" sözcüğü ile ilgilenilen bölgede yapılan bir ön çalışma sonucunda elde edilen veriler doğrultusunda örneklemin tekrar edilen periyodu, "**rastgele**" sözcüğüyle ise belirlenen periyodun ilk elemanının tarafsız bir biçimde seçilmesi anlatılmaktadır (Ünal ve diğ., 2002b). Örneğin; çalışılan biyolojik yapı için 1/6 oranında bir örnekleme yapılacaksa, kesit alma işlemi sırasında her altıncı kesit seçilerek, elimizdeki yapının disektör sayımına uygun gelen sistematik bir örneği elde edilmiş olunur. Bu sistematik örneği rastgele oluşturmak için ise, ilk 6 kesitten bir tane kesitin rastgele seçilip alınması ve bundan sonra gelecek olan her altıncı kesiti almaya devam ederek, eldeki dokusal yapının sona erinceye kadar kesitin alınmaya devam edilmesi gerekmektedir. (Ünal ve diğ., 2002b). İşlem basamağı içinde rastgele alınan bir başlangıç noktası, kendisinden sonra alınacak olan kesitler için sistematik örnekleme de rastgeleleştirmektedir (Ünal ve diğ., 2002b).

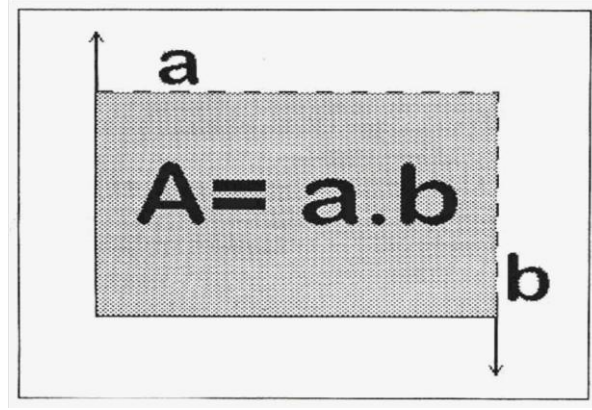
2.5.5. Disektör ve disektör sayım yöntemi

Disektör metodu, ilk defa 1984 yılında Sterio tarafından tanımlanmıştır. Bu metotla; doku ya da organ içerisindeki partikül sayısı; kesitlerin alınma yönü, sayılacak olan partikül büyüklüğü, doku içindeki yönelimi ve dokunun histolojik işlemler sırasında büzüşme ve genişlemesi gibi hesaplama hatalarına sebep olabilen tüm hata kaynaklarından bağımsız olarak tarafsız bir biçimde hesaplanabilmektedir (Sterio, 1984).

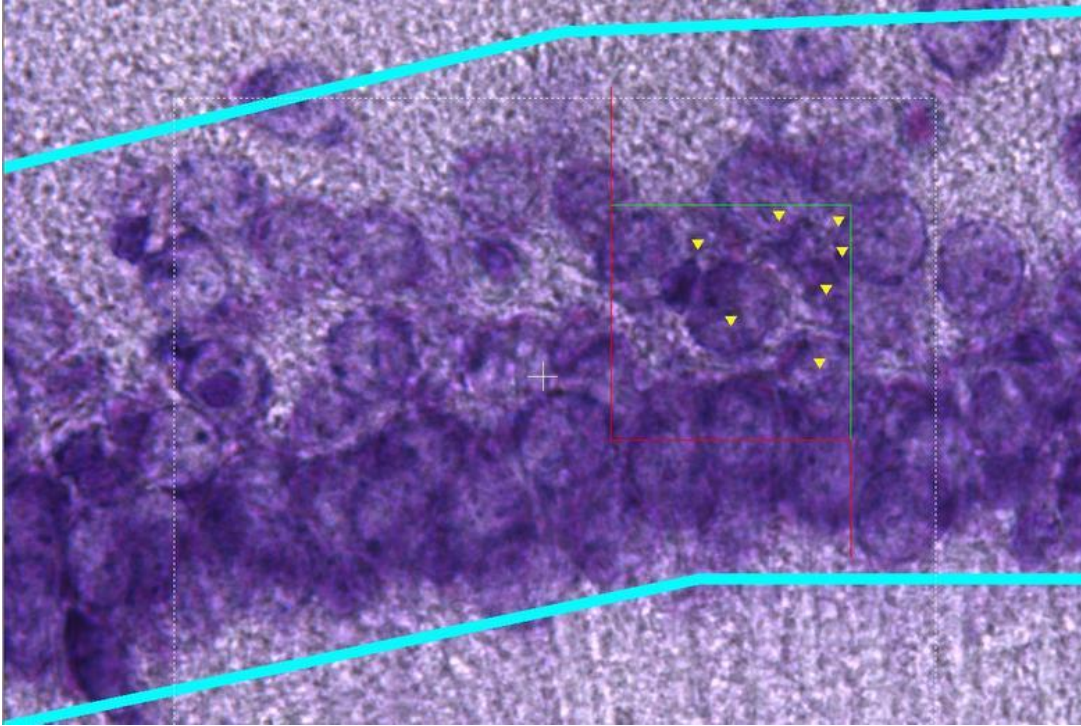
2.5.5.1. Tarafsız sayım çerçevesi

Çeşitli sayım çerçevelerinin kullanılması ile yapılan yanlışlıklar belirlendikten sonra iki boyutlu düzlemlerde gerçek sayının nasıl bulunacağını, 1977 yılında Gundersen, “**tarafsız sayım çerçevesi**” olarak adlandırılan bir sayım çerçevesi modeli geliştirerek tarif etmiştir (Şekil 3). Tarafsız sayım çerçevesinin sayım kuralları şöyle sıralanabilir:

1. İzdüşümleri tamamen sayım çerçevesi içerisinde kalan, yani herhangi bir kenar ve köşeyle kesişmeyen tanecikler sayıma dahil edilir.
2. Çerçevenin yasak çizgileri ile ifade edilen kenarlar ile kesişen izdüşümler sayılmaz.
3. Serbest çizgi ile temas eden tanecik izdüşümleri sayıma dahil edilir.
4. Çerçevenin yasak çizgilerinin uzantıları ile herhangi bir şekilde kesişen izdüşümlerde sayıma dahil edilmezler (Howard and Reed, 1998).



Şekil 2.17. Tarafsız sayım çerçevesi (Mayhew, 1992).



Şekil 2.18. Bu çalışmada kullanılan tarafsız sayım çerçevesi. ▼ Disektör taneciği

Stereoloji terminolojisinde, bu şekilde sayılabilen tanecik izdüşümleri "disektör taneciği" olarak isimlendirilmektedir ve "Q⁻" simgesi ile gösterilmektedir (Sterio, 1984). Bu sözcüğün anlamı ve içeriği, yapılan çalışmaya göre değişmektedir. Çalışmanın özelliğine göre ilgilenilen yapı, glomerül, hücre, çekirdek, organel, sinaps veya çekirdekçik olabilir. Örneğin böbrekteki glomerüllerle ilgili bir çalışmada glomerül, sinir hücreleri ile ilgili bir stereolojik çalışmada ise sinir hücresi tanecik olarak isimlendirilmektedir (Howard and Reed, 1998; Ünal ve diğ., 2002b).

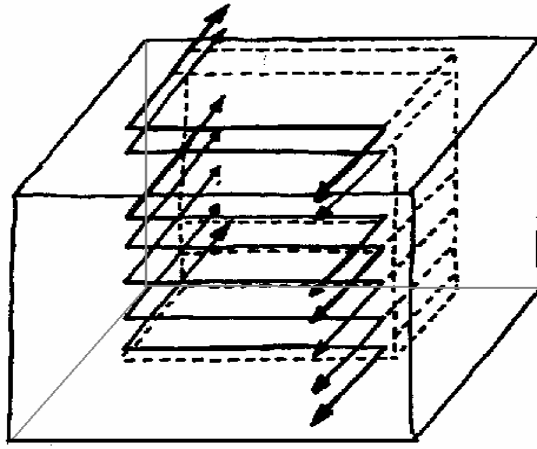
2.5.5.2. Fiziksel ve optik disektör yöntemi

Disektör yönteminin fiziksel ve optik disektör olarak iki uygulama şekli vardır.

Fiziksel disektör, ardışık iki kesit kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Bu kesitlerden birisi **örnek kesit** diğeri ise **gözlem kesit** olarak kullanılmaktadır. Ardışık iki kesitin incelenmesinde tanecik olarak nitelendirilen yapı, ya her iki kesitte de görülebilir yada kesitlerden birinde görülürken diğeriinde görülmemektedir. Kural olarak kesitlerden birinde görülen ancak diğeriinde görülemeyen tanecik sayıma dahil edilir ve disektör taneciği olarak adlandırılmaktadır. Bunun nedeni taneciğin bir başlangıç ve bir bitiş olmak üzere iki ucunun olmasıdır. Uygulamada tek yöndeki uçlardan biri sayıldığında gerçekte taneciğin kendisi sayılmış olmaktadır. Bir başka ifadeyle aynı yönde ilerlerken taneciği sayabilmek için taneciğin bitiş ucunu (ya da başlangıç ucunu) görmek yeterlidir. Kural olarak taneciğin başlangıç ucu görüldüğünde sayımın yapılacağına karar verilmişse ilk kesitte izlenemeyen, ancak ikinci kesitte izlenen izdüşüm sayılmaktadır. Eğer taneciğin bitiş ucu esas alınarak sayım planlanmış ise ilk kesitte görülen, ikinci kesitte görülmeyen tanecik izdüşümleri sayılmaktadır. Tanecik her iki kesitte de mevcut ise sayılmaz. Çünkü bu durum taneciğin devam etmekte olduğunu, taneciğin bitiş ya da başlangıç ucunun henüz görülmediğini ifade etmektedir (Cruz-Orive ve Weibel, 1990; Howard ve Reed, 1998; Ünal, 1999; İşgen, 2009).

Ardışık kesitlerde tanecik takibi yapmak oldukça zor olduğundan fiziksel disektör uygulaması çoğu zaman pratik olmamaktadır. Bu nedenle kalın kesitlerde optik olarak sanal kesitler oluşturmak suretiyle tanecik sayımının yapıldığı optik disektör çok daha fazla uygulanmaktadır. Bununla birlikte, optik disektörü ince kesitlerde ve elektron mikroskobik kesitlerde kullanmak mümkün değildir. Bu gibi durumlarda fiziksel disektör tercih edilmektedir (Gundersen, 1986; Howard ve Reed, 1998; Ünal ve diğ., 2002b).

Optik disektör, kalın bir kesit hacmi içerisinde, bir dizi sanal optik kesitle ilerleyerek, karşılaşılan partikülleri sayma esasına dayanmaktadır. Teorik olarak, kalınlık içindeki her sanal kesit, bir sonrakine göre örnek (referans) kesit, bundan bir sonraki kesit ise öncekine göre gözlem kesitidir. Dolayısıyla birinde bulunup diğerinde bulunmayan partiküller, disektör partikülü olarak sayılmaktadır. Fakat pratik uygulamada, sayısal açıklığı yüksek bir mercek (daha ince optik kesitler alabilmek için gereklidir.) kullanılarak, kesit kalınlığı ve disektör sondasının yüksekliği boyunca tarama yapılarak, karşılaşılan partiküller sayılabilmektedir (Şekil 2.19).



Şekil 2.19. Optik disektör sondasının üç boyutlu şematik çizimi (Cruz-Orive, 1997).

Optik Disektör Yönteminin Uygulanması

Bu yöntemin özünü, doku üzerinde tespit edilen herhangi bir örnekleme alanında, şeffaf olan kalın bir kesit içerisinde optik olarak ilerlemek oluşturmaktadır. Söz konusu olan örnekleme alanına gelindiğinde, öncelikle kesitin üst yüzeyine odaklama yapılarak, ilk net görüntünün elde edildiği düzey, kesitin üst yüzeyi olarak belirlenmektedir. Daha sonra, önceden belirlenmiş olan bir derinliğe kadar inilerek, kesit yüzeyinde bulunması muhtemel olan artefaktlardan sakınmak için, belli bir “güvenlik kuşağı” kadar ilerlenir. Bunun için genellikle $2-5\mu\text{m}$ ’ lik bir mesafe yeterli olmaktadır. Daha sonra, ön çalışmada tespit edilmiş olan disektör mesafesi kadar (genellikle $10-15\mu\text{m}$) ilerletilerek, bu ilerleme esnasında karşılaşılan partiküller sayılmaktadır. Disektör yüksekliği, kesitin alt yüzüne ulaşmadan, bu kez de alt yüzeydeki artefaktlardan etkilenmemek amacıyla bir alt güvenlik kuşağı bırakılacak biçimde belirlenmiş olmaktadır.

Bu şekilde gerçekleştirilen bir sayım, o disektör hacmi içerisinde bulunan partikül sayısını vermektedir. Sonuç olarak, toplam disektör partikülü sayısı, toplam disektör hacmine bölündüğünde, birim hacimde bulunan partikül sayısı (sayısal yoğunluk; NV) elde edilmektedir. Toplam partikül sayısına ulaşmak için ise, sayısal yoğunluk değeri, yapının toplam hacmi ile çarpılmaktadır (Howard and Reed., 1998; Mayhew, 1992). Denklem (2.1);

$$NV = \sum Q / \sum V_{dis} \quad (2.1)$$

NV: Sayısal yoğunluk

$\sum Q$: Toplam disektör taneciği sayısı

$\sum V_{dis}$: Toplam disektör hacmi

Toplam tanecik sayısını hesaplamak için ise, yapının toplam hacminin bilinmesi gereklidir. Örneğin, beyindeki hipokampus bölgesinin birim hacmindeki sinir hücresi sayısı disektör yöntemiyle hesaplanmış ise; toplam sayıya ulaşmak için, hipokampus bölgesinin toplam hacmini de bilmek gerekmektedir. Bunun için en uygun ve tarafsız yöntem Cavalieri hacim hesaplama yöntemidir. Tarafsız bir yöntemle elde edilmiş olan toplam hacim değeri, disektör yönteminden elde edilen sayısal yoğunluk değeri ile çarpıldığında ($N = NV \times V_{ref}$) ilgilenilen taneciklerin yapıdaki toplam sayısının tarafsız bir hesabı yapılabilmektedir (Gundersen ve Jensen, 1987; Howard and Reed, 1998; Gould ve diğ., 1999; West, 1999; Ünal ve diğ., 2002b).

2.5.6. Fiziksel ve optik parçalama

Parçalama yöntemi, ilgilenilen yapıdaki sayı, uzunluk, yüzey alanı gibi herhangi bir niceliğin tüm yapıdaki toplam değerini bulmak amacıyla kullanılmaktadır. Bu yöntem kullanılarak elde edilen sayısal değer, ilgilenilen niceliğin toplam değeridir. Bu nedenle sayısal yoğunluk gibi sayısal parametrelerin bilinmesine gerek duyulmamaktadır. Parçalama bir örnekleme sistemidir ve bu yöntemin temel mantığı; ilgilenilen yapıdan bilinen bir oranda örnek almak ve bu örnek üzerinde tarafsız bir yöntemle yapılan sayımlardan elde edilen sayısal verilerle o yapıdaki niceliğin toplam değerini hesaplamaktır (Canan ve diğ., 2002b; Gundersen ve diğ., 1988a; Gundersen ve diğ., 1988b; Howard and Reed., 1998;).

Parçalama yöntemi mantık olarak oldukça basit ve etkindir. Temel mantığı değişmemekle birlikte en son aşamadaki nicelik hesaplama yönteminin fiziksel ve optik tabanlı oluşuna, diğer bir ifadeyle sayım aşamasında kullanılan disektör şekline göre parçalama yöntemi fiziksel ve optik parçalama olarak ikiye ayrılmaktadır (Howard and Reed., 1998; Canan ve diğ., 2002b; İşgen, 2009).

Stereolojik çalışmalarda yapının tamamı çalışmaya olanak sağlamayacak kadar büyükse yapıyı temsil edecek şekilde numuneler alınması gerekmektedir. Bu işlemler belli bir plan dâhilinde SRÖ kurallarına göre yapılmakta ve yapılan her örnekleme oranı bilinmektedir. Örneğin yapı makroskobik büyüklükte ise öncelikle birbirine benzer büyüklükte parçalara ayrılmaktadır. Elde edilen parçalardan SRÖ ile ön çalışmada belirlenen oranda bir örnekleme yapılır. Bu örnekleme oranı daha sonra hesaplamada kullanılmak üzere kaydedilmektedir (**f1**). Parçalar halen mikroskobik incelemeye uygun boyutlara gelmemişse aynı işlemler tekrarlanarak yapılan her örnekleme bir kenara kaydedilmektedir (**f2**). Parçalama işlemine doku bloklanabilecek küçüklüğe gelinceye kadar devam edilir (burada iki kez parçalama yapıldığı kabul edilerek parçalama oranları f1 ve f2 olarak kaydedilmiş olmalıdır). Bu işlem sırasında önemli olan, yapılan işlemin her aşamasında SRÖ kurallarına göre hareket edilmesi ve çalışılacak olan yapının, bütünün kaçta kaçı olduğunun bilinmesidir (Gundersen ve diğ., 1988a; Gundersen ve diğ., 1988b; Howard and Reed., 1998; Canan ve diğ., 2002b; İşgen, 2009).

Seçilen parçaların iki örnekleme sonucunda mikroskobik çalışma için uygun olduğu varsayılır. Bu aşamadan sonra parçalar bloklara gömülür ve uygun bir cihazla kesitlere ayrılır. Genellikle çalışmanın bu aşamasında kesitler arasında SRÖ kurallarına göre yeniden örnekleme yapılmakta ve bu örnekleme oranı da bir kenara kaydedilmektedir (**f3**). Tarafsızlık ilkesinin gereği olarak burada yapılan örneklemede de başlangıç, sistematik birim içindeki rasgele herhangi bir sayıdan başlanılmalıdır. Örneğin kesit düzeyinde her sekiz kesitten bir tanesi ile çalışılacaksa, 1 ile 8 arasındaki bir sayı rastgele seçilerek başlangıç kesiti belirlenmektedir. Daha sonra bu sayıya her defasında 8 eklenerek diğer kesitler tespit edilmektedir. Bu işlemin sonunda sayımlar fiziksel disektör sayım yöntemiyle yapılacağından, seçilen her kesitin ardışı da beraber alınarak disektör çiftleri oluşturulmaktadır (Howard and Reed., 1998; Canan ve diğ., 2002b; İşgen, 2009).

Örneklemede esas amaç, ideal veriye ulaşmak için kesit sayısı ve alan taraması işlemlerinde en uygun planı yapmaktır. Bu nedenle örnekleme sonucu elde edilen kesitlerde de alan örnekleme yapmak gerekmektedir. Alan örnekleme yapılırken de yine kural olarak hem sistematiklik hem de rastgelelik prensiplerine uyulmalıdır. Sistematiklik her bölgeye eşit örneklenme şansı verme anlamına gelmektedir. Bunu sağlamak için seçilen kesitlerin kesit yüzeyinde X ve Y eksenlerinde ilerlenmelidir. Yine kural olarak rastgele bir başlangıç seçilmelidir. Örneğin; X ve Y düzlemlerinde 120 µm'lik adımlarla ilerlenecek ise 1 ile 120 µm arasında rasgele bir sayı ile başlanmalı ve 120 µm'lik sabit adımlarla devam edilmelidir. Bu kurallara uyularak disektör çiftleri arasında uygun bölgeler bulunup sayımlar gerçekleştirilerek disektör tanecikleri (Q^-) sayısı tespit edilmelidir. Bu sayımlar sırasında tarafsız sayım çerçevesinin alanı ile adım alanının oranının da bilinmesi gereklidir. Bu oranda gerçekte bir diğer parçalama oranıdır (**f4**). Çalışma sonunda elde edilen disektör taneciklerinin sayısı ($\sum Q^-$), buraya kadar yapılan örnekleme oranlarının tersiyle çarpılarak yapıda bulunan toplam sayı (N) hesaplanmaktadır (Gundersen ve diğ., 1988a; Gundersen ve diğ., 1988b; Howard and Reed., 1998; Canan ve diğ., 2002b; İşgen, 2009). Denklem (2.2);

$$N = \sum Q^- \times (1/f1) \times (1/f2) \times (1/f3) \times (1/f4) \quad (2.2)$$

N = Toplam tanecik sayısı

$\sum Q^-$ =Toplam disektör taneciği sayısı

f = parçalama oranları

Optik parçalamanın fiziksel parçalamadan farkı son aşamada sayım yöntemi olarak optik disektörün kullanılmasıdır. Optik disektörde her bir disektör sondası, kesit kalınlığından daha az yüksekliğe sahip üç boyutlu bir sayım kutusu anlamına gelmektedir. Başka bir ifadeyle her bir disektör sondasında, kesit kalınlığı (t) içinde belli bir kalınlıkta (h) tanecik sayımı yapılır. Burada gerçekte kesit kalınlığı içinde de bir örnekleme yapılmaktadır. Bu örnekleme kalınlık örnekleme oranı ($Ka\ddot{O}O$) olarak adlandırılır ve **f5** olarak kaydedilir ($f5=Ka\ddot{O}O=optik\ disektör\ yüksekliği/ortalama\ kesitkalınlığı=h/t$). Bu nedenle fiziksel disektörden farklı olarak bu örnekleme oranı da hesaplama da dahil edilir. Sonuç olarak optik disektör uygulaması sonucu elde edilen toplam disektör tanecikleri sayısı ($\sum Q^-$), çalışma süresince yapılan örnekleme oranlarının tersiyle çarpıldığında (burada f1, f2, f3, f4, f5 olarak ifade edildi) toplam

tanecik sayısına ulaşılmaktadır. Buraya kadar anlatılanlar denklem (2.3) ile ifade edilebilir (Gundersen ve diğ., 1988a; Gundersen ve diğ., 1988b; Howard and Reed., 1998; Canan ve diğ., 2002b; İşgen, 2009).

$$N = \sum Q \cdot x (1/f_1) \times (1/f_2) \times (1/f_3) \times (1/f_4) \times (1/f_5) \quad (2.3)$$

2.5.7. Cavalieri prensibi ve hacim hesaplanması

Cavalieri Prensibi; makroskobik ve mikroskobik olarak düzensiz bir şekle sahip nesnelerin, toplam hacim, hacim yoğunluğu ve hacim oranlarının hesaplanmasında kullanılan stereolojik bir yöntemdir (Canan ve diğ., 2002a).

Belli bir yapıdaki bileşenin toplam sayısına ulaşmak istenen çalışmalarda, birim hacimdeki sayısının (sayısal yoğunluk (N_V) da denilir) hesaplanmasının yanında, hacminin de hesaplanması gerekmektedir. Günümüz çalışmalarında, organ, doku, hücre gibi incelenecek biyolojik yapıların toplam hacimlerinin veya bileşenlerinin hacimlerinin hesaplanması için birçok farklı yöntem ve metotlar kullanılmaktadır. (Weibel, 1969; Cruz-Orive ve Weibel, 1990; Canan ve diğ., 2002a). İlgilendiğimiz organlar veya dokular çoğu zaman çevrelerindeki bileşenlerinden ayrılamaz bir bütünlük içindedirler. Örneğin; omurilikteki veya beyindeki gri madde, beyindeki farklı çekirdekler, dalaktaki beyaz pulpa, kemik iliğinin yapısı, akciğerin kesecikleri gibi değişik türden biyolojik yapılar, çevrelerindeki bileşenlerinden ayrılmayacak tarzda iç içe bir bütünlük sergilerler. Bu şekildeki yapıları izole ederek doğrudan doğruya bir hacim ölçümünün yapılması çoğunlukla imkansızdır. Bu durumu ortadan kaldırmak için, **Cavalieri Prensibi** olarak ifade edilmiş özel bir stereolojik yöntem kullanılmaktadır.

