



T.C.

MARMARA ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ ANATOMİ ANABİLİM DALI

**GAD-65 VE GAD-67 TRANSJENİK FARELERDE
NUCLEUS SEPTALIS LATERALIS VE NUCLEUS
SEPTALIS MEDIALIS GABAERJİK NÖRONLARININ
ÖZELLİKLERİ**

Dr. URAL VERİMLİ

UZMANLIK TEZİ

Danışman: Prof. Dr. ÜMİT S. ŞEHİRLİ

İSTANBUL,2013



T.C.

MARMARA ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ ANATOMİ ANABİLİM DALI

**GAD-65 VE GAD-67 TRANSJENİK FARELERDE NUCLEUS
SEPTALIS LATERALIS VE NUCLEUS SEPTALIS MEDIALIS
GABAERJİK NÖRONLARININ ÖZELLİKLERİ**

Dr. URAL VERİMLİ

UZMANLIK TEZİ

Danışman: Prof. Dr. ÜMİT S. ŞEHİRLİ

İSTANBUL,2013

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	i
ÖZET.....	ii
İNGİLİZCE ÖZET (ABSTRACT).....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	iv
ŞEKİL LİSTESİ.....	v
TABLO LİSTESİ.....	vi
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. <i>Limbik Sistem</i>	3
2.1.1. <i>Limbik Sistem Tarihçesi</i>	3
2.1.2. <i>Limbik Sistem Yapıları</i>	4
2.1.3. <i>Limbik Sistem Fonksiyonel Özellikleri</i>	7
2.2. <i>Area Septalis</i>	9
2.2.1. <i>Area Septalis Anatomisi ve Lokasyonu</i>	9
2.2.2. <i>Area Septalis Afferent ve Efferent Bağlantıları</i>	16
2.2.3. <i>Area Septalis Nörokimyasal Özellikleri</i>	23
2.2.3.1. <i>Area Septalis Kolinerjik Nöronlarının Özellikleri</i>	23
2.2.3.2. <i>Area Septalis Glutamaterjik Nöronlarının Özellikleri</i>	24
2.2.3.3. <i>Area Septalis GABAerjik Nöronlarının Özellikleri</i>	24
2.2.4. <i>Area Septalis Fonksiyonel Özellikleri</i>	25
2.3. <i>γ-Amino-Butirik Asit (GABA) Genel Bilgiler</i>	27
2.3.1. <i>GABA Sentezi</i>	27
2.3.2. <i>GABAerjik Nöronların Görüntülenmesinde Kullanılan Teknikler</i>	29

2.3.3. GABAerjik Nöronların Gelişimsel Özellikleri.....	30
2.3.4. GABA Reseptörleri.....	31
2.3.4.1. GABA-A Reseptörleri.....	31
2.3.4.2. GABA-B Reseptörleri.....	34
2.3.4.3. GABA-C Reseptörleri.....	35
2.3.5. GABAerjik Nöronların Santral Sinir Sistemi Dağılımı.....	35
2.3.6. GABA'nın davranış üzerindeki muhtemel rolü.....	37
2.3.7. GABAerjik Sisteme Etkili ilaçlar ve Klinik Özellikleri.....	37
2.3.7.1. Barbituratlar.....	37
2.3.7.2. Benzodiyazepinler.....	38
2.3.7.3. Alkol	39
2.3.7.4. GABApentin ve Vigabatrin.....	39
3. ARAÇ VE YÖNTEM.....	40
3.1. Fare Beyinlerinin Temini.....	40
3.2. Fare Beyinlerinden Kesit Alma İşlemi.....	40
3.3. Elde Edilen Kesitlerin Boyanması.....	41
3.4. Kesitlerin Değerlendirilmesi.....	42
3.5. İstatistiksel İncelemeler.....	42
4. BULGULAR.....	43
4.1. Kesit Görüntüleri.....	43
4.2. İstatistik Sonuçlar.....	54
5. TARTIŞMA.....	60
6. KAYNAKLAR.....	64
7. ARAŞTIRMA ETİK KURUL ONAYI.....	68

ÖNSÖZ

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde hiçbir özveriden kaçınmayan, uzmanlık eğitimim süresince gerek bilimsel gerek sosyal alanlarda desteği ve öngörüsü sayesinde kendimi geliştirmemi sağlamış olan tez danışmanım sayın *Prof. Dr. Ümit S. Şehirli* hocama çok teşekkür ederim. Uzmanlık eğitimimde her açıdan bana destek olmuş ve tüm bilgisini paylaşmaktan çekinmemiş olan bölümümüz öğretim görevlisi sayın *Doç. Dr. N. Ömer Özdoğmuş*'a da çabalarından dolayı çok teşekkürler.