Cavalieri Prensibi, ilk kez İtalyan matematikçi Bonaventura Cavalieri tarafından XVII. yüzyılda ortaya konmuş ve prensib olarak uygulanmaya başlanmıştır. Bu prensib, stereolojik yöntemlerde en sık kullanılan hacimsel hesaplama yoludur (Gundersen ve Jensen, 1987; Howard ve Reed, 1998; Canan ve diğ., 2002a; Kalkan, 2009). Cavalieri Prensibini uygulamak için, hacmi hesaplanmak istenen biyolojik yapı eşit aralıklarla ve birbirlerine paralel kesitler verecek şekilde başından sonuna kadar dilimlere ayrılır. Daha sonra her bir dilimin aynı yöne bakan kesit yüzeylerinin alanları uygun bir yöntemle hesaplanmış olur. Tüm kesit dilimlerinden elde edilen toplam yüzey alanı değeri, dilimleme sırasında kullandığımız ortalama dilim kalınlığı ile çarpılması sonucunda yapının toplam

hacminin tarafsız bir şekilde hesaplanması sağlanmış olur. (Gundersen ve diğ., 1988; Royet, 1991; Canan ve diğ., 2002a; Kalkan 2009). Bu ise matematiksel olarak denklem (2.4)'de gösterilmektedir:

$$V_{\text{ref}} = \sum a_i \cdot T \quad (2.4)$$

V_{ref} = ilgilendiğimiz yapının toplam veya diğer bir ifade ile referans hacmi

a_i = i numaralı kesitteki yapının izdüşümünün yüzey alanı,

t = ortalama kesit veya dilim kalınlığı

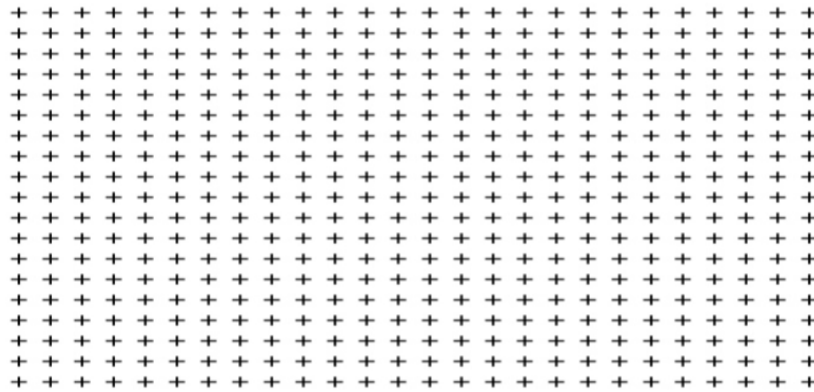
Hem mikroskopik hemde makroskopik ölçümler yapılmakta ve etrafındaki yapılarla ilgili oluşabilecek herhangi bir bağlantı önemszenmeksizin, sınırları yeterli kesitler ile belirlenen her türlü biyolojik yapının hacmi bu yöntem ile hesaplanabilmektedir (Gundersen ve Jensen, 1987; Mayhew, 1992; Canan ve diğ., 2002a).

Yüksek doğrultuda alan ölçümü yapabilmek için, mutlaka bilgisayarlı bir görüntü analiz sistemi kullanmamıza gerek yoktur. Denk doğrulukta ölçümler yapmaya olanak sağlayan çok daha ucuz yöntemler de kullanılabilmektedir (Canan ve diğ., 2002a).

Stereolojik yöntemler arasında en sık kullanılan izdüşüm alanı hesaplama yöntemi olarak **“noktalı alan ölçüm cetvelleri”** kullanmaktır (Canan ve diğ., 2002a; Kalkan, 2009).

2.5.7.1. Noktalı alan ölçüm cetvelleri

Noktalı alan ölçüm cetvelleri (Şekil 2.20), birbirinden eşit aralıklarla ayrılmış noktalardan oluşan ve sistematik noktaların bir yüzey üzerine dizilmiş şeklidir (Canan ve diğ., 2002a).



Şekil 2.20. Noktalı Alan Ölçüm Cetveli (d=0,3cm) (Canan ve diğ., 2002a).

Böyle tasarlanmış bir cetvelde, her bir (+) artı işaretinin orta noktası cetvel üzerindeki bir noktanın varlığını temsil eder. Bu oluşan noktalardan her birisi ise, dört adet noktanın arasında kalan alanı yani bir birim cetvel alanını temsil etmektedir ($P(a)$). Aralarındaki sabit mesafesi bilinen bu şekildeki bir noktalı alan ölçüm cetveli, alanı hesaplanmak istenen herhangi bir kesit görüntüsünün üzerine rastgele biçimde yerleştirilirse, yapının kesitindeki izdüşümü üzerine isabet eden noktaların sayısı ve bu izdüşümün kesitte temsil ettiği alan miktarıyla doğru orantılı olacaktır. İzdüşüm ne kadar büyük olursa, içine o kadar çok sayıda nokta isabet eder. Bu noktaların her biri belli bir birim alanını ($P(a)$) temsil ettiğinden, ilgilendiğimiz biyolojik yapının izdüşümünün sınırları içine düşen nokta sayısının ($\sum P_i$) bu birim alan değeri ile çarpımı, bizlere o kesitteki izdüşümün toplam alanının (A_i) tarafsız bir hesaplamasını vermektedir (Gundersen, 1986; Gundersen ve Jensen, 1987; Canan ve diğ., 2002a; Kalkan, 2009). Buraya kadar anlatılanlar denklem (2.5) ile ifade edilebilir;

$$A_i = \sum P_i \cdot P(a) \quad (2.5)$$

3. MATERİYAL VE YÖNTEMLER

3.1. Araştırma Uygulamalarının Yapıldığı Yer

Bu çalışmanın tüm deneysel içerikli uygulamaları ve işlem basamakları Ondokuz Mayıs Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi, Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı ve Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Histoloji Araştırma Laboratuvarlarında gerçekleştirildi.

3.2. Etik Kurul İzni

Bu çalışma Ondokuz Mayıs Üniversitesi Rektörlüğü Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 26.10.2010 tarihli ve 2010-132 sayılı yazısında belirtilen Etik Kurul Raporu Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nün ilgili Etik Kurulları tarafından onaylandı.

Çalışmada çiftleşmeye bırakılmak üzere toplam 18 adet dişi Wistar albino cinsi sıçan (210-250 gr) kullanıldı. Bu gebeliklerden elde edilen yavruardan ise toplam 45 adet erkek sıçan çalışmada kullanıldı. Tüm hayvanlar steril, 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık deney hayvanları ünitesi ortamında, 55-60 °C nem ve 19-22 °C oda sıcaklığında bakım ve beslenmeye tabii tutuldu. Tüm gruplardaki hayvanlara *ad-libitum*, sınırsız yem ve musluk suyu tüketme imkânı sağlandı.

3.3. Farelere Uygulanan Maddeler

Çalışmada kullanılan rosiglitazon, Glaxo-Smith Kline firmasından temin edildi (saf formda, toz halinde) ve çizelge 3.1'de gösterildiği gibi iki farklı doz grubu oluşturuldu. Rosiglitazon düşük doz grubu (RD) olarak adlandırılan gruptaki sıçanlara 2 mg/kg, rosiglitazon yüksek doz grubu (RY) olarak adlandırılan gruptaki sıçanlara ise 5 mg/kgdozdaki ilaç gavaj yoluyla verildi.

3.4. Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal Maddeler

Disodyum Hidrojen Fosfat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$),
Potasyum Dihidrojen Fosfat (KH_2PO_4)
Sodyum Klorür (NaCl), Entellen ve Parafin Merck W.Germany Firmasından
Absollü etil alkol ve Ksilen Riedel-de Haën Firmasından,
Formaldehit, Lab Scan Analytical Sciences Firmasından
Creysl violet, Sigma Aldrich Firmasından
Glasiyal asetik asit, Sigma Aldrich Firmasından
Ketamin, (Alfazyne®), Ege-Vet firmasından temin edildi.

3.5. Çalışmalarda Kullanılan Aletler

Sartorius CP 224 S hassas terazi
Electromag M 6040 BP inkübatör
Reichert-Jung 2030 Rotary mikrotom
Cyberscan 500 pH metre
Parafin su banyosu
Leica D 1000 ışık mikroskobu
Leica DFC 290 görüntü aktarım aparatı
Dell Inspiron bilgisayar
Jencons ScientificvL limited su arıtma cihazı
Olympus (Danimarka) firmasının üretimi olan C.A.S.T.-Grid® Stereolojik analiz yazılımı ve donanımını

3.6. Deney Protokolü

Çalışma genel olarak üç aşamada gerçekleştirildi;

- 1. Aşama:** Dişi sıçanların deneysel gruplara uygun olarak ayrılması ve deney grubundaki dişi sıçanlara ilaç uygulanması,
- 2. Aşama:** Gebe kalan sıçanlardan elde edilen yavruların deney planına uygun olarak ayrılması ve yaş gruplarına göre kurban edilecekleri güne kadar kafeslerde bakılması,

3. Aşama: Etik kurallara uygun olarak diseke edilen beyinlere stereolojik metotlara uygun olarak gerekli histolojik işlemlerin uygulanması ve hazırlanan preparatların aynı metot kurallarına göre değerlendirilmesi.

1. Aşama: Dişi sıçanların deneysel gruplara uygun olarak ayrılması ve deney grubundaki dişi sıçanlara ilaç verilmesi.

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Cerrahi Araştırma Merkezi'nden alınan 18 adet dişi Wistar albino cinsi sıçan (210-250 gr) çizelge 3.1'de gösterildiği gibi 9 gruba ayrıldı.

Çizelge 3.1. Çiftleşme için gruplara ayrılan dişi sıçan sayıları.

Yaş grupları Uygulama grupları	Yenidoğan grubundaki (YD) gebe rat sayısı	4 haftalık Yavru grubundaki (4H) gebe rat sayısı	12 haftalık Erişkin gurubundaki (12H) gebe rat sayısı
Rosiglitazon Düşük Doz (RD) (2mg/kg)	2 adet	2 adet	2 adet
Rosiglitazon Yüksek Doz (RY) (5mg/kg)	2adet	2 adet	2 adet
Kontrol grubu	2 adet	2 adet	2 adet

Çiftleşme için ayrılan dişi sıçanlar çalışmanın kontrollü devam etmesini sağlamak amacıyla 6'lı gruplar halinde çiftleşmeye bırakıldı. İlk 6 dişi sıçan doğum yaptıktan sonra diğer dişi sıçanlar sırayla çiftleşmeye bırakıldı. Her defasında bir kafese iki dişi iki erkek sıçan koyuldu. Gebelik tayini için ölçüt vajinal plak oluşumu kabul edildi. Bu doğrultuda, çiftleşmeye bırakıldıkları günden itibaren hergün dişi sıçanlarda vajinal plak oluşup oluşmadığı kontrol edildi ve vajinal plak oluşumu gözlenen sıçanların gebeliğin birinci gününde oldukları kabul edildi. İlaç uygulanacak RD ve RY grubundaki hayvanlara gebeliğin birinci gününden itibaren ilk 16 gün boyunca günde bir kez olmak üzere her gün belirlenen dozlarda ilaç gavaj

yoluyla verildi (Şekil 3.1). Kontrol grubundaki gebe sıçanlara hiçbir işlem uygulanmadı.



Şekil 3.1. A. Gebe sıçanlara gavaj yoluyla ilaç verilmesi, **B.** Bir gebe sıçandan elde edilen yavrular.

2. Aşama:Gebe kalan sıçanlardan elde edilen yavruların deney planına uygun olarak ayrılması ve yaş gruplarına göre sakrifiye edilecekleri güne kadar kafeslerde bakılması.

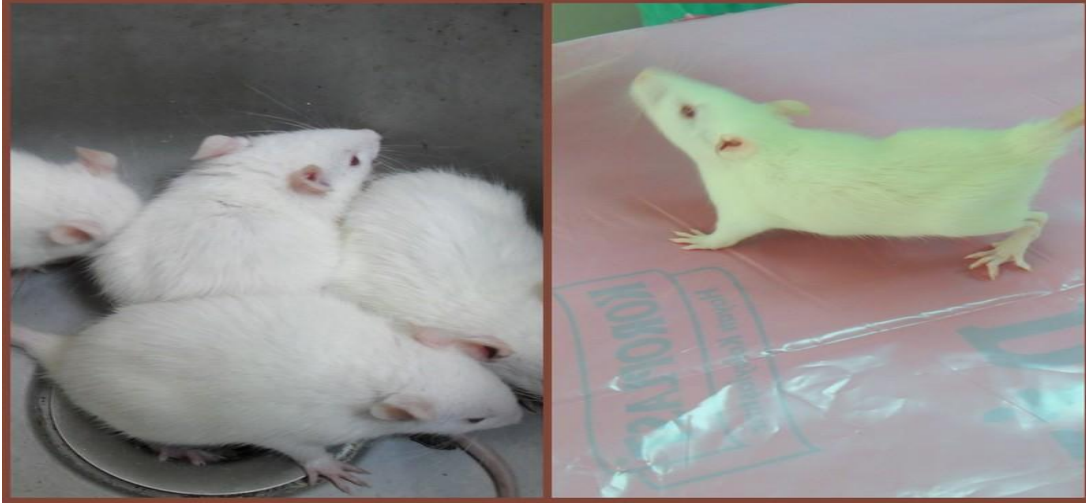
Tüm dişi sıçanların gebelik dönemleri 21-24 gün sürdü. Her bir dişi sıçandan en az 6 en fazla 14 yavru elde edildi. Bunlardan sadece erkek sıçanlar çalışmaya dahil edildi. Her grup için 5 adet erkek yavru sıçan çizelge 3.2’de gösterildiği gibi ayrıldı. Bunlardan yenidoğan grubunda (YD) olanlar doğdukları gün sakrifiye edildi. 4 haftalık (4H) ve 12 haftalık (12H) grubundaki sıçanlar ise doğum tarihleri not alınarak sakrifikasyon işlemine kadar aynı koşullarda muhafaza edilerek bakımları yapıldı (Şekil 3.2, 3.3)

Çizelge 3.2. Gebe sıçanlardan elde edilen ve yaş gruplarına ayrılan yavru sıçan sayıları.

Yaş grupları Uygulama grupları	Yenidoğan Grubundaki (YD) Rat Sayısı	4 Haftalık Yavru Grubundaki(4H) Rat Sayısı	12 Haftalık Erişkin Gurubundaki (12H) Rat Sayısı
Rosiglitazon düşük doz (RD) (2mg/kg)	5 adet	5 adet	5 adet
Rosiglitazon yüksek doz (RY) (5mg/kg)	5 adet	5 adet	5 adet
Kontrol grubu	5 adet	5 adet	5 adet



Şekil 3.2. Yenidoğan grubundaki sıçanlar.



Şekil 3.3. 4 haftalık ve 12 haftalık yaş grubundaki sıçanlar.

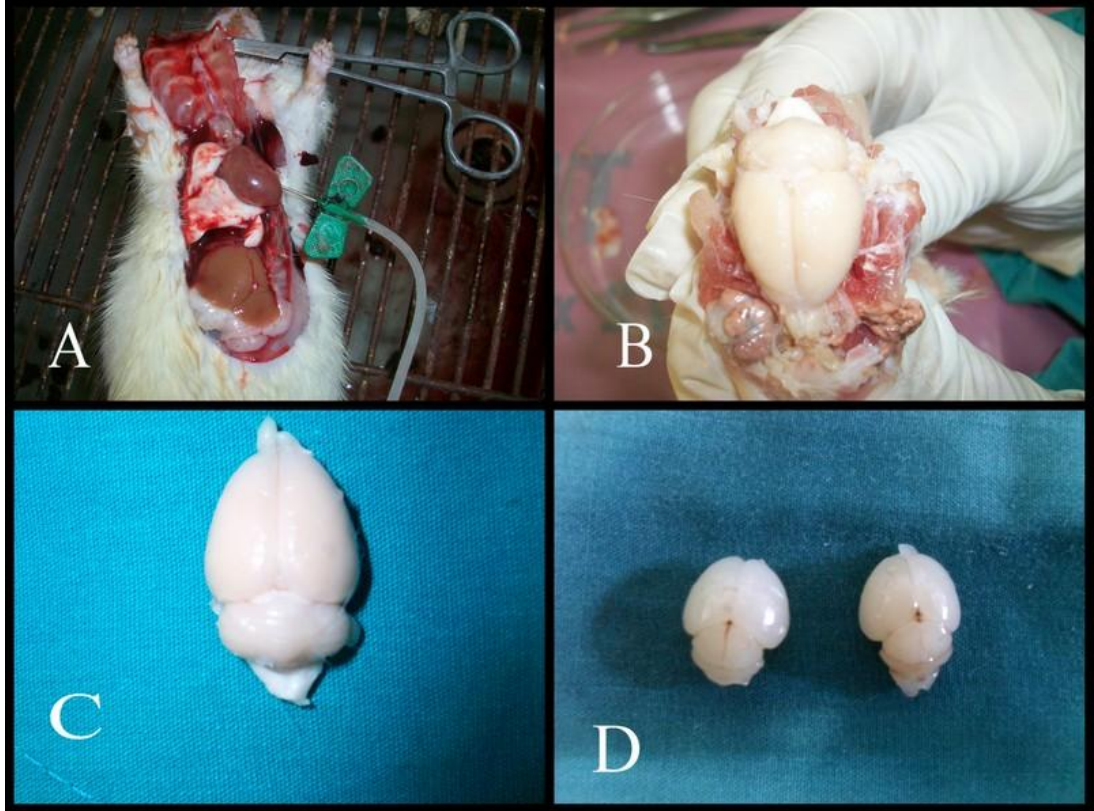
3. Aşama: Etik kurallara uygun olarak diseke edilen beyinlere stereolojik metotlara uygun olarak gerekli histolojik işlemlerin uygulanması ve hazırlanan preparatların aynı metot kurallarına göre değerlendirilmesi.

3.7. Histolojik İşlem Basamakları

3.7.1. Perfüzyon ve beyin diseksiyonu

Belirlenen günlerde tüm sıçanlar perfüze edilerek beyin dokuları çıkarıldı. Bu amaç için önce sıçanlar, ketamin HCl (40-50 mg/kg) ile derin anestezi altına alınarak sırt kısmı ızgaraya gelecek şekilde tespit edildi. Makas yardımıyla diyaframın altından, yukarı-sağa ve sola doğru ilerleyerek göğüs kafesi açıldı, kalp ortaya çıkarıldı. Kalp çalışır durumdayken, sol ventriküle 0,5 cc heparin enjeksiyonu yapıldı. Daha sonra kalbin sol ventrikülüne cam bir kanül ile girildi. Perfüzyon sırasında kanın dışarı akması için kalbin sağ atriumu kesildi. Sağ atriumdan çıkan kanın rengi berraklaşmaya kadar (yaklaşık 1–2 dakika) kanül aracılığı ile intrakardiyak yoldan önce %0,9'luk serum fizyolojik sonra tamponlanmış %10'luk nötral formalin verilerek tespit sağlandı (Şekil 3.4.A). Deney aşamasında kullanılan tüm sıçanların kafatasları çok dikkatli bir uygulama ile etik kurallara uygun olarak açılarak beyin dokuları çıkarıldı (Şekil 3.4.B,C). Çıkarılan bu beyin dokuları %10'luk tamponlanmış nötral formalin tespit solüsyonu içerisinde gruplar halinde ve ayrı ayrı olarak etiketlenip yerleştirildi. Yenidoğan grubundaki hayvanların beyinleri diğer gruptakilerden farklı olarak; ketaminle derin anesteziye alındıktan sonra kafaları

vücutlarından kesilerek ayrıldı. Henüz kemikleşmemiş olan kafatasına, beyne zarar vermeden kesi atıldı ve bu şekilde fiksatife alındıktan 3-4 gün sonra beyin dokuları çıkarıldı (Şekil 3.4.D). Alınan bütün dokular 7-10 gün fiksatifte bekletildikten sonra sıçanların beyinlerinin sol ve sağ beyin yarım küreleri birbirinden ayrıldı. Çalışmanın sağ beyin yarım kürelerinde devam edilmesine karar verildi. Sıçanların sağ beyin yarım küreleri rutin histolojik doku takip işlemlerinden geçirilerek bloklandı.



Şekil 3.4. A. Sıçanlara, intrakardiyak perfüzyon yöntemiyle önce %0.9 NaCl daha sonra, %10'luk tamponlanmış nötral formalin verilmesi, B. Sıçan beyni diseksiyonu, C. Diseke edilen 12 haftalık sıçan beyni, D. Diseke edilen yenidoğan sıçan beyni.

3.7.2. Işık mikroskopik doku takip işlemi

%10'luk tamponlanmış nötral formaline alınan beyin dokuları fiksasyon süreci sonunda sırasıyla şu işlemlerden geçirildi;

- **Akarsuda yıkama;** Doku kasetlerine alınan dokular, temiz ve akar haldeki çeşme suyu altında gece boyunca yıkamaya alındı. (Bu süre 16-18 saat kadardır ve dokunun fiksatifte kalış süresine göre değişir)
- **Dehidratasyon;** bu işlem için dokular alkol serilerinden geçirildi. Bunun için ise şu işlem basamakları takip edildi;

1. %70'lik etil alkolde 1 gece,
2. %80'lik etil alkolde 1 saat,
3. %96'lık etil alkolde 1 saat,
4. %96'lık etil alkolde 1 saat,
5. %100'lük absolü etil alkolde 1 saat,
6. %100'lük absolü etil alkolde 1 saat bekletildi.

- **Şeffaflaştırma;** Bu işlemler için;

7. Ksilende ½ saat,
8. Yeni bir ksilende ½ saat bekletildi,
9. Birinci parafinde oda sıcaklığında (19-22°C) 1 gece yani yaklaşık 12 saat bekletildi,
10. İkinci parafinde 56-60°C'lik etüvde 1 saat,
11. 56-60°C'lik etüvde yeni hazırlanmış üçüncü parafinde 2 saat bekletildi.

- **Bloklama**

12. Son işlem olarak beyin dokuları etiketlenerek L demirlerine gömüldü.

3.7.3. Kesitlerin alınması ve kesitlerin Cresyl Violet (Krezil viyole) ile boyanması

Kesit almaya başlamadan önce üzerlerine kesit alınacak lamlara özel bir yapıştırıcı %10'luk jelâtin (100 ml saf suda 10 gr jelâtinin çözündürülmesi ile elde edildi) ve %10'luk formalinin bire bir karıştırılarak hazırlanması ile elde edilen sıvı sürüldü. Üzeri yapıştırıcı ile kaplanan lamlar 1 saat süreyle 55 °C deki etüvde kurutuldu. Lamaların bu şekilde hazırlanması her kesit alınmasından önce tekrarlandı (Aslan, 1999).