Bu çalışmanın planlama aşamasında değerli bilgilerini hiç çekinmeden paylaşmış olan Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim görevlisi sayın *Doç. Dr. Serap Şirvanlı*'ya desteği için çok teşekkürler. Çalışmanın istatistiksel hesaplarında değerli zamanını ve bilgisini benimle paylaşmış olan Klinik Farmakoloji Anabilim Dalı öğretim görevlisi sayın *Doç. Dr. Hasan Yananlı*'ya teşekkürlerimi sunarım. Deney aşamasında gönülden yardımları dolayısıyla başta Arş.Gör. *Mazhar Özkan* olmak üzere tüm çalışma arkadaşlarıma da çok teşekkürler.

Tüm eğitim hayatım boyunca hiçbir özveriden kaçınmadan, eğitimim için her imkanı sağlamış olan, mezuniyet törenimde tıp doktoru diplomamı kendisinden aldığım babam *Prof. Dr. Arif Verimli*'ye, tüm eğitim hayatım boyunca eksik hiçbir şey olmaması için herşeyinden fedakarlık eden annem *Aydan Verimli*'ye, hayatımın ilk bilimsel projesinde annemin makyaj malzemelerini kullanarak karışım hazırlamama yardım etmiş olan kardeşim *Aras Verimli*'ye, son olarak da sevgisini, desteğini hep hissettiğim, müşterek hayatımızda önceliğini her zaman benden yana kullanmış, organize olabilmeyi bana öğretmiş, bilgi ve çabasına hep hayranlık duyduğum sevgili eşim *Nihan Verimli*'ye çok ama çok teşekkür ederim.

Dr. Ural Verimli

İstanbul,2013

ÖZET

Area Septalis limbik sisteme ait bir prosencephalon bölgesidir. Limbik sistemin birçok fonksiyonunda etkin olduğu gibi epilepsi, Alzheimer Hastalığı, madde bağımlılığı ve dürtü kontrolü bozukluğu gibi durumlarda da önemli etkileri vardır. Nucleus Septalis Medialis (MS) ve Lateralis (LS) de Area Septalis içerisinde bulunan ve bahsi geçen klinik durumlarda önemli etkileri bulunan çekirdeklerdir. Literatürde bu iki çekirdeğin GABAerjik nöron dağılımlarıyla ilgili çelişkiler mevcuttur. Bu çelişkilerin başında GABA (gamma amino-butirik asit) sentezinde görevli olan GAD (glutamik asit dekarboksilaz) enziminin iki alt tipinin yoğunluk farkı gelmektedir. Literatürdeki genel kanı bu bölgelerin GABAerjik nöronlarının yoğunlukla GAD 67 alt tipini taşıdıklarıdır. Ancak GAD-65 alt tipinin nöronların terminallerinde bulunduğu ve sinaptik fonksiyonlarda rol oynayan alt tip olduğu bilinmektedir. Çalışmamızda LS ve MS açısından bu çelişkileri test etmeyi amaçladık.

Çalışmamızda GAD-65 ve GAD-67 transjenik fare beyinlerini kullanıldı. Bu beyinlerden LS ve MS içeren ardışık kesitler alındı. Kesitlerimizi transjenik modelimiz için geliştirilmiş florasan antikör özellikli anti-GFP adlı teknikle boyandı. Boyanmış kesitlerin ardışık beşte birinde GABAerjik nöron sayımı yapıldı ve sonuçların ortalamalarını unpaired two tailed t-test metoduyla GAD-65 ve GAD-67 kesitleri arasında istatistiksel olarak karşılaştırıldı. Literatürdeki genel kanının tersine GAD-65 alt tipini taşıyan nöronların her iki bölgede de daha yoğun olarak tespit edildi. Yanlış negatif boyanmayı ekarte edebilmek için beynin diğer bölgelerini incelediğimizde kortikal bölgelerde GAD-65 ve GAD-67 alt tiplerinin birbirlerine benzer şekilde boyandığını tespit edildi. Aynı alt tipi taşıyan kesitlerde sağ ve sol hemisferlerin yoğunluklarını karşılaştırdığımızda anlamlı farklılık gözlemlenmedi.