Elde edilen parafin bloklardan daha sonraki bölümlerde açıklanacak olan stereolojik örnekleme uygun olarak kesitler alındı. Kesitler 37-42 °C'deki distile suya bırakıldı ve daha önceden hazırlanmış olan lamlara alınarak, 56-60 °C'deki etüv içinde parafin eriyinceye kadar yaklaşık 12 saat süreyle bekletildi.

Denemeler sonucunda çalışmada uygulanan modifiye krezil viyoleet boyama yöntemi aşağıda verilmiştir;

Cresyl Violet (Krezil Viyoleet) Boyama Prosedürü

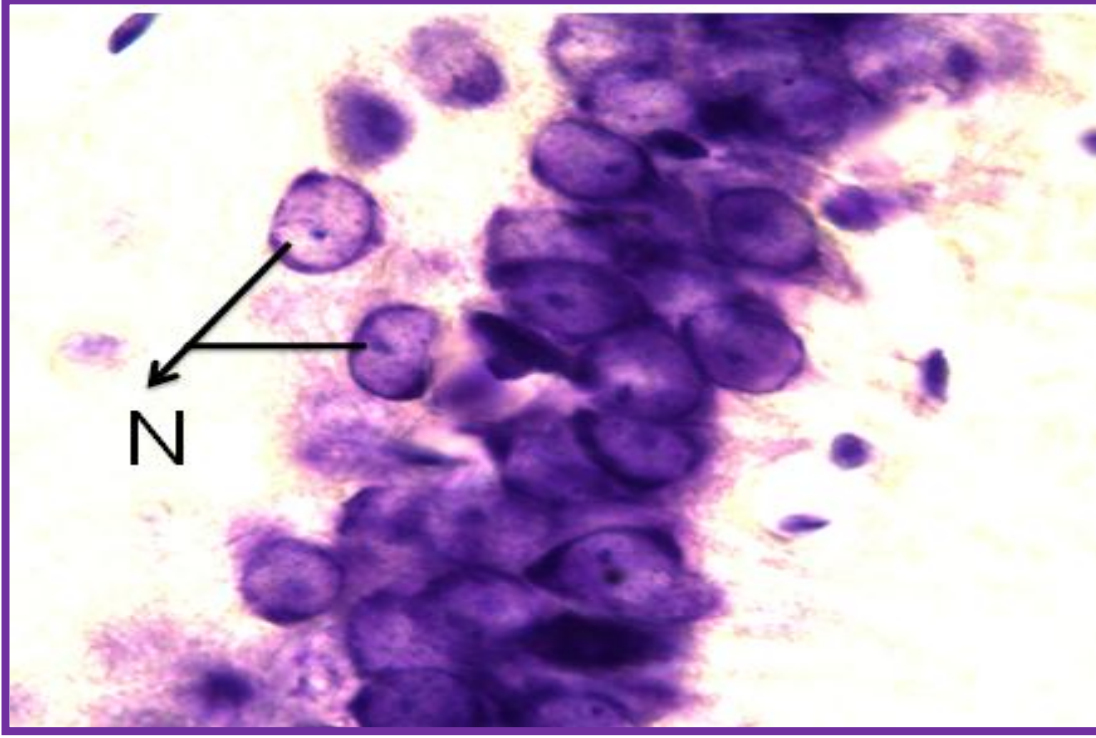
1. Lamlara alınan kesitler, ksilende 4 seri halinde ve her seri 10 dakika olacak şekilde deparafinize edildi,
2. %100'lük absolü etil alkolde 10 dakika bekletildi,
3. %96'lık etil alkolde 10 dakika bekletildi,
4. %80'lik etil alkolde 10 dakika bekletildi,
5. %70'lik etil alkolde 10 dakika bekletildi,
6. Distile suda 10 dakika bekletildi,
7. 60 °C'lik etüvde ,%1'lik Krezil Viyoleet boyasında 4 dakika süreyle boyandı,
8. Distile suda 1–2 dakika süreyle bekletildi ve dışarıda hafif kurutuldu,
9. %70'lik etil alkolde 5 dakika bekletildi,
10. %80'lik etil alkolde 5 dakika bekletildi,
11. %96'lık etil alkol+glasiyal asetik asit'te 5 dakika bekletildi,
12. %100'lük absolü etil alkol+glasiyal asetik asitte 5-10 dakika bekletildi,
13. Ksilende 10 dakika bekletildi,
14. Yeni bir ksilende 1 saat bekletildi.
15. Sonuç olarak kesitleri alınan lamalar kurumadan entellan yapıştırıcı damlatılarak uygun lamellerle kapatıldı.

3.7.4. Kesitlerde hipokampus sınırının tespiti

Daha önce yapılan çalışmalar incelendiğinde hipokampus sınırlarının farklı şekillerde belirlendiği görülmüştür (Barnea ve Nottebohm, 1996). Bu çalışmada sagittal olarak alınan kesitlerde hücre büyüklükleri veya yoğunlukları, hipokampus sınırının belirlenmesinde esas olarak kabul edildi.

3.7.5. Kesitlerde nöronların tespiti

Krezil-viyoletle yapılan boyamalarda piramidal nöronlar, pembe-eflatun zeminde yuvarlak ya da oval şekilde görülmektedir. Çekirdekleri ökromatik, çekirdekçikleri genellikle iki belirgin tanecik şeklinde, sitoplazmaları ise tipik olarak dar halka şeklinde gözlenmektedir. Kesitlerde büyük nöronlar çoğunlukta olmasına rağmen, az sayıda küçük nöronlar da mevcuttu (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. Hipokampusun CA3 bölgesindeki nöronlar. N: nöron.

3.8. Stereolojik İşlem Basamakları

3.8.1. Stereolojik metotlar

Bu çalışmada daha önce giriş kısmında kısaca bahsedilen stereolojik metotlardan birisi olan parçalama prensibi ile optik disektör kombinasyonu kullanılarak mikroskopik kesitler üzerinde nöron sayım hesaplamaları yapıldı. Bu kombinasyona göre sayı hesaplamaları için aşağıda anlatılacağı gibi belirli stratejiler belirlendi.

3.8.1.1. Kesit örnekleme işlemi

Parçalama prensibini gereğince organda **sistemik rastgele bir örnekleme** gerçekleştirildi. Örnekleme yapılırken dikkat edilmesi gereken temel prensip uygun bir hata katsayı değerinin (0,05 veya daha az) elde edilmesi olup gerekli işlemler bu kural dikkate alınarak gerçekleştirildi (Gundersen and Jensen 1987).

Uygun hata katsayısının (HK-CE) belirlenmesi işlemlerinde ise, stereolojinin prensipleri gereği bir pilot uygulama yapıldı. Bu uygulamada **kontrol 12H ve kontrol 4H gruplarına** ait beyin dokularında parçalama prensibi esası gereğince sistemik rastgele bir örnekleme gerçekleştirildi. Daha önceden, beyinde hipokampustaki piramidal hücre sayısının hesaplandığı çalışmalar dikkate alınarak

örnekleme aralığı 1/6 oranında kabul edildi (**Sistematik**). Bu örnekleme aralığıyla beyin bloklarından 20 µm kalınlığında kesitler alınarak, 1/6 oranında sistematik şekilde ve tek düze rastgele bir örnekleme yapıldı. Bunun için beyin dokusundan elde edilen ilk 6 kesit arasından bir kesit rastgele seçildi (**Rastgele**). Diğer kesitler ise başlangıçta seçilen kesit üzerine 5 kesit atlanıp 6. kesitin alınmasıyla gerçekleştirildi. Yukarıda belirtilen esaslar gereği bu gruptaki sıçanların beyin bloklarından ortalama 20-25 kesit elde edildi.

Yenidoğan grubunda ise; bu hayvanların beyinleri diğer gruptakinden daha küçük olduğu düşünülerek öncelikle bir hayvana ait beyin dokusunun tamamı arkadan öne doğru 20 µm aralıklarla başından sonuna kadar hiçbir parça atlanmaksızın kesitlere ayrıldı. Bu işlemin sonunda bir beyinden her biri 20 mikrometre kalınlığında 200 kesit elde edildi. Alınan kesitler boyandığında bu 200 kesitten 80 tanesinde hipokampus bölgesinin olduğu görüldü. Bu nedenle bu gruba ait sıçanların beyin bloklarından 1/4 oranında bir örnekleme aralığının uygun olabileceğine karar verildi ve ardından, ilk kesit rastgelelik prensibi gereği 1-4. kesitler arasından rastgele, diğer kesitler ise başlangıçta seçilen kesit üzerine 3 kesit atlanıp 4. kesitin alınmasıyla gerçekleştirildi. Bu gruptaki sıçanların beyin bloklarından bu örnekleme oranıyla ortalama 20 kesit elde edildi. Tüm gruplar için elde edilen bu kesit sayıları daha önce anlatılan stereolojik metodun geçerliliği açısından uygun sayılardır.

3.8.1.2. Stereoloji analiz sistemi

Çalışmanın stereolojik analizi OMÜ Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında bulunan stereoloji analiz sisteminde yapıldı (Şekil 8). Stereoloji analiz sistemi Olympus (Danimarka) firmasının üretimi olan C.A.S.T.-Grid® Stereolojik analiz yazılımı ve donanımını içermektedir. Sistem, stereolojik araştırmalar için tasarlanmış bir yazılım (Computer Assisted Stereological Toolbox-Olympus) içeren bir bilgisayar (Pentium PC, DELL OptiPlex, USA), araştırma mikroskobu (Leica, DMR/HCS, Germany), CCD kamera (JVC, Japan), Z ekseninde ölçüm yapan ölçüm çubuğu (Heidenhain LIP401 R, Germany), mikrokator göstergesi (Heidenhain ND221 B, Germany), mikroskop tablasının X ve Y eksenlerinde hareketini bilgisayar kontrollü olarak yönetebilen bir tabla motorundan (Prior ProScan, USA) ve bir adet tabla kontrol çubuğundan (Prior, USA) oluşmaktadır (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. Stereoloji analiz sistemi.

3.8.1.3. Stereolojik analizlerin detayları

Ön çalışma ile tespit edilen ve çalışmada kullanılan örnekleme oranları ve ölçüm sırasında kullanılan değerler çizelge 3.3 ve çizelge 3.4’de verilmiştir. Sistematik rastgele örnekleme (SRÖ) ile her altı kesitten biri (Kesit Örnekleme Oranı: 1/6) seçilerek, stereolojik analizi yapılacak kesitler belirlendi. Bu örnekleme sonucunda her bir hayvandan ortalama 20 kesit elde edildi. Örnekleme takiben kesitlerdeki hipokampus nöronları, stereoloji analiz sisteminde, optik parçalama yöntemi kullanılarak sayıldı.

Ön çalışma sonucu 4H ve 12H gruplarındaki hayvanlar için ölçüm sırasında kullanılacak değerler:

Çizelge 3.3. 4 haftalık ve 12 haftalık hayvanlar için yapılan ön çalışma ile belirlenen değerler.

Kesit örnekleme oranı	1/6
Tarafsız sayım çerçevesi alanı	$30 \times 30 = 900 \mu\text{m}^2$
Adım aralığı	$200 \mu\text{m}$
Adım alanı	$200 \times 200 = 40000 \mu\text{m}^2$
Optik disektör yüksekliği (h)	$10 \mu\text{m}$
Üst ve alt güvenlik kuşağı	$2 \mu\text{m}$
Sayım yapılan objektif büyüklüğü	100x/1,35
Sayım yapılan ortalama kesit sayısı	20

Çizelge 3.4. Yenidoğan grubundaki hayvanlar için yapılan ön çalışma ile belirlenen değerler.

Kesit örnekleme oranı	1/4
Tarafsız sayım çerçevesi alanı	$25 \times 25 = 625 \mu\text{m}^2$
Adım aralığı	$350 \mu\text{m}$
Adım alanı	$350 \times 350 = 122500 \mu\text{m}^2$
Optik disektör yüksekliği (h)	$10 \mu\text{m}$
Üst ve alt güvenlik kuşağı	$2 \mu\text{m}$
Sayım yapılan objektif büyüklüğü	100x/1,35
Sayım yapılan ortalama kesit sayısı	20

Stereoloji analiz sisteminde çalışırken daha önceden yapılan ön çalışmalar ile belirlenen veriler sisteme girildi. Kesit mikroskop tablasına yerleştirildi ve görüntü netliği sağlandıktan sonra, küçük büyütmede iken sayım alanının sınırları çizildi. Daha sonra sayım için tercih edilen büyük büyütme (bu çalışmada kullanılan objektif: 100x/1,35) geçildi. Bu sırada sistem otomatik olarak diğer sayım bölgelerini atlar ve sayım yapılacak alanı seçer. Analiz sırasında bir yandan sondalama yapılan bölgede sayılan hücre sayısı girilirken (0, 1, 2,...) bir yandan da aynı bölgelerde kesit kalınlıkları hesaplandı. Örneklenen her bir kesit için aynı işlemler yapıldı. Tüm kesitlere ait toplam tanecik sayısı, toplam sonda sayısı ve ortalama kesit kalınlığı elde edildi. Veriler ham veri şeklinde elde edildikten sonra her kesitteki toplam tanecik sayısı Excel’de hazırlanan bir sayfaya yazıldı. Sonuç olarak her bir hayvanın hipokampusundaki toplam nöron sayısı hesaplandı (Şekil 3.7). Ayrıca yapılan sayımın güvenilirliğini kontrol etmek amacıyla yine daha önceden hazırlanmış olan bir excel sayfasında her bir hayvana ait hata katsayısı ve her bir gruptaki değişim katsayısı hesaplandı (Şekil 3.8).

HÜCRE SAYIMI İÇİN HATA KATSAYISI				
Kesit	Q	Qi.Qi	Qi.Qi+1	Qi.Qi+2
1	63	3969	4284	3780
2	68	4624	4080	2856
3	60	3600	2520	1740
4	42	1764	1218	2436
5	29	841	1682	1305
6	58	3364	2610	3190
7	45	2025	2475	2430
8	55	3025	2970	2640
9	54	2916	2592	2106
10	48	2304	1872	2016
11	39	1521	1638	2301
12	42	1764	2478	2562
13	59	3481	3599	3658
14	61	3721	3782	2928
15	62	3844	2976	2480
16	48	2304	1920	2352
17	40	1600	1960	1160
18	49	2401	1421	2793
19	29	841	1653	928
20	57	3249	1824	2508
21	32	1024	1408	992
22	44	1936	1364	660
23	31	961	465	0
24	15	225	0	0
TOLAM:	1130			
		A: 57304		
		B: 52791		
		C: 49821		
		NOISE: 1130		
		VAR(srs): 29,9125		
		Toplam Var: 1159,913		
		CE: 0,030139		
		% NOISE: 97,42114		
NOT:				
Q	Disektör hücre			

DEĞİŞİM KATSAYISI HESABI			
Ratlar	Toplam N	X-X	kare(X-X)
1. Rat	1527259	-142579	2E+10
2. Rat	1855383	185545	3,4E+10
3. Rat	1639439	-30399	9,2E+08
4. Rat	1539853	-129985	1,7E+10
5. Rat	1787259	117421	1,4E+10
Ort:	1669838	CV=	0,07871
		SS=	131426
		SEM=	58775,4

Şekil 3.8. Her bir hayvana ait hata katsayısı ve her bir gruptaki değişim katsayısının hesaplandığı Excel’de hazırlanan sayfa.

3.9. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler için SPSS (Statistical Package for Social Sciences for Windows) 15.0 programı kullanıldı. Verilerin gruplar arası karşılaştırılmasında nonparametrik Kruskal Wallis testi kullanıldı. Sonuçlar % 95 güven aralığında $p < 0,05$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı, $p \geq 0,05$ düzeyinde ise istatistiksel olarak anlamsız olarak değerlendirildi. Grupların ikili karşılaştırmalarında ise Bonferroni düzeltmeli nonparametrik Mann-Whitney U testi kullanıldı (Bonferroni düzeltmeli p değeri; $p = 0.05 / \text{grup sayısı}$).

4. BULGULAR

4.1. Deney Sırasındaki Gözlemler

Çalışma sırasında, kontrol ve deney gruplarına ait gebe sıçanlardan elde edilen yavru sayısı ve doğan yavrulardaki gözle görülür bir anomali olup olmadığı (göz, kulak, burun, ağız, uzuvlar, parmaklar, kuyruk, genital organlar, hem mevcudiyetleri, hem görünüşleri, hem de sayıları bakımından) çıplak gözle gözlemlenerek değerlendirildi. Yapılan gözlemler sonucunda gruplar arasında dişi sıçanların gebelikleri boyunca herhangi dikkat çekici bir değişikliğin olmadığı belirlendi. Bununla beraber, tüm gruplardan elde edilen yavru sayıları (Çizelge 4.1), Kruskal Wallis testi kullanılarak analiz edildi ve gruplar arasında anlamlı bir farklılığın olmadığı belirlendi ($p < 0,05$) (Çizelge 4.2). Ayrıca doğan yavrularda çıplak gözle görülür herhangi bir anomali gözlenmedi (Şekil 4.1)

Çizelge 4.1. Tüm gruplardaki gebe sıçanlardan elde edilen ortalama yavru sıçan sayıları.

	1.sıçan	2.sıçan	3.sıçan	4.sıçan	5.sıçan	6.sıçan	Ortalama
KONTROL	8	10	9	7	12	10	9
Rosiglitazon Düşük Doz	9	11	8	9	10	11	10
Rosiglitazon Yüksek Doz	12	9	10	8	7	10	9

Çizelge 4.2. Gebe sıçanlardan elde edilen yavru sıçan sayılarının, gruplar arası karşılaştırılması ile elde edilen p değeri.

GRUPLAR	p DEĞERLERİ
Kontrol-rosiglitazon düşük doz- rosiglitazon yüksek doz	0,892

*Fark önemli $p < 0,05$



Şekil 4.1. Çıplak gözle görülür bir anomalinin olmadığı (göz, kulak, burun, ağız, uzuvlar, parmaklar, kuyruk, genital organlar, hem mevcudiyetleri, hem görünüşleri, hem de sayıları bakımından) yavru sıçanlar.

4.2. Histolojik Bulgular

4.2.1. Kontrol yenidoğan sıçan yavrularına ait bulgular

Yenidoğan sıçan yavrularının beyinlerinden elde edilen ışık mikroskopik kesitlerde hipokampusun; lateral ventrikülün alt boynuz tabanı boyunca gri bir cevher tabakası olarak uzandığı belirlendi. Ventriküle bakan yüzünün konveks, hemisferin alt kısmına bakan yüzünün ise konkav olduğu gözlemlendi. *Cornu ammonis*'in CA olarak ifade edilebilen hipokampus bölgeleri, hücre yapısındaki farklılıklardan dolayı CA1, CA2, CA3 ve CA4 olarak farklı alanlara bölünmüştü. Bu alanların komşuluğunda bulunan *gyrus dentatus*, nöron kümesi şeklindeydi ve kolaylıkla ayırt edilebilmekteydi. Hipokampus nöronları piramidal şekilde, bazofilik sitoplazmalı ve ökromatik çekirdekliydi. Her bir çekirdek içerisinde bir veya iki adet çekirdekçik bulunduğu gözlemlendi (Şekil 4.2).

4.2.2. Kontrol 4 haftalık sıçan yavrularına ait bulgular

4 haftalık erişkin sıçanlardan elde edilen hipokampus kesit örnekleri bilinen olgun hipokampus yapısına benzer histolojik görünüme sahipti. CA1 bölgesindeki piramidal hücrelerin, tipik olarak üçgenimsi şekilde oldukları, genellikle küçük ve dağınık yerleşim gösterdikleri gözlemlendi. Ayrıca bu bölgenin diğer bölgelere göre küçük ve yoğun olduğu dikkati çekti.

CA'in ikinci parçası olan CA2 bölgesinde ise yoğun bir şekilde yerleşim gösteren büyük ve ovoid piramidal hücrelerin varlığı dikkati çekti. CA'in üçüncü parçası olan CA3 bölgesindeki piramidal hücrelerin CA2 bölgesindeki piramidal hücrelere benzerlik gösterdiği ancak yoğunluklarının daha az olduğu belirlendi. CA4 bölgesinin; *gyrus dentatus*'un iç bükey kavitesinin içinde yerleştiği gözlemlendi. Bu bölgedeki hücreler büyük boyutlu ve ovoid yapıdaydı. Miktar olarak ise; diğer CA bölgelerine kıyasla çok daha az sayıdaydı ve dağınık tarzda yerleşim göstermekteydi.

CA4 bölgesini alttan kuşatan hilal biçimli *gyrus dentatus* bölgesi nöron kümesi şeklindeydi. Hipokampus nöronları piramidal şekilde, ökromatik çekirdekli ve bazofilik sitoplazmalıydı. Oldukça büyük ve belirgin olan çekirdeğin içerisinde bir veya iki adet çekirdekçik olduğu gözlemlendi (Şekil 4.3).

4.2.3. Kontrol 12 haftalık sıçan yavrularına ait bulgular

12 haftalık erişkin sıçanlardan elde edilen hipokampus örnekleri, tıpkı 4 haftalık erişkin sıçanlarda olduğu gibi bilinen olgun hipokampus yapısını yansıtan histolojik görünüme sahipti. CA1, CA2, CA3 ve CA4 olarak farklı alanlara bölünen hipokampus bölgeleri ile beraber bu bölgelerin komşuluğunda yer alan ve CA4 bölgesini alttan kuşatan hilal biçimli *gyrus dentatus* bölgesinde kolaylıkla seçilebilmekteydi. Hipokampus nöronları piramidal şekilde, ökromatik çekirdekli ve bazofilik sitoplazmalıydı. Her bir nöron çekirdeğinin bir veya iki adet çekirdekçığı olduğu gözlemlendi. Ayrıca bu gruptaki sıçanlar ile 4 haftalık sıçanlardan elde edilen hipokampus örnekleri arasında histolojik görünüm açısından herhangi bir fark gözlenmedi (Şekil 4.4).

4.2.4. Rosiglitazon yenidoğan gruplarına ait bulgular (RDYD ve RYYD)

Rosiglitazon düşük doz ve rosiglitazon yüksek doz yenidoğan (RDYD ve RYYD) gruplarındaki sıçan yavrularının beyinlerinden elde edilen ışık mikroskopik kesitlerde, 4'lük objektifle yapılan incelemelerde hipokampusun genel histolojik yapısının kontrol gruplarındakine benzer olduğu gözlemlendi. 40'luk ve 100'lük objektiflerle yapılan incelemelerde ise; piramidal hücrelerin morfolojik yapıları değerlendirildi ve kontrol gruplarında tanımlandığı gibi normal nöron yapısında oldukları belirlendi. Ayrıca rosiglitazon düşük doz (Şekil 4.5) ve rosiglitazon yüksek doz yenidoğan (Şekil 4.8) grupları da kendi aralarında hem hipokampusun genel yapısı hem de nöron morfolojileri açısından değerlendirildi ve iki grup arasında da dikkat çekici bir farklılığın olmadığı tespit edildi.

4.2.5. Rosiglitazon 4 haftalık gruplarına ait bulgular (RY4H ve RD4H)

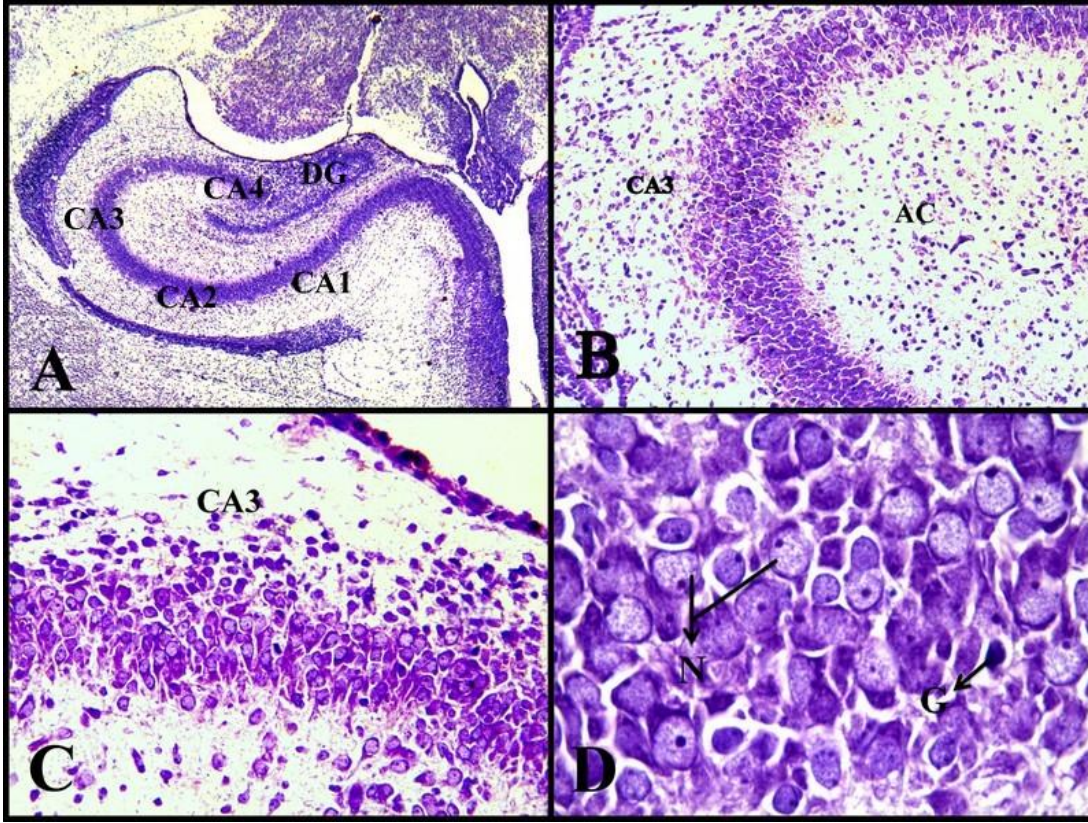
Rosiglitazon düşük doz ve rosiglitazon yüksek doz 4 haftalık (RD4H ve RY4H) gruplarındaki sıçan yavrularının beyinlerinden elde edilen ışık mikroskopik kesitlerde, 4'lük objektifle yapılan incelemelerde hipokampusun genel histolojik yapısının kontrol gruplarındakine benzer olduğu gözlemlendi. *Cornu ammonis*'in CA1, CA2, CA3 ve CA4 olarak adlandırılan bölgeleri ve bu bölgelerin komşuluğunda bulunan *gyrus dentatus* kolaylıkla seçilebilmekteydi.

40'luk ve 100'lük objektiflerle yapılan incelemelerde ise; piramidal hücrelerin morfolojik yapıları değerlendirildi ve kontrol gruplarında tanımlandığı gibi normal nöron yapısında oldukları belirlendi. Ayrıca rosiglitazon düşük doz (Şekil 4.6) ve rosiglitazon yüksek doz (Şekil 4.9) 4 haftalık grupları da kendi aralarında hem hipokampusun genel yapısı hem de nöron morfolojileri açısından değerlendirildi ve iki grup arasında da dikkat çekici bir farklılığın olmadığı tespit edildi.

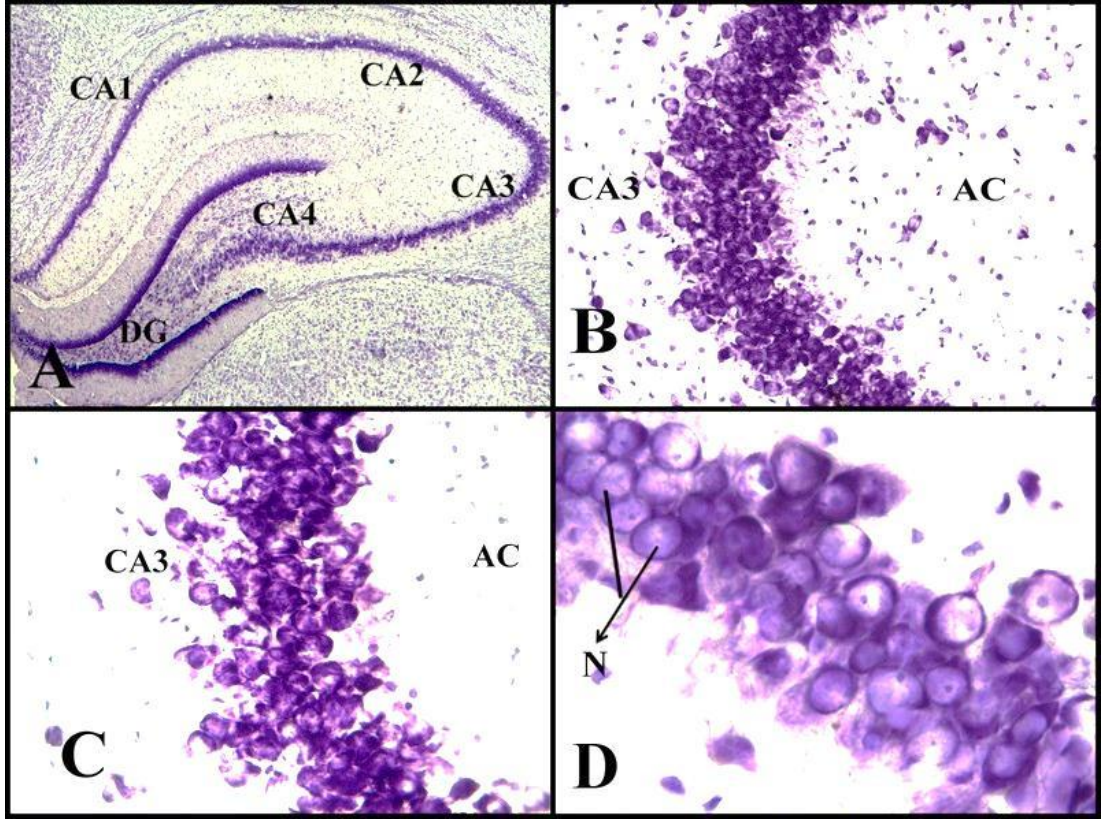
4.2.6. Rosiglitazon 12 haftalık gruplarına ait bulgular (RY12H ve RD12H)

Rosiglitazon düşük doz ve rosiglitazon yüksek doz 12 haftalık (RD4H ve RY4H) gruplarındaki sıçan yavrularının beyinlerinden elde edilen ışık mikroskopik kesitlerde, 4'lük objektifle yapılan incelemelerde hipokampusun genel histolojik yapısının kontrol gruplarındakine benzer olduğu gözlemlendi. *Cornu ammonis*'in CA1, CA2, CA3 ve CA4 olarak adlandırılan bölgeleri ve bu bölgelerin komşuluğunda bulunan *gyrus dentatus* kolaylıkla seçilebilmekteydi.

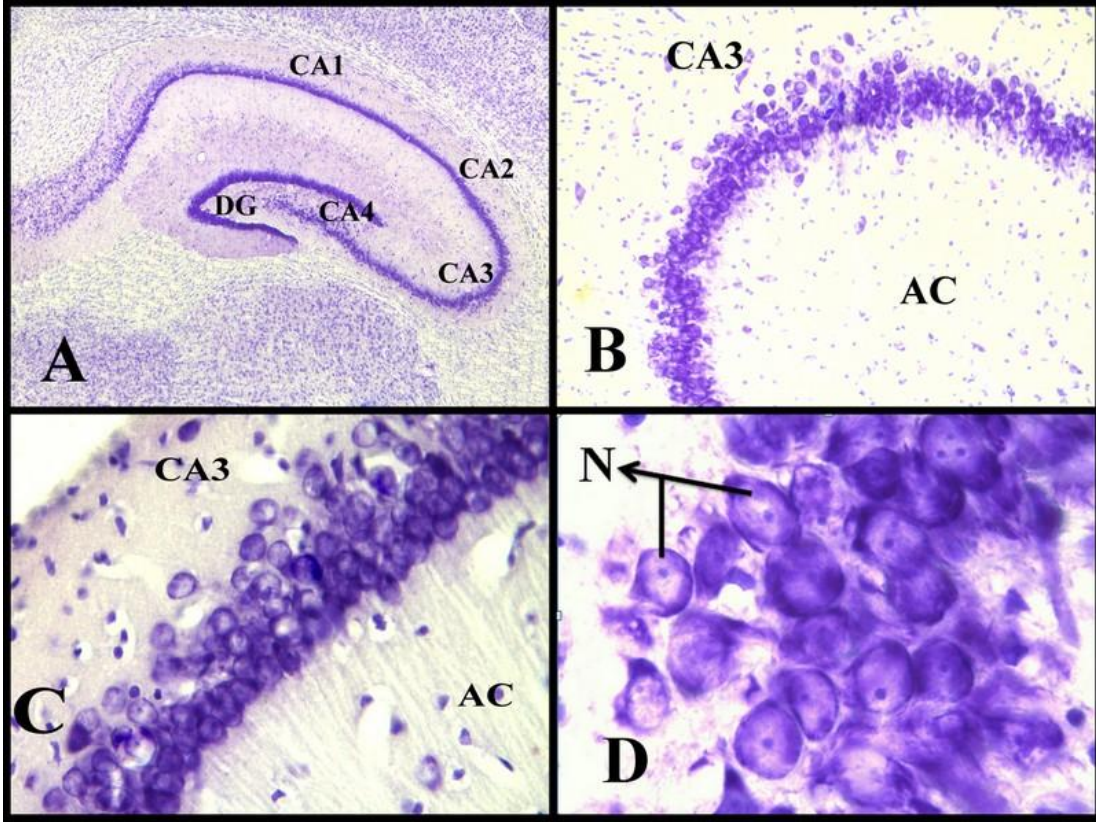
40'lık ve 100'lük objektiflerle yapılan incelemelerde ise; piramidal hücrelerin morfolojik yapıları değerlendirildi ve kontrol gruplarında tanımlandığı gibi normal nöron yapısında oldukları belirlendi. Ayrıca rosiglitazon düşük doz (Şekil 4.7) ve rosiglitazon yüksek doz (Şekil 4.10) 12 haftalık grupları da kendi aralarında hem hipokampusun genel yapısı hem de nöron morfolojileri açısından değerlendirildi ve iki grup arasında da dikkat çekici bir farklılığın olmadığı tespit edildi.



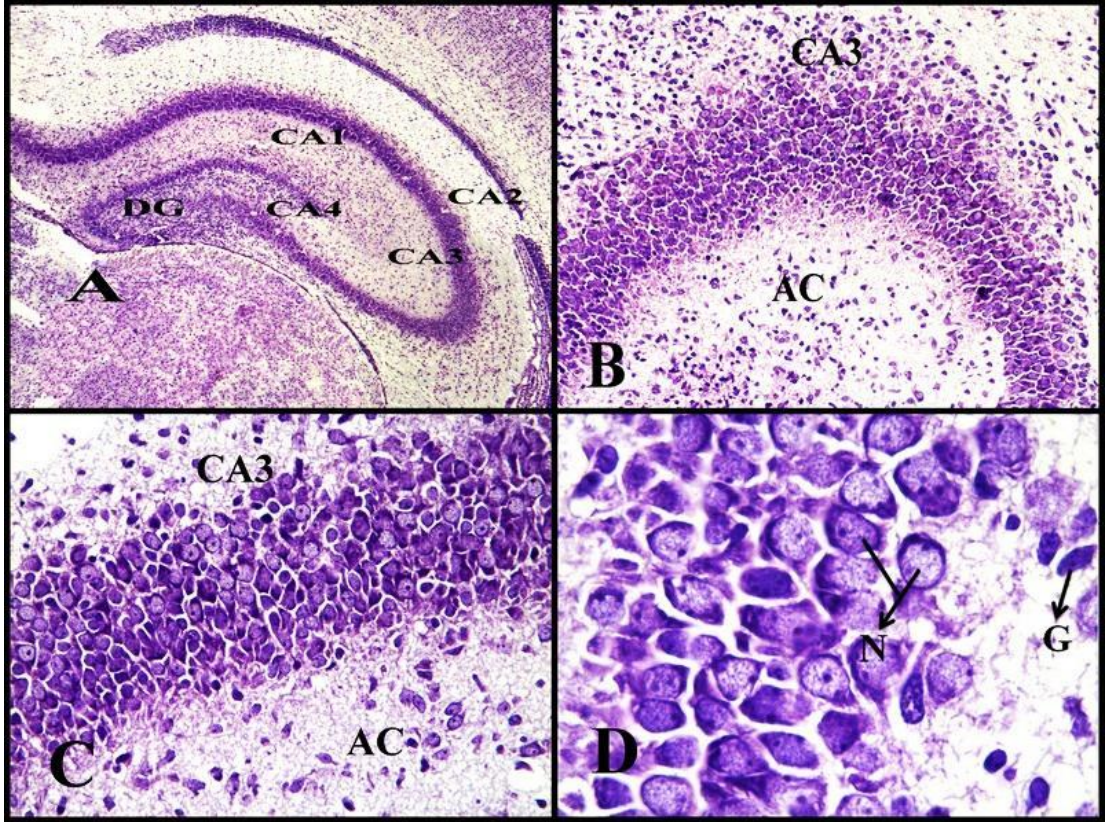
Şekil 4.2. Kontrol yenidoğan grubuna ait beyin dokusundaki hipokampusun ışık mikroskopik kesit görüntüleri. **CA1**, **CA2**, **CA3** ve **CA4**; hipokampus bölgeleri, **DG**; *dentat girus*, **AC**; ak cevher, **N**; nöronlar, **G**; glia, **A**. X40, **B**. X200, **C**. X400, **D**. X1000. Boya: Krezil viyole.



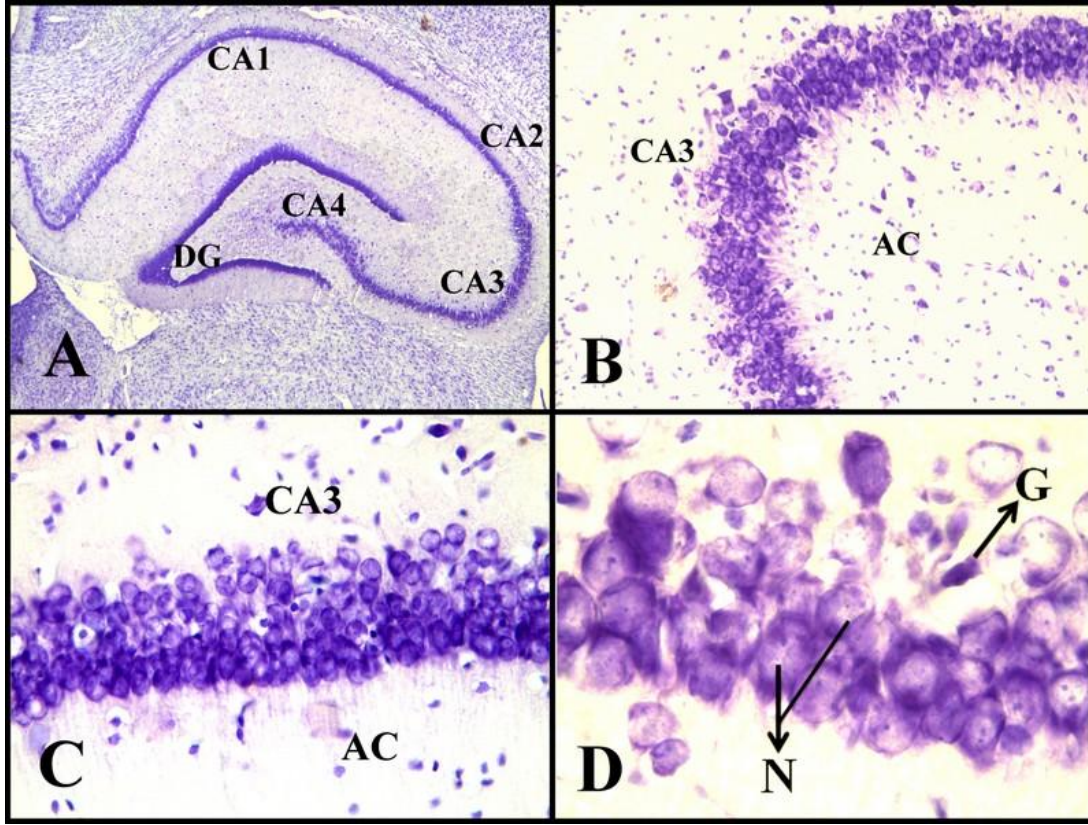
Şekil 4.3. Kontrol 4 haftalık grubuna ait beyin dokusundaki hipokampusun ışık mikroskopik kesit görüntüleri. **CA1**, **CA2**, **CA3** ve **CA4**; hipokampus bölgeleri, **DG**; *dentat girus*, **AC**; ak cevher, **N**; nöronlar. **A.** X40, **B.** X200, **C.** X400, **D.** X1000. Boya: Krezil viyoleto.



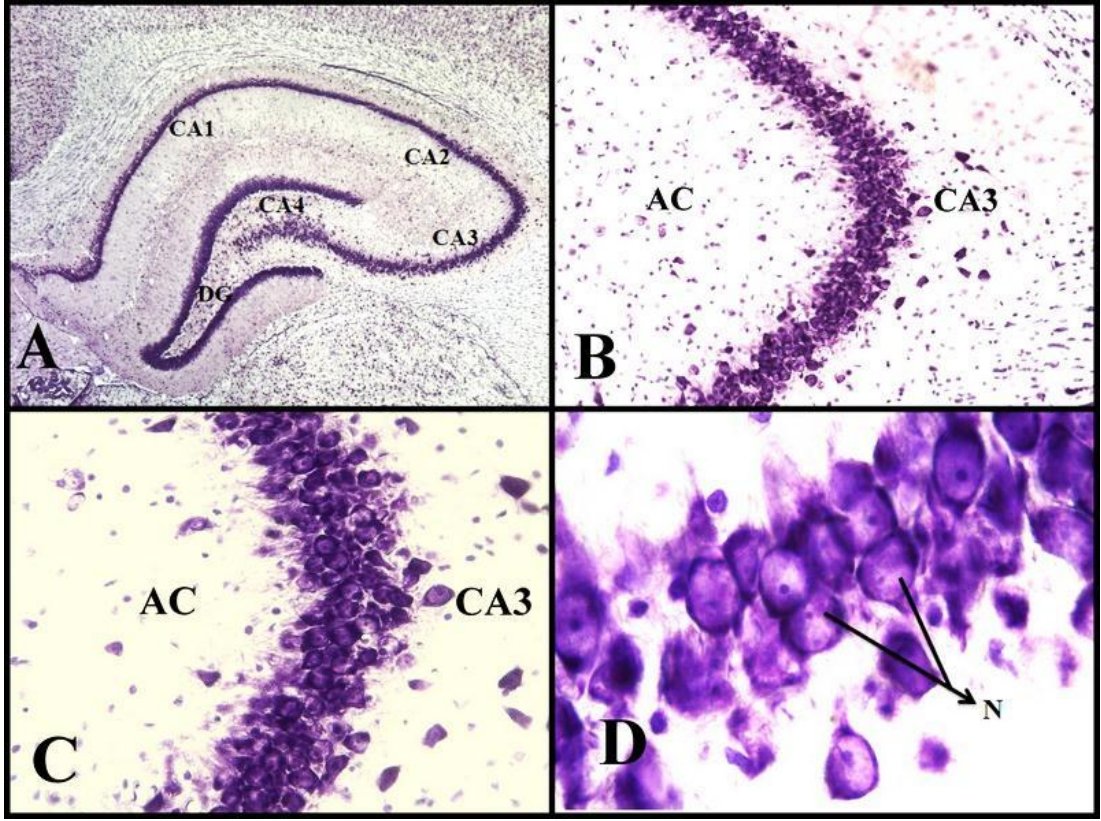
Şekil 4.4. Kontrol 12 haftalık grubuna ait beyin dokusundaki hipokampusun ışık mikroskopik kesit görüntüleri. **CA1**, **CA2**, **CA3** ve **CA4**; hipokampus bölgeleri, **DG**; *dentat girus*, **AC**; ak cevher, **N**; nöronlar. **A**. X40, **B**. X200, **C**. X400, **D**. X1000. Boya: Krezil viyole.



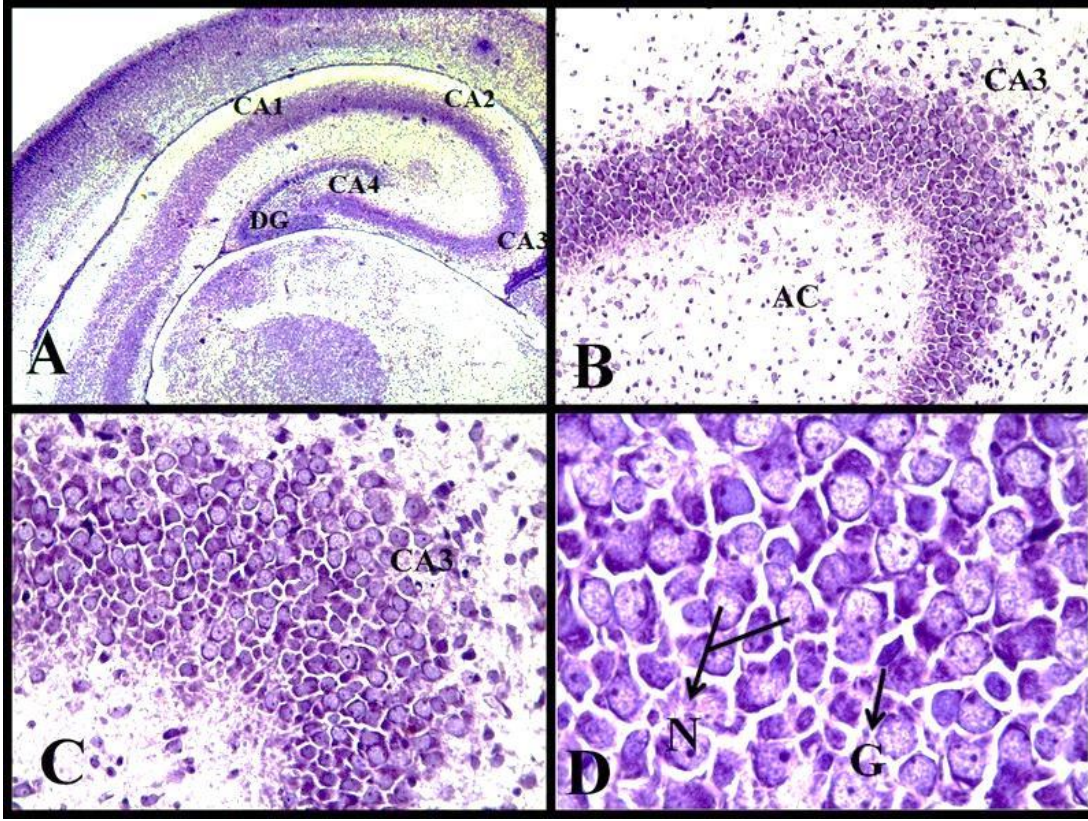
Şekil 4.5. Rosiglitazon düşük doz yenidoğan grubuna ait beyin dokusundaki hipokampusun ışık mikroskopik kesit görüntüleri. **CA1**, **CA2**, **CA3** ve **CA4** hipokampus bölgeleri, **DG**; *dentat girus*, **AC**; ak cevher, **N**; nöronlar, **G**; glia. **A.** X40, **B.** X200, **C.** X400, **D.** X1000. Boya: Krezil viyolet.