Elde ettiğimiz sonuçların ışığında temporal mezial epilepsi patogenezinde, Alzheimer Hastalığı'nın GABAerjik modülasyonunda, ödüllendirme mekanizması işleyişinde ve madde bağımlılığı patogenezinde rol oynayan GABAerjik hücrelerin yoğunlukla GAD-65 alt tipini taşıdığını düşünmekteyiz. Bahsi geçen hastalıkların ve bozuklukların temellerinin daha iyi anlaşılması ve tedavilerin düzenlenmesinde elde ettiğimiz bulguların katkı sağlayabileceğini düşünmekteyiz.

İNGİLİZCE ÖZET (ABSTRACT)

Septal Area is a limbic system structure located in the prosencephalon region containing structures such as Lateral Septal nucleus (LS) and Medial Septal nucleus (MS). This area is involved in numerous psychiatric and neurological conditions such as epilepsy and Alzheimer's Disease pathogenesis. There have been big debates in the literature regarding the GABAergic neuron distribution in this area. The main argument has been on the prominence of two GABA synthesizing glutamic acid decarboxylase (GAD) enzyme subtypes in the region. According to the literature GAD-67 subtype is more prominently observed among the GABAergic cells of LS and MS. In spite of this data it is known that GAD-65 subtype is observed in the nerve terminals and takes action in synaptic transmission. In our research we have aimed to test these debates by inspecting the GABAergic neuronal distribution differences among above explained subunits of the septal area.

We have used transgenic strain GAD-65 and GAD-67 mouse brains provided from Oxford University in our experiments. We have taken consecutive sections from areas containing the septal nuclei in these brains. Then we have stained our sections using anti-GFP labelling method which is a fluorescence antibody technique developed specifically for this transgenic model. We have counted the GABAergic neurons in every first of five consecutive sections and we have compared the means of these results among GAD-65 and GAD-67 brains using unpaired two tailed t-test. On the contrary to the main assumption in the literature, our results have shown that GAD-65 subtype neurons were more prominently observed compared to the other subtype. In order to eliminate false negative staining, we have inspected the stainings in other regions of the brain and have not found any staining differences in cortical regions of both enzyme subtypes.

According to the results we have obtained, we assume that the GABAergic neurons involved in the above mentioned conditions are prominently GAD-65 subtype containing neurons. Our assumption is that the results of our research may have implications that could serve to understand the mechanisms and pathogenesis of these several clinical conditions better and to modify the therapeutic approaches to these conditions.

SİMGELER VE KISALTMALAR

LS.....	Nucleus Septalis Lateralis
MS.....	Nucleus Septalis Medialis
LLS.....	Sol Nucleus Septalis Lateralis
RLS.....	Sağ Nucleus Septalis Lateralis
LMS.....	Sol Nucleus Septalis Medialis
RMS.....	Sağ Nucleus Septalis Medialis
GABA.....	Gamma Amino Bütirik Asit
GAD.....	Glutamik Asit Dekarboksilaz
VTA.....	Area Tegmentalis Ventralis
LC.....	Locus Ceruleus
LDT.....	Area Tegmentalis Laterodorsalis
NA.....	Nucleus Accumbens
RA.....	Raphe Nucleus
BZs.....	Benzodiyazepin
EC.....	Entorhinal Korteks
Amg.....	Amygdala
PFC.....	Cortex Prefrontalis