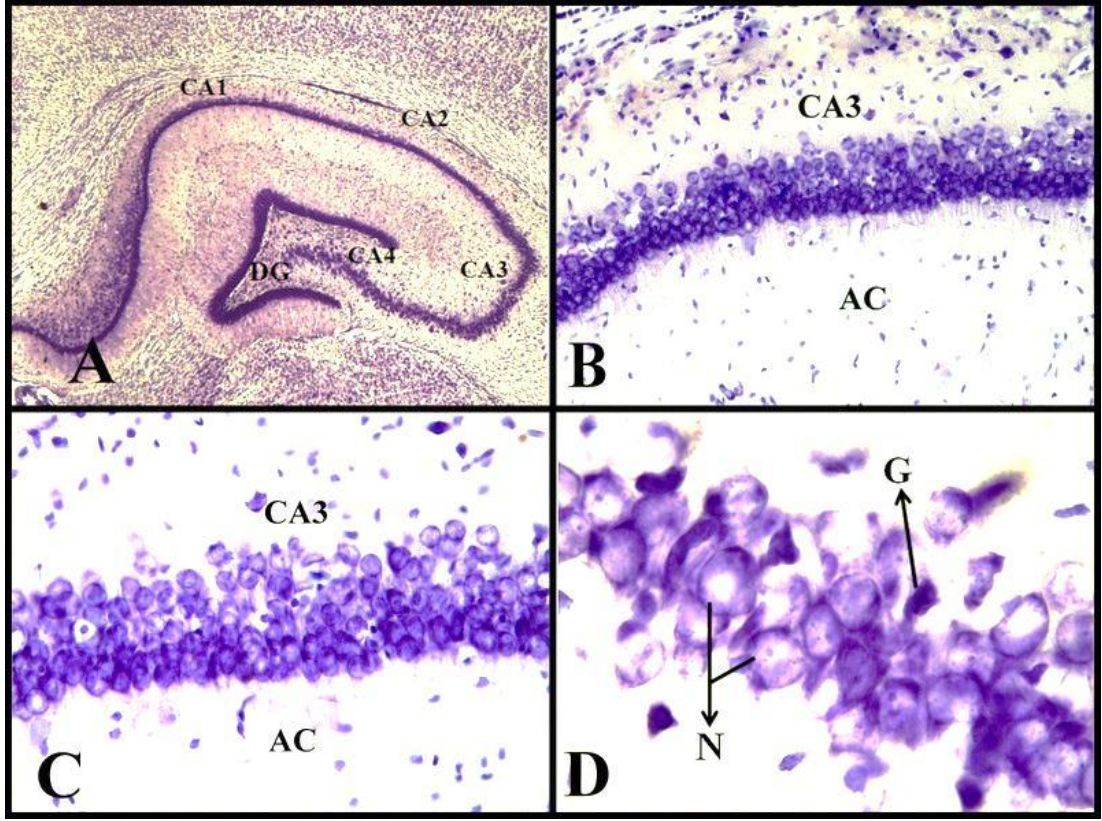
Şekil 4.6. Rosiglitazon düşük doz 4 haftalık grubuna ait beyin dokusundaki hipokampusun ışık mikroskopik kesit görüntüleri. **CA1**, **CA2**, **CA3** ve **CA4** hipokampus bölgeleri, **DG**; *dentat girus*, **AC**; ak cevher, **N**; nöronlar, **G**; glia. **A.** X40, **B.** X200, **C.** X400, **D.** X1000. Boya: Krezil viyolelet.



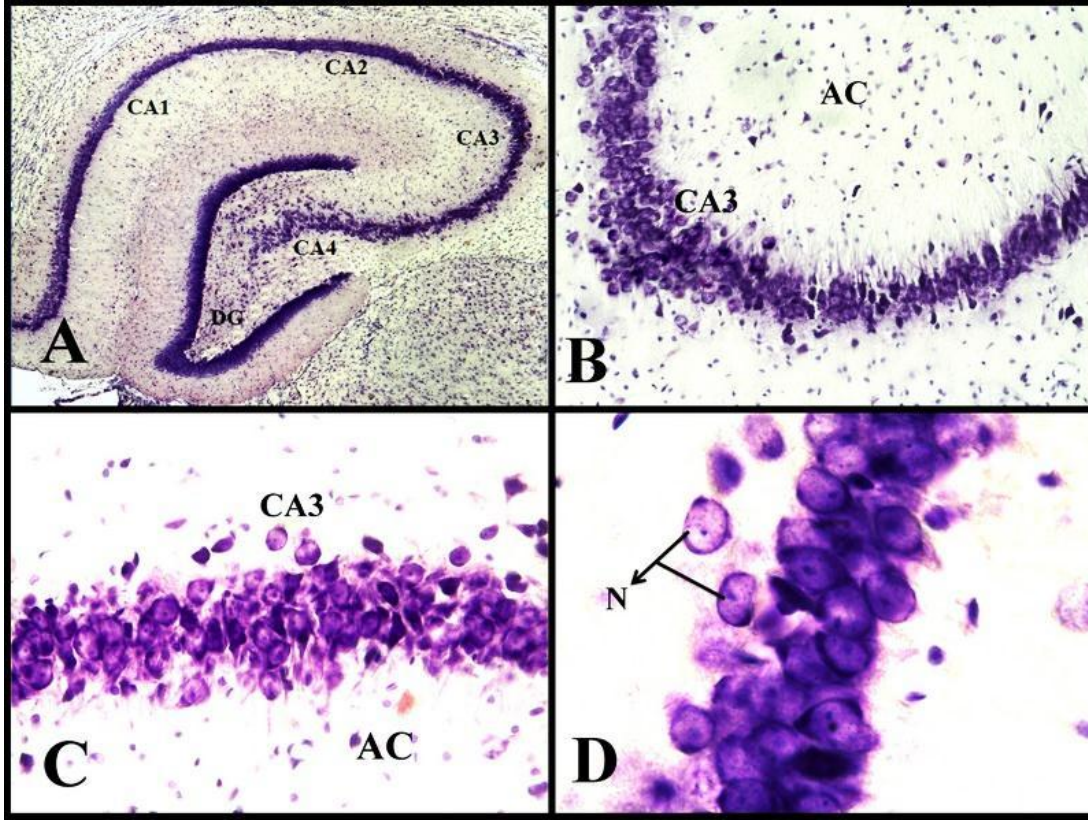
Şekil 4.7. Rosiglitazon düşük doz 12 haftalık grubuna ait beyin dokusundaki hipokampusun ışık mikroskopik kesit görüntüleri. **CA1**, **CA2**, **CA3** ve **CA4** hipokampus bölgeleri, **DG**; *dentat girus*, **AC**; ak cevher, **N**; nöronlar. **A.** X40, **B.** X200, **C.** X400, **D.** X1000. Boya: Krezil viyoleet.



Şekil 4.8. Rosiglitazon yüksek doz yenidoğan grubuna ait beyin dokusundaki hipokampusun ışık mikroskopik kesit görüntüleri. **CA1**, **CA2**, **CA3** ve **CA4** hipokampus bölgeleri, **DG**; *dentat girus*, **AC**; ak cevher, **N**; nöronlar, **G**; glia. **A.** X40, **B.** X200, **C.** X400, **D.** X1000. Boya: Krezil viyoleto.



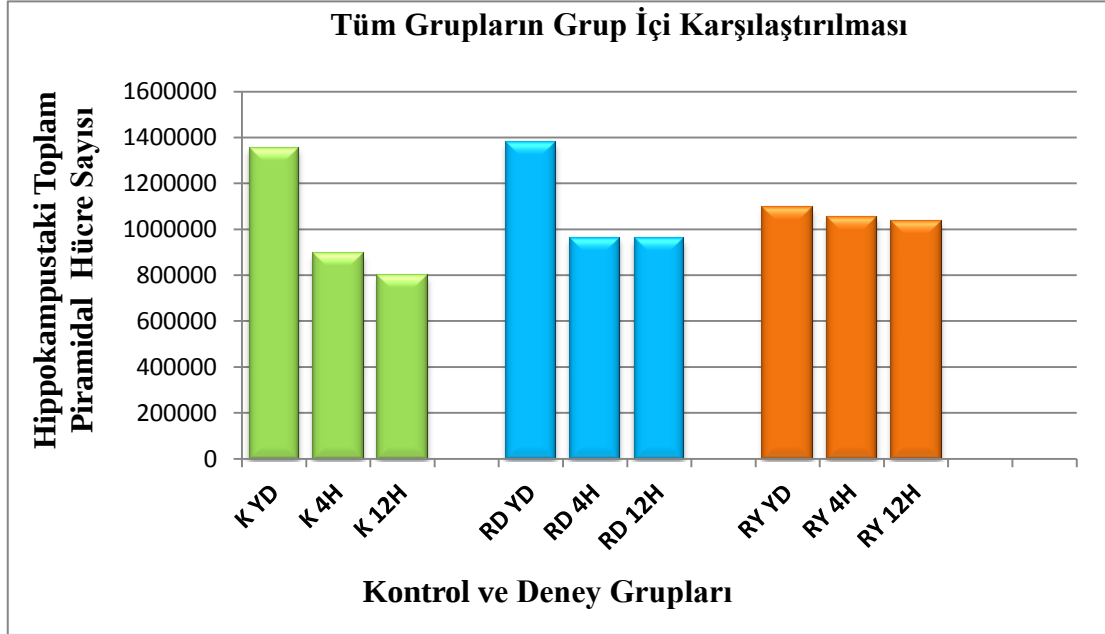
Şekil 4.9. Rosiglitazon yüksek doz 4 haftalık grubuna ait beyin dokusundaki hipokampusun ışık mikroskopik kesit görüntüleri. **CA1**, **CA2**, **CA3** ve **CA4**; hipokampus bölgeleri, **DG**; *dentat girus*, **AC**; ak cevher, **N**; nöronlar, **G**; glia. **A.** X40, **B.** X200, **C.** X400, **D.** X1000. Boya: Krezil viyole.



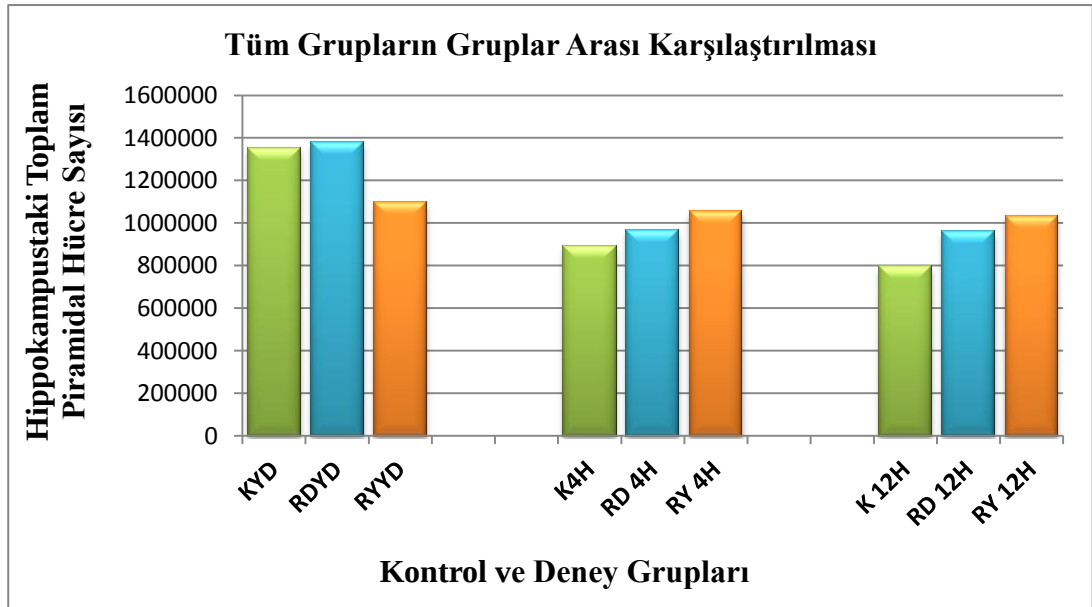
Şekil 4.10. Rosiglitazon yüksek doz 12 haftalık grubuna ait beyin dokusundaki hipokampusun ışık mikroskopik kesit görüntüleri. CA1, CA2, CA3 ve CA4; hipokampus bölgeleri, DG; *dentat girus*, AC; ak cevher, N; nöronlar. A. X40, B. X200, C. X400, D. X1000. Boya: Krezil viyolelet.

4.3. Stereolojik Bulgular

Bütün grupların beyin dokusunun hipokampuslarındaki CA bölgesinin stereolojik olarak hesaplamalarından elde edilen toplam piramidal hücre sayıları ve değişim katsayıları şekil 4.11, şekil 4.12 ve çizelge 4.3’ de gösterilmiştir.



Şekil 4.11. Kontrol, rosiglitazon düşük doz ve rosiglitazon yüksek doz gruplarının kendi yaş grupları içerisinde (Yenidoğan, 4 haftalık ve 12 haftalık) karşılaştırılması.



Şekil 4.12. Yenidoğan, 4 haftalık ve 12 haftalık yaş gruplarının kontrol ve deney grupları arasında karşılaştırılması.

Çizelge 4.3. Bütün grupların beyin dokularının hipokampuslarındaki ortalama piramidal hücre sayıları, standart sapmaları, değişim katsayıları ve her bir gruptaki sıçan sayısı.

	Ortalama Toplam Sayı ± SS	DK	Denek Sayısı
KYD	1354662 ± 69881,3	0,05	5 adet
K4H	893.348 ± 56311,8	0,06	5 adet
K12H	796421 ± 71444,6	0,08	5 adet
RDYD	1379805 ± 98944,5	0,07	5 adet
RD4H	963476 ± 95524,2	0,09	5 adet
RD12H	961248 ± 61802,5	0,06	5 adet
RYYD	1094764 ± 45020,8	0,09	5 adet
RY4H	1054999 ± 72854	0,06	5 adet
RY12H	1034787 ± 80463,6	0,07	5 adet

Çalışmamızda ikiden fazla grup bulunduğundan öncelikle Kruskal-Wallis testi ile gruplar arası farklılık araştırıldı. Yapılan istatistiksel analiz sonucunda rosiglitazon yüksek doz yaş grupları dışındaki tüm gruplarda, gruplar arasında istatistiksel olarak farklılık olduğu belirlendi ($p < 0,05$) (Çizelge 4.4). Bu nedenle rosiglitazon yüksek doz yaş grupları hariç diğer tüm gruplarda, hangi ikili gruplarda farklılık olduğunu tespit etmek üzere Bonferroni düzeltilmeli Mann-Whitney U testi (Bonferroni düzeltilmeli p değeri; $p = 0,05/3 = 0,016$) uygulandı.

Çizelge 4.4. Bütün grupların beyin dokularının hipokampuslarındaki piramidal hücre sayılarının gruplar arası karşılaştırmalarından elde edilen p değerleri.

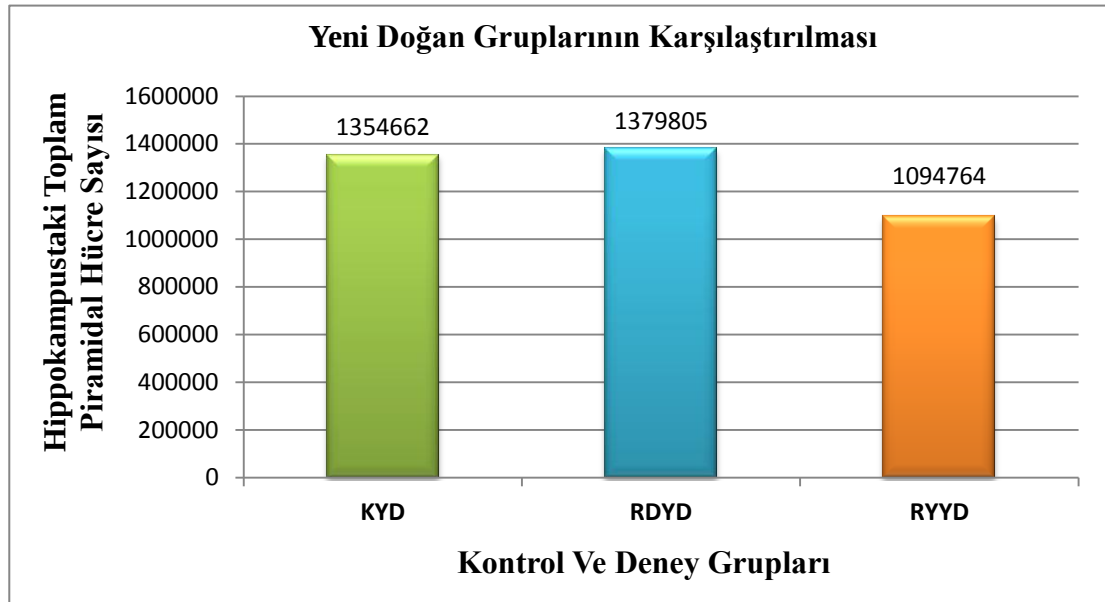
GRUPLAR	p Değerleri
KYD-K4H-K12H	0,004*
RDYD-RD4H-RD12H	0,009*
RYYD-RY4H-RY12H	0,512
KYD-RDYD-RYYD	0,009*
K4H-RD4H-RY4H	0,021*
K12H-RD12H-RY12H	0,009*

*Fark önemli $p < 0,05$

Grupların ikili karşılaştırmalarından elde edilen sonuçlar aşağıdaki gibidir;

4.3.1. Yenidoğan gruplarının karşılaştırılması

Yenidoğan gruplarına ait beyin dokularının hipokampuslarının CA bölgesinin stereolojik olarak hesaplamalarından elde edilen toplam piramidal hücre sayıları şekil 4.13’de gösterildi. Yapılan istatistiksel analiz sonucunda KYD ve RDYD grupları arasında anlamlı bir farklılık bulunmadı ($p = 0,75$). KYD ve RYYD gruplarının nöron sayılarına bakıldığında RYD grubunda bir azalma olduğu görüldü ve bu farklılığın anlamlı olduğu analiz edildi ($p = 0,009^*$). Ayrıca RDYD ve RYYD grupları karşılaştırıldığında da RYYD gruplarında nöron sayılarında bir azalma olduğu ve bu farklılığın anlamlı olduğu tespit edildi ($p = 0,009^*$) (Çizelge 4.5).



Şekil 4.13. Yenidoğan gruplarına ait beyin dokularının hipokampuslarındaki piramidal hücre sayılarının karşılaştırılması.

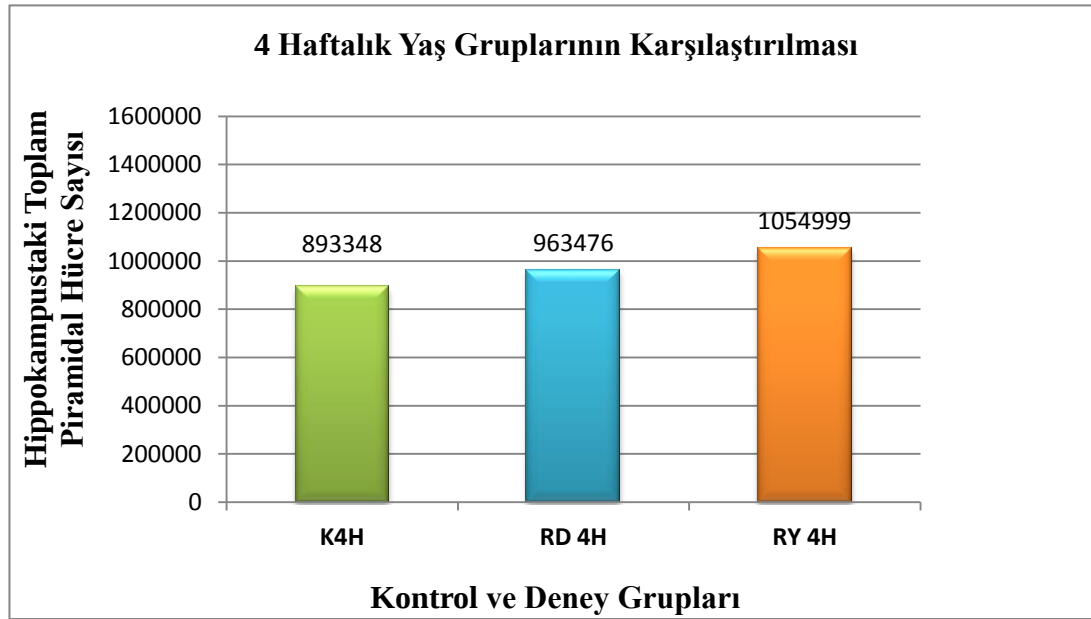
Çizelge 4.5. Yedi doğan gruplarının ikili karşılaştırmalarından elde edilen p değerleri.

Yenidoğan Grupları	p Değerleri
KYD-RDYD	0,754
KYD-RYYD	0,009*
RDYD-RYYD	0,009*

*Fark önemli $p < 0,016$

4.3.2. 4 Haftalık grupların karşılaştırılması

4H'lık gruplarına ait beyin dokularının hipokampuslarının CA bölgesinin stereolojik olarak hesaplamalarından elde edilen toplam piramidal hücre sayıları şekil 4.14'de gösterildi. Yapılan istatistiksel analizler ile gruplar arası ikili karşılaştırma sonucunda, K4H ile RD4H grupları arasında ($p = 0,251$) ve RD4H ile RY4H grupları arasında ($p = 0,076$) anlamlı bir fark olmadığı tespit edildi. Bunun yanında RY4H grubundaki nöron sayısında K4H grubuna göre bir artış olduğu ve bu artışın istatistiksel olarak önemli olduğu bulundu ($0,009^*$) (Çizelge 4.6).



Şekil 4.14. 4 haftalık yaş gruplarına ait beyin dokularının hipokampuslarındaki piramidal hücre sayılarının karşılaştırılması.

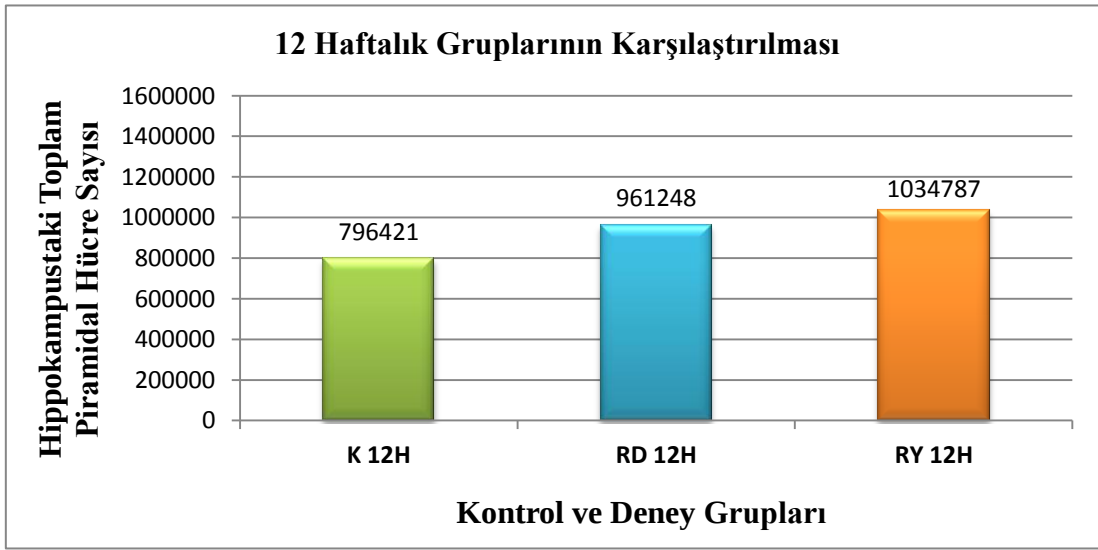
Çizelge 4.6. 4 haftalık yaş gruplarının ikili karşılaştırmalarından elde edilen p değerleri.

4 Haftalık Grupları	p Değerleri
K4H – RD4H	0,251
K4H - RY4H	0,009*
RD4H - RY4H	0,076

*Fark önemli $p < 0,016$

4.3.3. 12 Haftalık grupların karşılaştırılması

12H'lık gruplarına ait beyin dokularının hipokampuslarının CA bölgesinin stereolojik olarak hesaplamalarından elde edilen toplam piramidal hücre sayıları şekil 4.15'de gösterildi. Yapılan istatistiksel analizler ile gruplar arası ikili karşılaştırma sonucunda, K12H ile RD12H ($p=0,016$) grupları arasında ve RD12H ve RY12H ($p=0,251$) grupları arasında anlamlı bir fark tespit edilmedi. Bununla beraber RY12H grubundaki nöron sayısında K12H grubuna göre bir artış olduğu ve bu artışın istatistiksel olarak önemli olduğu bulundu ($0,009^*$) (Çizelge 4.7).



Şekil 4.15. 12 haftalık yaş gruplarına ait beyin dokularının hipokampuslarındaki piramidal hücre sayılarının karşılaştırılması.

Çizelge 4.7. 12 haftalık yaş gruplarının ikili karşılaştırmalarından elde edilen p değerleri.

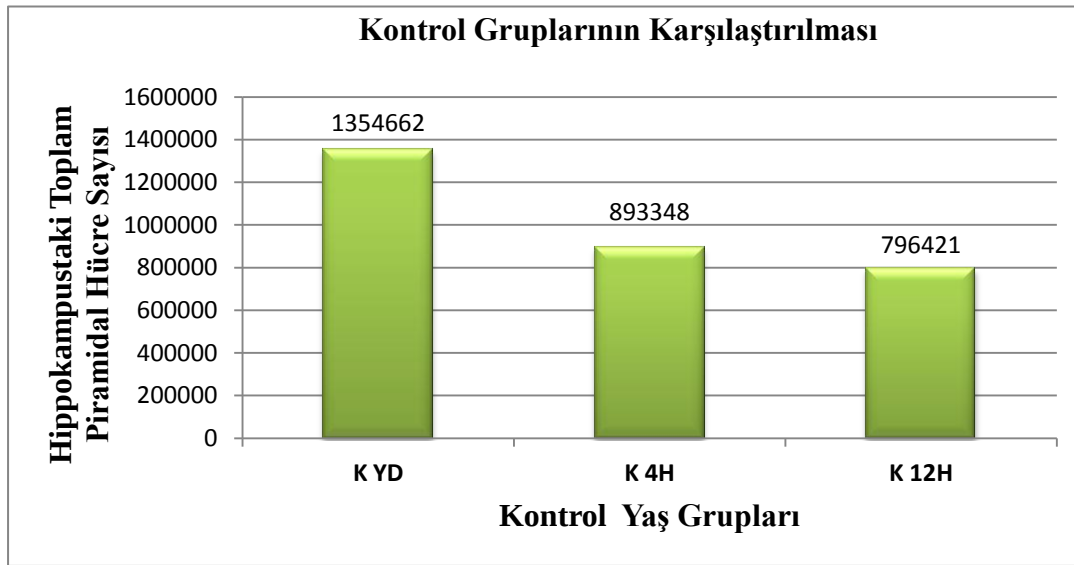
12 Haftalık Grupları	p Değerleri
K12H – RD12H	0,016
K12H - RY12H	0,009*
RD12H - RY12H	0,251

*Fark önemli $p<0,016$

4.3.4. Kontrol yaş gruplarının kendi içerisinde karşılaştırılması

Kontrol yaş gruplarına ait beyin dokularının hipokampuslarının CA bölgesinin stereolojik olarak hesaplamalarından elde edilen toplam piramidal hücre sayıları şekil 4.16'da gösterildi. Yapılan istatistiksel analizler ile gruplar arası ikili karşılaştırma sonucunda; KYD grubundaki nöron sayısının K4H (0,009*) ve K12H gruplarındaki nöron sayısından fazla olduğu (0,009*) ve bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi. K4H ve K12H gruplarının ikili karşılaştırılmasında ise; iki grup arasında önemli bir fark olmadığı tespit edildi (0,047) (Çizelge 4.8).

Şekil 4.16. Tüm kontrol yaş gruplarına ait beyin dokularının hipokampuslarındaki piramidal hücre sayılarının karşılaştırılması.



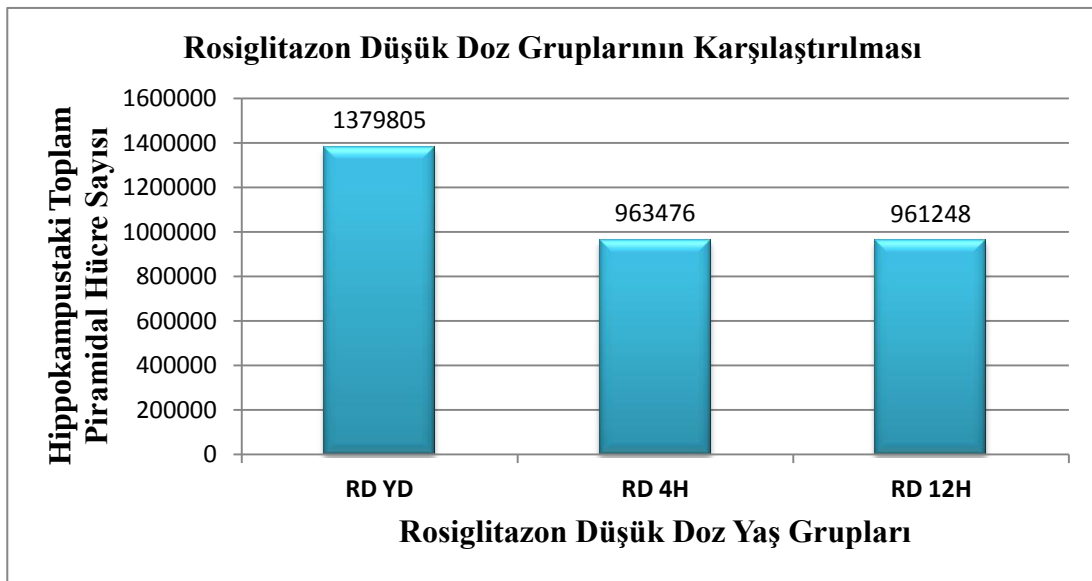
Çizelge 4.8. Tüm kontrol yaş gruplarının ikili karşılaştırılmasından elde edilen pdeğerleri.

Kontrol Grupları	p DEĞERLERİ
KYD – K4H	0,009*
KYD - K12H	0,009*
K4H - K12H	0,047

*Fark önemli p<0,016

4.3.5. Rosiglitazon düşük doz yaş gruplarının kendi içerisinde karşılaştırılması

Rosiglitazon düşük doz yaş gruplarına ait beyin dokularının hipokampuslarının CA bölgesinin stereolojik olarak hesaplamalarından elde edilen toplam piramidal hücre sayıları şekil 4.17’de gösterildi. RDYD grubundaki toplam piramidal hücre sayısının RD4H ve RD12H gruplarındakinden fazla olduğu görüldü. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda; RDYD ile RD4H grupları arasında (0,009*) ve RDYD ile RD12H grupları arasında (0,009*) anlamlı fark olduğu belirlendi. Bununla beraber RD4H ve RD12H grupları arasında (0,754) önemli bir farklılığın olmadığı tespit edildi (Çizelge 4.9).



Şekil 4.17. Tüm rosiglitazon düşük doz yaş gruplarına ait beyin dokularının hipokampuslarındaki piramidal hücre sayılarının karşılaştırılması.

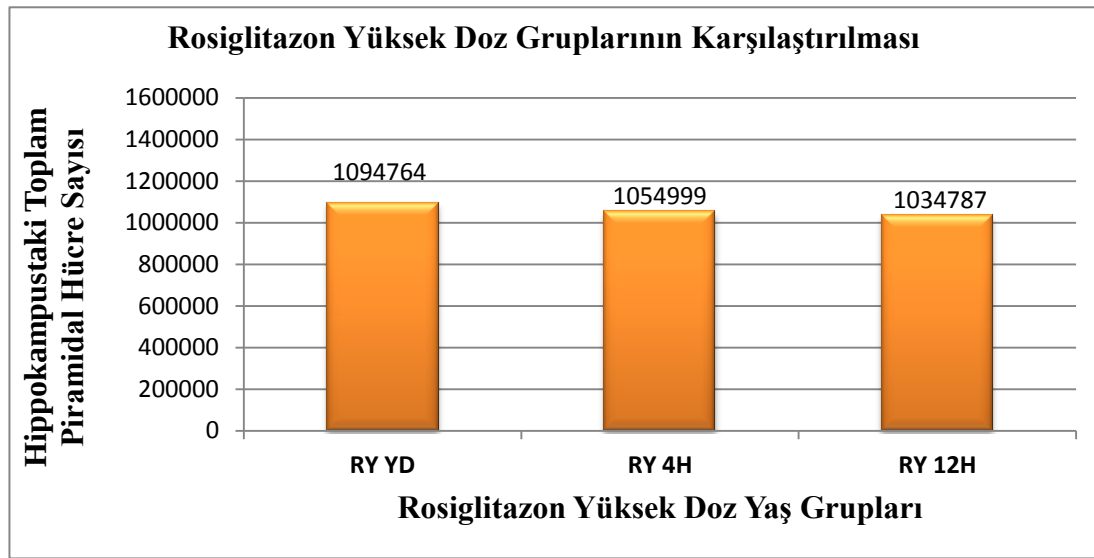
Çizelge 4.9. Tüm rosiglitazon düşük doz yaş gruplarının ikili karşılaştırmalarından elde edilen p değerleri.

Rosiglitazon Düşük Doz Grupları	p DEĞERLERİ
RDYD – RD4H	0,009*
RDYD - RD12H	0,009*
RD4H – RD12H	0,754

*Fark önemli p<0,016

4.3.6. Rosiglitazon yüksek doz yaş gruplarının kendi içerisinde karşılaştırılması

Rosiglitazon yüksek doz yaş gruplarına ait beyin dokularının hipokampuslarının CA bölgesinin stereolojik olarak hesaplamalarından elde edilen toplam piramidal hücre sayıları şekil 4.18’de gösterildi. RYYD, RY4H ve RY12H gruplarında toplam piramidal hücre sayılarına bakıldığında giderek azalan bir grafik çıkmasına rağmen gruplar arasında Kruskal-Wallis testi sonucunda anlamlı bir farklılığın olmadığı tespit edildi (Çizelge 4.10). Bu nedenle bu grupta ikili karşılaştırma için istatistiksel analiz yapılmadı.



Şekil 4.18. Tüm rosiglitazon yüksek doz yaş gruplarına ait beyin dokularının hipokampuslarındaki piramidal hücre sayılarının karşılaştırılması.

Çizelge 4.10. Tüm rosiglitazon yüksek doz yaş gruplarının gruplar arası karşılaştırmalarından elde edilen p değeri.

Rosiglitazon Yüksek Doz Grupları	p DEĞERLERİ
RYYD-RY4H-RY12H	0,512

*Fark önemli $p < 0,05$

5. TARTIŞMA

Tiazolidinedionlar (TZD) tip 2 diyabetin tedavisinde kullanılan insülin duyarlılaştırıcı ajanlardır. İnsülin direncini azaltarak glisemik kontrolü sağlarlar. Bu bileşikler ortak olarak bir tiyazolidin-2-4-dion yapısına sahiptir ve her birinin farklı bir yan zinciri vardır (Hardy ve Jabbour, 2004). TZD'ler lipofilik olduklarından çekirdeğe girebilirler ve peroksizom proliferatör aktive edici reseptör gamma'ya (PPAR γ) bağlanır ve onu aktive ederler; PPAR γ agonisti gibi davranırlar (Day, 1999).

Tiazolidinedion ailesinin kullanımda olan iki üyesi vardır. Bunlar rosiglitazon ve pioglitazondur. FDA'nın 2010 yılında yayınladığı raporda rosiglitazonun kalp krizi ve kardiyovasküler hastalıklara bağlı ölüm riskini arttırdığı belirtilmiştir. Bu nedenle Türkiye' de rosiglitazon içeren ilaçlar piyasadan çekilmiştir. Amerika' da ise bazı kısıtlamalarla birlikte klinik kullanımına devam edilmektedir. Bununla beraber gebelikte kullanımları ile ilgili yeterli araştırma ve bilgi olmadığı için de FDA tarafından oluşturulan risk sınıflandırmasında, C kategorisine girmektedirler (Sawicki ve Glod, 2004).

Gebelikte rosiglitazon kullanımının güvenilirliğiyle ilgili yapılan çalışmaların yanında rosiglitazonun henüz tam olarak açıklanamamış olan etki mekanizmasını araştırmak amacıyla onun agonist olarak işlev gördüğü peroksizom proliferatör ile aktive olan reseptörlerle (PPAR'lar) ilgili de çalışmalar yapılmıştır (Heneka ve Landreth, 2007).

PPAR'ların fizyolojik ve patofizyolojik süreçlerdeki biyolojisi, öncelikle periferik organ ve dokularda çalışılmıştır. Son yıllarda, PPAR'ların çeşitli merkezi sinir sistemi (MSS) hastalıklarının patogeneğinde önemli bir rol oynadığı da belirlenmiştir (Heneka ve Landreth, 2007).

Birçok araştırmacının nörodejenaratif hastalıklara karşı PPAR γ agonistlerinin nörokoruyucu etkileri üzerine odaklandığı, ancak PPAR γ agonistlerinin, nörogenesis üzerine etkileriyle ilgili sadece bir kaç çalışmanın olduğu görülmüştür. Bu arada, rosiglitazon ile yapılan histolojik ve moleküler çalışmaların hepsinin kalitatif olduğu, bu konuda yapılmış bir kantitatif çalışmanın olmadığı gözlemlendi. Bu nedenle bu

çalışmada metot olarak, güvenilirliğinin oldukça yüksek olduğu bilinen stereolojik metotlardan ‘optik parçalama’ metodu seçildi.

Çalışmada yöntem olarak seçilen stereoloji; hacim, yüzey alanı, sayı ve uzunluk gibi bir çok önemli sayısal değere ulaşılabilmeyi sağlamaktadır (Weibel, 1969; Gundersen, 1986; Gundersen, 1988a; Gundersen, 1988b; Cruz-Orive ve Weibel, 1990; Mayhew, 1992). İlgilenilen biyolojik bir yapının stereolojik metotlarla analizi sonucu elde edilen sonuçların güvenilir olduğu birçok araştırmacı tarafından ifade edilmiştir (Cruz-Orive ve Weibel, 1990; West, 1993; Oorschot, 1994; West, 1994). Stereolojik metotların katı kurallarla belirlenmiş ilkelerinin olması ve örnekleme tarzında sistematik örnekleme yönteminin kullanılması, elde edilen verilerin değerlendirilmesinde matematiksel doğruluğu ispatlanmış özel formüllerden yararlanılması bu metodun güvenilirliğini artırmaktadır (Mayhew, 1996; Mayhew ve Gundersen, 1996; Cruz-Orive, 1997).

Bu çalışmada; TZD ailesinin bir üyesi olan ve bir PPAR- γ agonisti olduğu bilinen rosiglitazonun, prenatal dönemde uygulanmasının postnatal dönemde hipokampustaki piramidal hücre sayısı üzerine etkileri, histokimyasal ve stereolojik sayım metotları kullanılarak araştırıldı.

Çalışmada, kontrol ve deney gruplarına ait gebe sıçanlardan elde edilen yavru sayıları kaydedilerek yenidoğan yavrularda morfolojikanomali olup olmadığı (göz, kulak, burun, ağız, uzuvlar, parmaklar, kuyruk, genital organlar; var oluşları, görünüşleri ve sayıları bakımından) çıplak gözle gözlemlenerek değerlendirildi. Rosiglitazon verilen anne sıçanlardan elde edilen yavrularla kontrol grubunda olan anne sıçanlardan elde edilen yavrular arasında hem sayı bakımından hem de morfolojileri bakımından herhangi bir farklılığın olmadığı gözlemlendi.

Klinkler ve diğ., (2006) gebelikte rosiglitazon kullanımını, blastosist gelişimi, yavru sayısı, yavru ağırlığı ve morfolojik değişiklikler açısından değerlendirmişler ve rosiglitazonun gebelikte kullanımının fare fetusunda fenotipik bir bozukluğa neden olmadığını ve in vitro fare blastosist gelişimine zarar vermediğini göstermişlerdir.

Rosiglitazonun gebelikte kullanımıyla ilgili iki hasta rapor edilmiştir. Bu raporlardan ilkinde; diyabetik ve hipertansif bir kadının, gebe olduğunun farkında olmadan ilk 7 hafta 4mg/gün rosiglitazon kullandığı ancak gebeliğinin 36. haftasında normal sağlıklı bir bebek doğurduğu bildirilmiştir (Yaris ve diğ., 2004). İkinci raporda ise; multigravid diyabetik bir kadına, gebeliğin 13. haftasına kadar herhangi bir ilaç tedavisi uygulanmayıp sadece egzersiz ve diyet uygulandığı, 13. haftadan 17.

haftaya kadar 4mg/gün rosiglitazon kullanıldığı, 17. haftada rosiglitazonun kesildiği ve insülin tedavisi başlandığı, gebe kadının gebeliğin 37. haftasında herhangi bir malformasyon olmaksızın sağlıklı bir bebek doğurduğu bildirilmiştir (Kalyoncu ve diğ., 2005).

Sıçanlarda rosiglitazon verilmesinin, erken gebelik sırasında implantasyon ve embriyo gelişimi üzerinde bir etki göstermediği fakat geç gebelikte fetal ölüm ve gelişme bozukluğuyla sonuçlandığı bildirilmiştir (Avandia, 2005).

Yukarıda belirtilen sonuçlar, bu çalışmada gözlemlenen sonuçlarla benzerlik göstermektedir. Fakat mevcut çalışmada rosiglitazon verilen dişi sıçanlardan elde edilen yavrularda herhangi bir anomalinin oluşmaması, muhtemelen ilacın gebeliğin ilk 16 günü verilmesinden veya kullanılan ilaç dozlarından kaynaklanabilir.

Bu çalışmada, yenidoğan, 4 haftalık ve 12 haftalık yaş gruplarına ait sıçanların beyinlerinden elde edilen ışık mikroskopik görüntüler, hem kendi aralarında hem de kontrol ve deney grupları arasında karşılaştırıldı. Tüm gruplardaki sıçanlara ait hipokampusların genel histolojik yapısının literatürde tanımlandığı şekilde, postnatal 1. günden itibaren CA1, CA2, CA3 ve CA4 olarak farklı alanlara bölünen *cornu ammonis* bölgesiyle birlikte *gyrus dentatus* bölgesinin nöron kümesi şeklinde olduğu görüldü. Kier ve diğ., (1997) insan fetuslarında 14-15. haftalarda CA1, CA2, CA3 bölgelerini belirgin bir şekilde gözlemlediklerini, CA4'ün ise 18-20. haftalarda tam olarak ortaya çıktığını bildirilmişlerdir. Bu sonuçlar, çalışmadan elde edilen bulgularla benzerlik göstermektedir.

Bu çalışmada tüm gruplara ait sıçanların hipokampusların *cornu ammonis* bölgelerindeki nöronların morfolojileri ışık mikroskopik olarak incelendi. Söz konusu bölgelerde yoğun olarak piramidal nöronların bulunduğu gözlemlendi. Amaral, (1978) hiler bölgede yoğun olarak piramidal nöronların bulunduğunu bildirmiştir. Bu çalışmadan elde edilen histolojik bulgular Amaral, (1978)'ın bulgularına paralellik göstermektedir.

Sıçanlarda yavrular annelerinden ayrıldıktan sonra beyinlerindeki tüm nöronların oluşumu tamamlanmış olur (Morgane ve diğ., 1978). Beynin farklı dönemlerindeki hücre bölünmesi gerek hız, gerekse sonlanma zamanı açısından farklılık gösterir. Örneğin, sıçan beyincğinde hücre bölünmesi çok hızlı olup, doğum sonrası 16-17. günlerde sona ererken; beyin sapında 15. günden sonra hücre bölünmesi gözlenmemektedir. Hipokampusta ise hücre bölünmesi çok daha erken dönemde olup, doğum sonrası 6. günde son bulmaktadır (Morgane ve diğ., 1978).

Beynin hızlı büyüme dönemi, beyindeki nöron sayısı sona erdikten sonra başlar ve bu dönemde dendritik dallanma, aksonal büyüme, sinaptogenezis, gliogenezis, miyelinizasyon, nörotransmitter ve sinir ileti sistemleri olgunlaşır (Burns, 1984). Sıçan, fare, kedi ve köpek gibi hayvanlarda uzun aksonlu nöronlar (makronöronlar) doğum öncesi dönemde gelişirken, kısa aksonlu nöronlar (mikronöronlar) doğum sonrası dönemde gelişirler (Altman ve diğ., 1970). Dolayısıyla, bu tip hayvanlarla yapılan deneysel çalışmalarda uygulanan yetersiz beslenme gibi olumsuz koşullar, eğer doğum öncesi dönemde ise makronöronları, doğum sonrası dönemde ise mikronöronları etkiler (Altman ve diğ., 1970).

Sıçanlarda, beyin hızlı büyüme döneminin tamamı doğum sonrası dönemde olduğundan, bu dönemdeki olumsuz koşullar sinaptogenezisi, gliogenezisi, miyelinizasyonu ve kapillarizasyonu etkileyebilmektedir (Burns, 1984). Dobbing (1970)'e göre; nöroenezis sıçanlarda doğum sonrası 2. günde, insanda ise hamileliğin 25. haftasında (2. trimester son bulmadan önce) tamamlanmaktadır. Daha sonra da beyin hızlı büyüme dönemi başlamaktadır ki, bu dönem, sıçanlarda doğum sonrası 25. günde; insanda ise 2. trimesterin sonunda başlar ve doğum sonrası 2. yaşa kadar sürer.

Sıçanların beyini genç ergin (90. gün) olduktan sonra da büyümeye devam etmektedir. Yapılan çalışmalarda sıçanların beyinleri ya da beyinlerinin değişik bölümlerinin 90. günden sonra da sürekli olarak ağırlık artışı gösterdiği bildirilmiştir (Morgane ve diğ., 1978; Chicurel ve Harris, 1992; Johnston ve Amaral, 1998; Duvernoy, 2005). Beyinde gözlenen bu ağırlık artışı nöron artışı olmaksızın, glia hücresi, miyelin, kolesterol, fosfolipit ve glikolipit miktarındaki artıştan kaynaklanmaktadır (Murray ve diğ., 1996).

Bu çalışmada, stereolojik sayım metotları kullanarak hipokampusta yapılan piramidal hücre sayımlarından elde edilen sayısal veriler, hem kontrol ve deney gruplarının kendi içerisindeki yaş grupları arasında, hem de yaş gruplarının kontrol ve deney grupları arasında istatistiksel olarak karşılaştırıldı. Kontrol yenidoğan (KYD) grubuna ait beyin dokularındaki hipokampusta piramidal hücre sayısının kontrol 4 haftalık (K4H) ve kontrol 12 haftalık (K12H) hayvanlarda azaldığı gözlemlendi. Elde edilen veriler literatürde belirtilen verilerle paralellik göstermektedir. Mevcut literatür bilgileri ışığında; piramidal hücre sayısının yaşla beraber azalmasının muhtemelen; nöroenezisin sıçanlarda postnatal 1. haftada

tamamlanmış olup, nöron sayısındaki artışın durarak, 1. haftadan sonra mevcut hücrelerin apoptozis mekanizması ile ölmesinden dolayı ortaya çıkmış olabilir.

Yapılan çalışmalarda, rosiglitazonun kardiyomiyositler, β -adacık hücreleri ve nöronları apoptozise karşı koruduğu ileri sürülmüştür (Linve diğ., 2005; Kilter ve diğ., 2009; Wu ve diğ., 2009). Inestrosa ve diğ., (2005) yaptıkları moleküler ve histolojik çalışmalarla, ratların hipokampal nöronlarında PPAR- γ 'nın eksprese edildiğini ve PPAR- γ agonistleri olan troglitazon, ve rosiglitazon tarafından β -amiloid nörodejenerasyonunun engellendiğini göstermişlerdir.

Collino ve diğ., (2006) serebral iskemi/reperfüzyona maruz bırakılan sıçanlarda, PPAR- γ agonistleri olan rosiglitazon ve pioglitazonun, aşırı inflamatuvar yanıtı ve oksidatif stresi engelleyerek hipokampusta koruyucu etki sergilediklerini göstermişlerdir. Mevcut çalışmada; yüksek doz rosiglitazon (5mg/kg) verilen sıçanların yavrularının hipokampuslarındaki piramidal hücre sayısında anlamlı bir değişikliğin olmaması, yukarıda açıklanan çalışmalarda da belirtilen; rosiglitazonun nöron koruyucu ve antiapoptotik etki gösterdiğini destekler niteliktedir.

Kertsen ve diğ., (2000); Bishop-Bailey ve Bystrom (2009) PPAR'ların hücre yaşamı, proliferasyon, farklılaşma ve inflamasyon gibi farklı fonksiyonlara sahip olduklarını belirtmişlerdir. Liou ve diğ., (2006) PPAR izoformlarının, oksidatif ve metabolik stres tarafından uyarılan apoptozise karşı hücreyi savunmak için oldukça önemli olduklarını, PPAR δ ve PPAR γ 'nın 14-3-3 ϵ 'nin transkripsiyonel upregülasyonu ile antiapoptotik etki gösterdiklerini bildirmişlerdir. Araştırmacıların kalitatif olarak elde ettikleri bu sonuçlar, mevcut çalışmada yüksek dozda rosiglitazon verilen gruptaki sıçan yavrularının nöron sayısının korunduğu gösteren sayısal verilerle paralellik göstermektedir.

Fuenzalida ve diğ., (2007) rosiglitazon ve diğer glitazonların Bcl-2 ekspresyonunu artırarak nöronal hayatı koruduklarını belirtmişlerdir. Loane ve diğ., (2009) 4 aylık ve 22 aylık Wistar dişi sıçanlarla yaptıkları çalışmada; deney gruplarına 8 hafta boyunca her gün 3mg/sıçan rosiglitazonu oral olarak vermişler ve bir PPAR γ agonisti olan rosiglitazonun, rosiglitazon verilen yaşlı sıçanların hipokampusunda NO ve IL-1 β üretimindeki yaşa bağlı artışı azalttığını göstermişlerdir. Ayrıca, rosiglitazonla tedavinin interleukin-4 (IL-4) mRNA'yı artırdığını bunun yanında hipokampal IL-4 konsantrasyonundaki yaşa bağlı azalışı indirgediğini belirtmişlerdir. Yapmış oldukları çalışmada rosiglitazonun, yabani tip farelerden elde edilen glialarda MHCII ve IL-1 β konsantrasyonunda LPS indüklü

artışı azaltırken, IL-4^{-/-} farelerden elde edilen glialarda ise herhangi bir etkiye neden olmadığını göstermişler ve rosiglitazonun anti-inflamatuvar etkilerini IL-4 ekspresyonundaki artış aracılığıyla gerçekleştirdiğini belirtmişlerdir. Bu çalışmadan elde edilen kantitatif sonuçlar, araştırmacıların bildirdikleri sonuçları destekler niteliktedir.

Wada ve diğ., (2006) rosiglitazonun embriyo fare beyinde ve nöral kök hücrelerde yüksek seviyede PPAR γ ekspresyonu gerçekleştiğini, PPAR γ 'nın agonistleri tarafından optimal aktivasyonunun nöral kök hücrelerin proliferasyonunu artırdığını, ancak bu hücrelerin nöronlara farklılaşmasını engellediğini belirtmişlerdir. Yüksek konsantrasyonda rosiglitazon verilerek PPAR γ 'nın aşırı aktivasyonunun ise nöral kök hücrelerin ölümüne neden olduğunu, PPAR γ agonistlerinin nöral kök hücreleri üzerinde doza bağlı tarzda bifazik etki gösterdiklerini belirtmişlerdir. Bu çalışmada, rosiglitazon düşük doz yaş gruplarına ait sıçanların hipokampuslarındaki piramidal hücre sayısı, kontrol yaş grupları ile kıyaslandığında anlamlı bir fark bulunmazken, rosiglitazon yüksek doz yenidoğan (RDYD) grubunda hücre sayısının daha az olması, rosiglitazon yüksek doz 4 haftalık (RY4H) ve rosiglitazon yüksek doz 12 haftalık (RY12H) gruplarında ise daha fazla olması, rosiglitazonun doza bağlı tarzda bifazik etki gösterdiğini belirtilen çalışmaları destekler niteliktedir.

Bu çalışmada elde edilen sayısal veriler, Wada ve diğ., (2006)'nin yapmış oldukları çalışma da dikkate alındığında, yenidoğan grubundaki nöron sayısındaki bu azalış, rosiglitazonun yüksek dozda PPAR γ 'yı aşırı aktive ederek ya doğrudan nöral kök hücrelerinde apoptozise neden olduğu ya da nöral kök hücre ölümüne neden olmasa bile mevcut hücrelerin nöronlara farklılaşmasını engellediği sonucunu desteklemektedir.

Bununla beraber, bu çalışmada RDYD grubunda piramidal hücre sayısındaki azalışa rağmen RY4H ve RY12H gruplarındaki artış, çalışmada kullanılan rosiglitazonun 5mg/kg'lık dozunun nöral kök hücrelerde apoptozisi uyarmasına karşın, nöral kök hücrelerden nörona farklılaşabilen hücrelerde ise apoptozisi engelleyerek nöron koruyucu etki gösterdiğini düşündürmektedir. Ancak bu çalışmadan elde edilen kantitatif sonuçlar, her ne kadar daha önceden bu konuda yapılmış kalitatif çalışmaları destekler nitelikte olsa da, kurulan bu hipotezin doğruluğunun gösterilebilmesi için yeni çalışmalara gereksinim vardır.

Bu çalışmadan elde edilen kantitatif sonuçlar, rosiglitazonun; gebeliğin erken dönemlerinde kullanılmasının herhangi bir morfolojik anomoliye neden olmadığını, nöronlar ve nöral kök hücreler üzerinde ise; doza bağımlı tarzda bifazik etki gösterdiğini belirten kalitatif çalışmaları desteklemektedir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

TZD ailesinin bir üyesi olan ve bir PPAR- γ agonisti olduğu bilinen rosiglitazonun, prenatal dönemde uygulanmasının postnatal dönemde hipokampustaki piramidal hücre sayısı üzerine etkilerinin, histokimyasal ve stereolojik sayım metotları kullanılarak araştırıldığı bu çalışmadan elde edilen sonuçlar ve öneriler şunlardır;

Rosiglitazon verilen anne sıçanlardan elde edilen yavrularla kontrol grubunda olan anne sıçanlardan elde edilen yavrular arasında hem sayı bakımından hem de morfolojileri bakımından herhangi bir farklılığın olmadığı gözlemlendi. Bunun nedeninin ilacın gebeliğin ilk 16 günü (erken gebelik) verilmesi veya kullanılan ilaç dozlarından olabileceği olasılığını düşünmekteyiz. Elde ettiğimiz bu verilerin, rosiglitazonun gebelikte kullanımındaki güvenilirliği ile ilgili şüpheler üzerine yapılan çalışmalara katkı sağlayacağı inancındayız.

Yapılan ışık mikroskopik değerlendirmeler sonucunda, kontrol grupları ile rosiglitazon verilmiş sıçanlardan elde edilen yavruların hipokampusları arasında genel histolojik yapı ve nöron morfolojisi açısından bir farklılığın olmadığı tespit edildi. Tüm gruplarda literatürde belirtildiği şekilde normal hipokampus yapısında olduğu gibi CA1, CA2, CA3, CA4 ve *gyrus dentatus* gözlemlendi. Hipokampus nöronlarının ökromatik çekirdekli, 1 veya 2 adet çekirdekcikli ve bazofil sitoplazmalı piramidal hücreler halinde olduğu görüldü. Yani rosiglitazonun kullandığımız dozları, hipokampusta herhangi bir patolojiye neden olmamıştır. Elde ettiğimiz bu bulguların, hipokampusun postnatal gelişimi üzerine yapılan çalışmalara katkı sağlayacağını düşünmekteyiz.

Yapılan stereolojik sayımlar sonucunda KYD grubunda hipokampustaki piramidal hücre sayısının K4H ve K12H gruplarında anlamlı bir şekilde azaldığı belirlendi. Bu azalmasının nedeni olarak; nörogenезisin sıçanlarda postnatal 1. haftada tamamlanmış olup, nöron sayısındaki artışın durarak, 1. haftadan sonra mevcut hücrelerin apoptozis mekanizması ile ölmüş olabileceği düşünmekteyiz. Çalışmada kullandığımız ve güvenilir olarak kabul gören bir metot olan stereolojik metotlarla elde ettiğimiz bu sayısal verilerin, son yıllarda üzerinde oldukça durulan,

postnatal dönemde nöroenezisile ilgili yapılan çalışmalara ışık tutacağını düşünmekteyiz.

Yüksek dozda rosiglitazon (5mg/kg) verilen gebe sıçanlardan elde edilen yavruların hipokampuslarındaki piramidal hücre sayısında yeni doğumdan, 12. haftaya kadar anlamlı bir değişiklik olmadığı tespit edildi. Elde ettiğimiz bu sonuç; daha önceden yapılmış, rosiglitazonun nöron koruyucu ve antiapoptotik etkiye sahip olduğunun gösterildiği kalitatif çalışmaları destekler niteliktedir.

RDYD, RD4H ve RD12H gruplarına ait sıçanların hipokampuslarındaki piramidal hücre sayısı, KYD, K4H ve K12H grupları ile kıyaslandığında anlamlı bir fark bulunmazken, RYYD grubunda hücre sayısının daha az olduğu, RY4H ve RY12H gruplarında ise daha fazla olduğu belirlendi. RYYD grubundaki nöron sayısındaki bu azalışın nedeninin, rosiglitazonun yüksek dozda PPAR γ 'yı aşırı aktive ederek ya doğrudan nöral kök hücrelerinde apoptozise neden olmasından ya da nöral kök hücre ölümüne neden olmasa bile mevcut hücrelerin nöronlara farklılaşmasını engellemesinden kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Sonuç olarak; bu çalışmadan elde ettiğimiz veriler doğrultusunda; rosiglitazonun gebeliğin erken dönemlerinde kullanılmasının herhangi bir morfolojik anomoliye neden olmadığını, rosiglitazonun doza bağımlı tarzda bifazik etki göstererek düşük dozlarda herhangi bir etkiye neden olmadığı halde, yüksek dozlarda nöral kök hücrelerde apoptozise neden olurken, nöronlarda koruyucu etki gösterdiğini söyleyebiliriz.

Yapmış olduğumuz literatür araştırması sonucunda, tez konumuzla ilgili kantitatif bir çalışmaya rastlamadık. Elde ettiğimiz sayısal verilerin, bugüne kadar yapılmış kalitatif çalışmaları destekler nitelikte olduğunu gösterdik. Çalışmamızın, son yıllarda üzerinde oldukça fazla araştırmanın yapıldığı rosiglitazon, PPAR'lar ve nöroenezis ile ilgili çalışmalara katkı sağlayacağı ve ileride bu konuda yapılacak çalışmalara yeni bir bakış açısı getireceğine inanmaktayız.

KAYNAKLAR

- Abercrombie M., 1946. Estimation of nuclear populations from microtomesections. *Anat Rec*, 94, 239-47.
- Aktan Z.A., 1997. Limbik sistem. *Sendrom*, 9, 65-9.
- Alarcon L.C., Sanchez-Fidalgo S., Villegas I., Motilva V., 2004. New pharmacological perspectives and therapeutic potential of PPAR-gamma agonists. *Curr Pharm Res.*, 10, 3505-3524.
- Altman J., Das G.D., Sudarshan K., 1970. The influence of nutrition on neural and behavioral development: I. Critical review of some data on the growth of the body and the brain following dietary deprivation during gestation and lactation. *Dev. Psychobiol.*, 3, 281-301.
- Amaral D.G., 1978. A Golgi study of cell types in the hilar region of the hippocampus in the rat. *J Comp Neurol*, 182, 851-914.
- Amaral D.G., Insausti R., Cowan W.M., 1984. The commissural connections of the monkey hippocampal formation. *J Comp Neurol*, 224, 307-336.
- Arıncı K., Elhan A., 2001. *Anatomi*. 3. Baskı (2. Cilt), Güneş Kitabevi, 318-93s. . Ankara.
- Aslan H., 1999. Bir ve yedi günlük civcivlerin hippokampuslarında toplam nöron sayısının optik parçalama metodu ile hesaplanması. *Uzmanlık Tezi*, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Samsun.
- Auboeuf D., Rieusset J., Fajas L., Vallier P., Frering V., Riou J.P., Staels B., Auwerx J., Laville M., Vidal H., 1997. Tissue distribution and quantification of the expression of mRNAs of peroxisome proliferator activated receptors and liver X receptor-alpha in humans: no alteration in adipose tissue of obese and NIDDM patients. *Diabetes*, 46(8), 1319-1327.
- Avandia (rosiglitazone maleate) [prescribing information], 2005. ResearchTriangle Park, NC: GlaxoSmithKline.
- Bakker M.K., Jentink J., Vroom F., Van De Berg P.B., Walle De H.F.K., De Jong Van Den Berg L.T.W., 2006. Drug prescription before, during and after pregnancy for chronic, occasional and pregnancyrelated drugs in Netherlands. *An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 113, 559-68.
- Barnea A., Nottebohm F., 1996. Recruitment and replacement of hippocampal neurons in young and adult chickadees: an addition to the theory of hippocampal learning (neurogenesis neuronal overproduction). *Neurobiology*, 93, 714-718.
- Barish G.D., 2006. Peroxisome proliferator-activated receptors and liver X receptors in atherosclerosis and immunity. *J. Nutr*, 136(3), 690-694.
- Barr M.L., Klerman J.A., 1988. *The Human nervous system*. 5th edition. Philadelphia: JB Lippincott Comp, 266-9.
- Barry M., Bannister L.H., Standring S.M., 1995. *Nervous system. Gray's Anatomy*. (Editör: P.L. Williams), 38th Edition, 1121-6s, Churchill Livingstone, London.

- Basu-Modak S., Braissant O., Escher P., Desvergne B., Honegger P., Wahli W., 1999. Peroxisome proliferator-activated receptor beta regulates acyl- CoA synthetase 2 in reaggregated rat brain cell cultures. *J. Biol. Chem.*, 274(50), 35881-35888.
- Berger J M.D., 2002. The mechanisms of action of PPARs. *Annual Review of Medicine*, 53, 409-435.
- Bernardo A., Minghetti L., 2006. PPAR-gamma agonists as regulators of microglial activation and brain inflammation. *Curr. Pharm. Des.*, 12(1), 93-109.
- Bishop-Bailey D., Bystrom J., 2009. Emerging roles of peroxisome proliferator-activated receptor- β/δ in inflammation. *Pharmacology and Therapeutics*, Vol. 124, 2, 141-150.
- Braak H., 1974. On the structure of the human archicortex. I. The cornu ammonis. A Golgi and pigment architectonic study. *Cell Tissue Res*, 152, 349-383.
- Braissant O., Foulle F., Scotto C., Dauca M., Wahli W., 1996. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat. *Endocrinology*, 137(1), 354-366.
- Braissant O., Wahli W., 1998. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha, -beta, and -gamma during rat embryonic development. *Endocrinology*, 139(6), 2748-2754.
- Brodal H., 1981. *Neurological anatomy*. Oxford University Press, 3th edition, Oxford.
- Bruemmer D., Ronald E.L., (2003). Thiazolidinedione regulation of smooth muscle cell proliferation. *Amer J Med*, 115, 87-92.
- Burns E.M., 1984. Some effects of malnutrition on synaptic systems: An intergration of morphologic neurochemical and neurophysiologic data. *Current Topics in Research on Synapses*. (Editör, D.G. Jones), Vol 2, s: 59-91, Alan R Liss, Inc., New York.
- Calkin A.C., Forbes J.M., Smith C.M., Lassila M., Cooper M.E., 2005. Rosiglitazone attenuates atherosclerosis in a model of insulin insufficiency independent of its metabolic effects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 25, 1903-1909.
- Canan S., 1997. Hipokampusun yapısı, fonksiyonları, Yüksek Lisans Semineri, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Samsun.
- Canan S., 1998. Geçici serebral iskemi sonrası civciv hipokampusunda meydana gelen nöron sayısı değişimlerinin optik fraksiyonlama yöntemi ile araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Samsun.
- Canan S., Şahin B., Odacı, E., Ünal, B., Aslan, H., Bilgiç, S., Kaplan, S., 2002a. Toplam hacim, hacim yoğunluğu ve hacim oranlarının hesaplanmasında kullanılan bir stereolojik yöntem: Cavalieri Prensibi. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi*, 22, 7-14.
- Canan S., Şahin B., Ünal B., Aslan H., Bilgiç S., Kaplan S., 2002b. Parçacıkların toplam sayısının hesaplanması için bir metot: parçalama. *Türkiye Klinikleri Tıp bilimleri Dergisi Özel Sayısı; Stereolojide Temel Kavram ve Yöntemler*, 22(1), 30-46.
- Carpenter M.B., Sutin J., 1983. *Human neuroanatomy*. Williams and Wilkins Press, 8th edition, 237s, Baltimore.
- Chan L.Y., Yeung J.H., Lau T.K., 2005. Placental transfer of rosiglitazone in the first trimester of human pregnancy. *Fertil Steril*, 83, 955-8.

- Chawla A., Repa J.J., Evans R.M., Mangelsdorf D.J., 2001. Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files. *Science*, 294(5548), 1866-1870.
- Chicurel M.E., Harris K.M., 1992. Three-dimensional analysis of the structure and composition of CA3 branched dendritic spines and their synaptic relationships with mossy fiber boutons in the rat hippocampus. *J. Comp. Neurol.*, 325, 169-182.
- Chinetti G., Fruchart J.C., Staels B., 2000. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): nuclear receptors at the cross roads between lipid metabolism and inflammation. *Inflammation Research*, 49(10), 497-505.
- Cimini A., Bernardo A., Cifone M.G., Di Marzio L., Di Loreto S., 2003. TNF α downregulates PPAR δ expression in oligodendrocyte progenitor cells: implications for demyelinating diseases. *Glia*, 41(1), 3-14.
- Cimini A., Cristiano L., Colafarina S., Benedetti E., Di Loreto S., Festuccia C., Amicarelli F., Canuto R.A., Ceru M.P., 2005. PPAR gamma dependent effects of conjugated linoleic acid on the human glioblastoma cell line (ADF). *Int. J. Cancer*, 117(6), 923-933.
- Cizkova D., Vonicky I., Gottlieb M., Marsala J., 1996. Ischemic damage in the hippocampus: a silver impregnation and immunocytochemical study in the rat. *Archives Italiennes de Biologie*, 134, 279-90.
- Coggeshall R.E., 1992. A consideration of neural counting methods. *Trends Neurosci*, 15, 9-13.
- Collino M., Aragno M., Mastrocola R., Gallicchio M., Rosa A.C., Dianzani C., Danni O., Thiemermann C., Fantozzi R., 2006. Modulation of the oxidative stress and inflammatory response by PPAR- γ agonists in the hippocampus of rats exposed to cerebral ischemia/reperfusion. *European Journal of Pharmacology*, 530, 70-80.
- Colonnier M., 1966. The structural design of the neocortex. *The brain and conscious experience*. (Editör: J.C. Eccles), Springer Verlag, Berlin.
- Cooper L.N., 1981. Distributed memory in the central nervous system : possible test of assumptions in visual cortex. *The Organisation of The Cerebral Cortex*. (Editörler: Schmitt FO, Worden FG, Adelmar G, Dennis SG) MIT Press, 2nd ed, 1981: 479-503, Cambridge.
- Cristiano L., Bernardo A., Ceru M.P., 2001. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and peroxisomes in rat cortical and cerebellar astrocytes. *J Neurocytol*, 30(8), 671-683.
- Cruz-Orive L.M., Weibel E.R., 1990. Recent stereological methods for cell biology: a brief survey. *Cell. Mol. Psysiol.*, 2, 48-56.
- Cruz-Orive L.M., 1997. Stereology of single objects. *J. Microscopy*, 186(2), 93-107.
- Cullingford T.E., Bhakoo K., Peuchen S., Dolphin C.T., Patel R., Clark J.B., 1998. Distribution of mRNAs encoding the peroxisome proliferator activated receptor alpha, beta, and gamma and the retinoid X receptor alpha, beta, and gamma in rat central nervous system. *J. Neurochem*, 70(4), 1366-1375.
- Day C., 1999. Thiazolidinediones: a new class of antidiabetic drugs. *Diabet Med*, 16, 179-92.
- Desvergne B., Wahli W., 1999. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr. Rev.*, 20(5), 649-688.
- Dobbing J., 1970. Undernutrition and the developing brain: The relevance of animal models to the human problem. *Am. J. Dis. Child.*, 120, 411.

- Duvernoy H.M., 2005. Structure, function, and connections. *The Human hippocampus: functional anatomy, vascularization and serial sections with MRI*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, s: 5-38, Germany.
- Escher P., Braissant O., Basu-Modak S., Michalik L., Wahli W., Desvergne B., 2001. Rat PPARs: quantitative analysis in adult rat tissues and regulation in fasting and refeeding. *Endocrinology*, 142(10), 4195-4202.
- Escriva H., Delaunay F., Laudet V., 2000. Ligand binding and nuclear receptor evolution. *BioEssays*, 22(8), 717-727.
- Farioli-Vecchioli S., Moreno S., Ceru M.P., 2001. Immunocytochemical localization of acyl-CoA oxidase in the rat central nervous system. *J. Neurocytol*, 30(1), 21-33.
- Förster E., Zhao S., Frotscher M., 2006. Laminating the hippocampus. *Nature Reviews Neuroscience*, 7, 259-268.
- Fuenzalida K., Quintanilla R., Ramos P., Piderit D., Fuentealba R.A., Martinez G., Inestrosa N.C., Bronfman M., 2007. Peroxisome proliferator-activated receptor up-regulates the Bcl-2 anti-apoptotic protein in neurons and induces mitochondrial stabilization and protection against oxidative stress and apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*, 282 (51), 37006–37015.
- Fukuzawa M., Satoh J., Qiang X., Miyaguchi S., Sakata Y., Nakazawa T., Ikehata F., Ohta S., Toyota T., 1999. Inhibition of tumor necrosis factor-alpha with anti-diabetic agents. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 43(3), 147-154.
- Ghisletti S., Huang W., Ogawa S., Pascual G., Lin M.E., Willson T.M., Rosenfeld M.G., Glass C.K., 2007. Parallel Sumoylation-dependent pathways mediate gene- and signal-specific transrepression by LXRs and PPAR gamma. *Mol. Cell*, 25(1), 57-70.
- Gould E., Reeves A.J., Fallah M., Tanapat P., Gross C.G., Fuchs E., 1999. Hippocampal neurogenesis in adult old world primates. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 96, 5263–67.
- Gökhan N., Çavuşoğlu H., 1989. Serebral korteks ve beyin entelektüel fonksiyonları. *Tıbbi Fizyoloji (Çeviri)’de*, 3. Baskı, Nobel Yayınevi, 935-952s, İstanbul.
- Green J.D., Shimamoto T., 1953. Hippocampal seizures and their propagation. *Arch Neurol Psychiatry*, 70, 687-702.
- Green J.D., 1960. The Hippocampus. *Handbook of physiology* (Editör: J. Field) (1st Ed). American Physiological Society, 2, s: 1373-89, Washington.
- Gundersen H.J.G., 1977. Notes on the estimation of the numerical density of arbitrary particles: the edge effect. *J. Microscopy*, 111, 219–223.
- Gundersen H.J.G., 1986. Stereology of arbitrary particles. *J Microsc*, 143, 3-45.
- Gundersen H.J.G., Jensen E.B., 1987. The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *J. Microsc.*, 147, 229-63.
- Gundersen H.J.G., Bagger P., Bendtsen T.F., Evans S.M., Korbo L., Marcussen N., Moller A., Nielsen K., Nyengaard J.R., Pakkenberg B., Soransen F.B., Vesterby A., West M.J., 1988a. The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator, and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS*, 96, 857–81.
- Gundersen H.J.G., Bendtsen T.F., Korbo L., Marcussen N., Moller A., Nielsen K., Nyengaard J.R., Pakkenberg B., Soransen F.B., Vesterby A., West M.J., 1988b. Some new, simple, and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS*, 96, 379–94.

- Gundersen H.J.G., Jensen E.B., Kieu K., Nielsen J., 1999. The efficiency of systematic sampling in stereology-reconsidered. *J. Microsc.*, 193, 199-211.
- Guyton A.C., 1987. *Textbook of medical physiology*. Merck Yayıncılık, Türkçe 1. Baskı, 980-1s, İstanbul.
- Hardy Y.E., Jabbour S.A., 2004. Tip 2 diyabetin patogenezi, *Textbook of type 2diabetes* (Editörler: B.J. Goldstein, D. Müler-Wieland (Türkçe Çevirisi) 1. Baskı AND Yayıncılık s: 117-130, İstanbul.
- Haug H., 1986. History of neuromorphometry. *J Neurosci Methods*, 18, 1-17.
- Heneka M.T., Klockgether T., Feinstein D.L., 2000. Peroxisome proliferator activated receptor-gamma ligands reduce neuronal inducible nitric oxide synthase expression and cell death in vivo. *J. Neurosci*, 20(18), 6862-6867.
- Heneka M. T., Landreth G. E., 2007. PPARs in the brain. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1771 (8), 1031–1045.
- Ho T.C., Chen S.L., Yang Y.C., Liao C.L., Cheng H.C., Tsao Y.P., 2007. PEDF induces p53-mediated apoptosis through PPAR gamma signaling in human umbilical vein endothelialCells. *Cardiovascular Research*, 76, (2), 213–223.
- Howard G., O'Leary D.H., Zaccaro D., Haffner S., Rewers M., Hamman R., 1996. Insulin sensitivity and atherosclerosis. The Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS) Investigators. *Circulation*, 93 (10), 1809-1817.
- Howard C.V., Reed M.G., 1998. *Unbiased Stereology: Three dimensional measurement inmicoscopy*, BIOS Scientific Publishers Limited, Oxford.
- Inestrosa N.C., Godoy J.A., Quintanilla R.A., Koenig C.S., Bronfman M., 2005. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma is expressed in hippocampal neurons and its activation prevents beta-amyloid neurodegeneration: role of Wnt signaling. *Exp. Cell Res*, 304(1), 91-104.
- İşgen A., 2009. Civcivlerde değişik sürelerle uygulanan iskeminin hipokampusun hacmi, toplam nöron sayısı ve öğrenme davranışı üzerine olan etkisinin stereolojik metotlarla araştırılması, Uzmanlık Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Samsun, 236486.
- Johnston D., Amaral D.G., 1998. Hippocampus. The synaptic organization of the brain. (Editör: G.M. Shepherd), 4. Baskı, s. 417-458, Oxford University Press, New York.
- Jones D.C., Daynes R.A., 2002. The nuclear hormone receptor PPAR alpha's ability to control T-bet transcription is due to its ability to regulate redox homeostasis within T cells. *FASEB J.*, 16A, 700.
- Kalkan Y., 2009. Sıçan yenidoğan ve erişkinlerde hipokampus gelişiminde nöron sayısının cinsiyete ve dönemlere bağlı olarak hesaplanması (Bir stereolojik ve histolojik çalışma), Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Erzurum, 248468.
- Kalyoncu N.I., Yaris F., Ulku C., Kadioglu M., Kesim M., Unsal M., Dikici M., Yaris E., 2005. A case of rosiglitazone exposure in the second trimester of pregnancy. *Reprod Toxicol*, 19, 563-4.
- Kandel E.R., 1979. Cellular insinghts into behavior and learning. In *The Harvey Lectures*, Academic Press Inc, 73, 19-92, New York.
- Kandel E.R., Schwartz J.H., Jessel T.M., 2000. *Principles of neural science* .4th edt, Mc Graww-Hill Comp, 1233s, New York.
- Keller J.M., Collet P., Bianchi A., Huin C., Bouillaud-Kremarik P., Becuwe P., Schohn H., Domenjoud L., Dauca M., 2000. Implications of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARS) in development, cell life status and disease. *Int. J. Dev. Biol.*, 44(5), 429-442.

- Kersten S., Wahli W., 2000. Peroxisome proliferator activated receptor agonists. *EXS*, 89, 141-151.
- Kersten S., Desvergne B., Wahli W., 2000. Roles of PPARs in health and disease. *Nature*, 405(6785), 421-424.
- Kier E.L., Kim J.H., Fulbright R.K., Bronen R.A., 1997. Embryology of the human fetal hippocampus: MR Imaging, Anatomy, and Histology. *Am J Neuroradiol* , (18) 525-532.
- Kilter H., Werner M., Roggia C., Reil J.C., Schafers H.J., Kintscher U., Bohm M., 2009. The PPAR- γ agonist rosiglitazone facilitates Akt rephosphorylation and inhibits apoptosis in cardiomyocytes during hypoxia/reoxygenation. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 11, (11), 1060-1067.
- Klinkner D.B., Lim H.J., Strawn Jr E.Y., Oldham K.T., Sander T.L., 2006. An in vivo murine model of rosiglitazone use in pregnancy. *Fertility and Sterility*. 86, (3), 1074 -9.
- Krey G., Braissant O., L'Horset F., Kalkhoven E., Perroud M., Parker M.G., Wahli W., 1997. Fatty acids, eicosanoids, and hypolipidemic agents identified as ligands of peroxisome proliferator-activated receptors by coactivator-dependent receptor ligand assay. *Mol. Endocrinol*, 11(6), 779-791.
- Lin C.Y., Gurlo T., Haataja L., Hsueh W.A., Butler P.C., 2005. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor- γ by rosiglitazone protects human islet cells against human islet amyloid polypeptide toxicity by a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 90, (12) 6678-6686.
- Liou J.Y., Lee S., Ghelani D., Matijevic-Aleksic N., Wu K.K., 2006. Protection of endothelial survival by peroxisome proliferator-activated receptor- δ mediated 14-3-3 upregulation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 26(7), 1481-1487.
- Loane D.J., Deighan B.F., Clarke R.M., Griffin R.J., Lynch A.M., Lynch M.A., 2009. Interleukin-4 mediates the neuroprotective effects of rosiglitazone in the aged brain. *Neurobiology of Aging*, 30, 920-931.
- Marx N., Duez H., Fruchart J.C., Staels B., 2004. Peroxisome proliferator-activated receptors and atherogenesis: regulators of gene expression in vascular cells. *Circulation Research*, 94 (9), 1168-1178.
- Mayer A., 1971. *Historical aspects of cerebral anatomy*. Oxford University Press, 2nd edition, 230s, London.
- Mayhew T.M., 1992. A review of recent advances in stereology for quantifying neural structure. *J. Neurocytol.*, 21, 313-328.
- Mayhew T.M., 1996. Invited Review: adaptive remodelling of intestinal epithelium assessed using stereology: correlation of single cell and whole organ data with nutrient transport. *Histol. Histopathol.*, 11, 729-741.
- Mayhew T.M., Gundersen H.J.G., 1996. If you assume, you can make an ass out of you and me: a decade of the disector for stereological counting of particles in 3D space. *J. Anat.*, 188, 1-15.
- Michalik L., Auwerx J., Berger J.P., Chatterjee V.K., Glass C.K., Gonzalez F.J., Grimaldi P.A., Kadowaki T., Lazar M.A., O'Rahilly S., Palmer C.N.A., Plutzky J., Reddy J.K., Spiegelman B.M., Staels B., Wahli W., 2006. International Union of Pharmacology. LXI. Peroxisome proliferator activated receptors. *Pharmacol. Rev.*, 58(4), 726-741.
- Moore K.L., Persaud T.V.N., 1998. *The developing human*. 6th edition, Philadelphia: WB Saunders Company, 477s.

- Moore K.J., Rosen E.D., Fitzgerald M.L., Rando F., Andersson L.P., Altshuler D., 2001. The role of PPAR-gamma in macrophage differentiation and cholesterol uptake. *Nature Medicine*, 7 (1), 41-47.
- Moore T.R., 1999. Diabetes in pregnancy. In: editörler Creasy RK, Resnik R, *Maternal Fetal Medicine*. Philadelphia, PA: Saunders, s: 964-5.
- Moreno S., Farioli-Vecchioli S., Ceru M.P., 2004. Immunolocalization of peroxisome proliferator-activated receptors and retinoid X receptors in the adult rat CNS. *Neuroscience*, 123(1), 131-145.
- Morgane P.J., Miller M., Kemper T., Stern W., Forbes W., 1978. The effects of protein malnutrition on the developing central nervous system in the rat. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, Vol 2, 137-230.
- Mukherjee R., Jow L., Croston G.E., Paterniti J.R., 1997. Identification, characterization, and tissue distribution of human peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) isoforms PPAR gamma2 versus PPAR gamma1 and activation with retinoid X receptor agonists and antagonists. *J. Biol. Chem.*, 272(12), 8071-8076.
- Murray R.K., Granner D.K., Mayes P.A., Rodwell V.W., 1996. *Harper's biochemistry*, 24. Baskı, s: 294, Appleton & Lange, Stamford, CT.
- Nolte J., 1988. *The Human Brain: An Introduction to its functional anatomy*. 2nd edition, Toronto: C V Mosby Company.
- Ogawa S., Lozach J., Benner C., Pascual G., Tangirala R.K., Westin S., Hoffmann A., Subramaniam S., David M., Rosenfeld M.G., Glass C.K., 2005. Molecular determinants of cross talk between nuclear receptors and toll like receptors. *Cell*, 122(5), 707-721.
- O'keefe J., Coway D.H., 1978. Hippocampal place units in the freely moving rat. in: why they fire where they fire? *Exp Brain Res*, 31, 573-90.
- Okura T., Nakamura M., Takata Y., Watanabe S., Kitami Y., Hiwada K., 2000. Troglitazone induces apoptosis via the p53 and Gadd45 pathway in vascular smooth muscle cells. *European Journal of Pharmacology*, 407, (3), 227-235.
- Oorschot D.E., 1994. Are you using neuronal densities, synaptic densities or neurochemical densities as your definitive date? There is a better way to go. *Prog. Neurobiol.*, 44, 233-274.
- Özser G.K., 2012. Rosiglitazon'un kontrollü salım sağlayan preparatlarının formülasyonu ve optimizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 301467.
- Palmer C.N., Hsu M.H., Griffin K.J., Raucy J.L., Johnson E.F., 1998. Peroxisome proliferator activated receptor-alpha expression in human liver. *Mol. Pharmacol.*, 53(1), 14-22.
- Park K.S., Lee R.D., Kang S.K., Han S.Y., Park K.L., Yang K.H., Song Y.S., Park H.J., Lee Y.M., Yun Y.P., Oh K.W., Kim D.J., Yun Y.W., Hwang S.J., Lee S.E., Hong J.T., 2004. Neuronal differentiation of embryonic midbrain cells by upregulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma via the JNK-dependent pathway. *Exp. Cell Res.*, 297(2), 424-433.
- Physicians Desk Reference (PDR), 2005. Takeda Pharm.America, Inc. 59ed Actos.
- Raisman G., Covan W.M., Powell T.P.S., 1965. The extrinsic afferent, commissural and association of the hippocampus. *Brain*, 88, 963.
- Royet J.P., 1991. Stereology: a method for analysing images. *Progress Neurobiol.*, 37, 433-474.
- Sadler T.W., 1993. *Langman's medikal embriyoloji*. Başaklar C (Çeviren), Palme Yayıncılık, 262-356s, Ankara.

- Sadler T.W., 1996. Medikal embriyoloji. Ed. Başaklar C. 7. Baskı, Palme Yayıncılık, 358-394s, Ankara.
- Saluja I., Granneman J.G., Skoff R.P., 2001. PPAR delta agonists stimulate oligodendrocyte differentiation in tissue culture. *Glia* 33(3), 191-204.
- Sawicki W., Glod J., 2004. Preparation of floating pellets with verapamil hydrochloride. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 61 (3), 185-190.
- Scanlon V.C., Sanders T., 2006. Essentials of anatomy and physiology. FA Davis Co; 5 edition.
- Schoonjans K., Auwerx J., 2000. Thiazolidinediones: an update. *Lancet*, 355 (9208), 1008-1010.
- Smith S.A., Monteith G.R., Robinson J.A., Venkata N.G., May F.J., Roberts-Thomson S.J., 2004. Effect of the peroxisome proliferator-activated receptor beta activator GW0742 in rat cultured cerebellar granule neurons. *J. Neurosci. Res.*, 77(2), 240-249.
- Songur A., 2001. Sıçanlarda solunan formaldehitin postnatal gelişim sürecinde formatio hippocampi üzerine etkilerinin morfolojik olarak incelenmesi, Doktora Tezi, Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Elazığ.
- Songur A., Özen O.A., Sarsılmaz M., 2001. Hipokampus. *T Klin Tıp Bilimleri*, 21, 427-31.
- Sterio D.C., 1984. The unbiased estimation of number and size of arbitrary particles using the disector. *J. Microsc.*, 134, 127-36.
- Steward O., Scoville S.A., 1976. Cells of origin of entorhinal cortical afferents to the hippocampus and fascia dentata of the rat. *J Comp Neurology*, 169, 347-370.
- Taner D., 1999. Fonksiyonel Nöroanatomi. METU Press, 2. Baskı, 231s, Ankara.
- Touretzky D.S., 2011. Anatomy of the hippocampus .Computational Models of Neural Systems Lecture 3.2, 4s.
- Taupin P., 2007. The hippocampus neurotransmission and plasticity in the nervous system. Nova Biomedical Books, 93s.
- Türkoğlu A.Ö., 2005. Formaldehitin sıçan hipokampusunda meydana getirdiği değişiklikler ve buna kafeik asit fenetil ester'in (CAPE) etkisi. Doktora tezi, Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Elazığ.
- t'Veld Bas A., Hofman A., Launer L.J., Van Duijn C.M., Stijnen T., Breteler M.M., Stricker B.H., 2001. Nonsteroidal antiinflammatory drugs and the risk of Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.*, 345, 1515-1521.
- URL-1: <http://www.answers.com/topic/rosiglitazone> (Ziyaret saati: 20 Haziran 2012).
- Ünal B., 1999. Cıvıclerde pasif sakinmanın öğrenilmesini takiben dorsolateral hipokampusta sinaps yoğunluğu ve yüksekliğinin disektör sayım metoduyla hesaplanması (Elektron mikroskopik düzeyde stereolojik bir çalışma). Doktora Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Samsun.
- Ünal B., Aslan H., Canan S., Şahin B., Kaplan S., 2002a. Biyolojik ortamlardaki objelerin sayımı yapılırken kullanılan eski (tarafı) metodların önemli hata kaynakları ve çözüm önerileri. *Türkiye Klinik Tıp Bilim Derg*, 22, 1-6.
- Ünal B., Canan S., Aslan H., Şahin B., Çataloluk O., Kaplan S., 2002b. Doku örneklerindeki obje sayılarının hesaplanmasında tarafsız stereolojik metotlar: fiziksel disektör. *Türkiye Klinik Tıp Bilim Derg*, 22, 15-24.

- Yaris F., Yaris E., Kadioglu M., Ulku C., Kesim M., Kalyoncu NI., 2004. Normal pregnancy outcome following inadvertent exposure to rosiglitazone, gliclazide, and atorvastatin in a diabetic and hypertensive woman. *Reprod Toxicol*, 18, 619-21.
- Wada K., Nakajima A., Katayama K., Kudo C., Shibuya A., Kubota N., Terauchi Y., Tachibana M., Miyoshi H., Kamisaki Y., Mayumi T., Kadowaki T., Blumberg R.S., 2006. Peroxisome proliferator-activated receptor mediated regulation of neural stem cell proliferation and differentiation. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(18), 12673–12681.
- Weibel E.R., 1969. Stereological principles for morphometry in electron microscopiccytology. *Int Rev Cytol*, 26, 235-302.
- West M.J., 1993. New stereological methods for counting neurons. *Neurobiol. Aging*, 14, 275-85.
- West M.J., 1994. Advances in the study of age-related neuron loss. *Seminars in Neuroscience*, 6, 403–411.
- West M. J., 1999. Stereological methods for estimating the total number of neurons and synapses: issues of precision and bias. *Trends. Neurosci.*, 22, 51-61.
- Wiebe S., 2000. Managing women with epilepsy. Guidline producer now need to pay attention to implemantation. *Britiss Medical Journal*, 320,3-4.
- Wieraszko A., Ball G.F., 1993. Long-term potentiation in the avian hippocampus does not require activation of the n-methyl-d-aspartame (nmda) receptor. *Synapse*, 13, 173-8.
- Williams P.L., Warwick R., Dyson M., Bannister L.H., 1989. *Gray's Anatomy*. Churchill Livigstone, Thirty Seventh Edition, 1035-1038s, London.
- Williams P.L., 1995. *Gray's anatomy*. 38. baskı, s:115–1141, Churchill Livingstone, New York.
- Willson T.M., Lambert M.H., Kliewer S.A., 2001. Peroxisome proliferator activated receptor gamma and metabolic disease. *Annu. Rev. Biochem*, 70, 341-367.
- Woods J.W., Tanen M., Figueroa D.J., Biswas C., Zycband E., Moller D.E., Austin C.P., Berger J.P., 2003. Localization of PPARdelta in murine central nervous system: expression in oligodendrocytes and neurons. *Brain Res.*, 975(1-2), 10-21.
- Wu J.S., Cheung W.M., Tsai Y.S., Chen Y.T., Fong W.H., Tsai H.D., Chen Y.C., Liou J.Y., Shyue S.K., Chen J.J., Chen Y.E., Maeda N., Wu K.K., Lin T.N., 2009. Ligand-activated peroxisome proliferator-activated receptor- γ protects against ischemic cerebral infarction and neuronal apoptosis by 14-3-3 ϵ upregulation. *Circulation*, 119, (8), 1124–1134.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Dilek SAĞIR

Doğum Yeri ve Tarihi: Samsun 01.06.1981

Adres: Ondokuz Mayıs Üniversitesi
Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü
55139 Kurupelit/ SAMSUN

E-posta: dilekk@omu.edu.tr, bio_dilek@hotmail.com

Lisans: Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü
(1999-2003) (Bölüm Birincisi)

Yüksek Lisans: Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Genel Biyoloji
Anabilim Dalı (2003-2006)

Mesleki Deneyim: Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Araştırma
görevlisi (2006-2012)