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.	Limbik sistem yapıları.....	3
Şekil 2a.	Papez Devresi.....	4
Şekil 2b.	Genişletilmiş Papez Devresi.....	5
Şekil 3.	Nuclei Septalis'in 3 boyutlu şekli.....	10
Şekil 4.	İnsan beyinde LS ve MS.....	11
Şekil 5.	LS'nin üç boyutlu şekli.....	12
Şekil 6.	MS'nin üç boyutlu şekli.....	13
Şekil 7.	Area Septalis'in major bağlantı yolları.....	16
Şekil 8.	Fornix precomissural lifleri.....	17
Şekil 9.	Indisium griseum, Striae Longitudinalis Lateralis ve Medialis.....	18
Şekil 10.	Stria Medullaris Thalami.....	19
Şekil 11.	LS efferent bağlantılar.....	21
Şekil 12.	LS afferent bağlantılar.....	22
Şekil 13.	GABA-A reseptörü.....	32
Şekil 14.	GABA-B reseptörü.....	34
Şekil 15a.	2X büyütmede GAD-65 area septalis boyanması.....	43
Şekil 15b.	2X büyütmede GAD-67 area septalis boyanması.....	44
Şekil 15c.	Farede area septalis lokalizasyonu.....	45
Şekil 16a.	10X büyütmede GAD-65 area septalis boyanması.....	46
Şekil 16b.	10X büyütmede GAD-67 Area Septalis boyanması.....	47
Şekil 17a.	20X büyütmede GAD-65 area septalis boyanması.....	48
Şekil 17b.	20X büyütmede GAD-67 area septalis boyanması.....	49
Şekil 18a.	60X büyütmede GAD-65 LS dorsal bölge boyanması.....	50
Şekil 18b.	60X büyütmede GAD-65 LS ventral bölge boyanması.....	51
Şekil 19a.	10X büyütmede GAD-67 korteks boyanması.....	52

Şekil 19b.	10X büyütmede GAD-65 korteks boyanması.....	53
Şekil 20.	GAD-65 ve GAD-67 LLS karşılaştırması.....	54
Şekil 21.	GAD-65 ve GAD-67 RLS karşılaştırması.....	55
Şekil 22.	GAD-65 ve GAD-67 LMS karşılaştırması.....	56
Şekil 23.	GAD-65 ve GAD-67 RMS karşılaştırması.....	57
Şekil 24.	GAD-65 LLS ve RLS karşılaştırması.....	58
Şekil 25.	GAD-65 LMS ve RMS karşılaştırması.....	59

TABLO LİSTESİ

Tablo 1.	LS rostral, kaudal, ventral bölümleri.....	15
Tablo 2.	Anti-GFP protokolü.....	41

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Birçok psikiyatrik ve nörolojik hastalığın patogeneğinde rol oynayan limbik sistem yapıları ve bu yapıların hem kendi içlerinde hem de beynin diğer merkezleriyle kurdukları bağlantılar, patogenezinde rol oynadıkları hastalıkların daha iyi anlaşılabilmesi ve tedavi seçeneklerinin geliştirilebilmesi açısından hem temel bilim çalışmalarının hem de klinik çalışmaların ilgi odağı olmuştur.

Bilim dünyası araştırmalarda kullanılan tekniklerin gelişimiyle birlikte bu yapıların mikroskopik ve moleküler düzeyde özellikleriyle ilgili bilinmeyenlere yönelmiş, hücresele ve biyokimyasal düzeyde çalışmalar hız kazanmıştır.

Bilimin gelişmesiyle limbik sistemi oluşturan yapılara yenileri eklenmiş ve bu yapıların hem yapısal özellikleri hem de fonksiyonel özellikleri ile ilgili gelişmeler birçok yeni tedavi yaklaşımına ışık tutmuştur (1).

Limbik sistem yapılarından olan area septalis de tüm bu sebeplerle araştırma konusu olmuştur. Area septalis kendi içerisinde de birçok alt birime ayrılmakta ve bu alt birimlerin hem yapısal hem de fonksiyonel özellikleri ile ilgili yeni bilgiler ortaya çıkmaktadır (2).

Area septalis'i oluşturan yapılar içerisinde LS ve MS hem yapısal hem de fonksiyonel olarak Alzheimer Hastalığı (3), epilepsi (4) ve madde bağımlılığı (1) gibi çeşitli klinik durumlarda önem arz etmektedir. Bu bölgelerde bulunan nöron tipleri ve bu nöronların sinaptik özellikleri uzun süreler araştırılmış olmakla birlikte halen günümüzde tam olarak ortaya konamamıştır. Çoğunlukla kolinerjik, GABAerjik ve glutamaterjik nöronlardan oluşan bu yapılarda öncelikli olarak GABAerjik nöronların özellikleri tam olarak anlaşılammıştır. Bunda en önemli etken diğer nörotransmitterlerden farklı olarak GABA'nın sentezinde görevli olan GAD enziminin farklı kromozomlarda kodlanmış iki alt tipinin bulunması ve bu iki alt tipin neden var olduğunun ve fonksiyon farklarının tam anlamıyla bilinmemesidir (3).

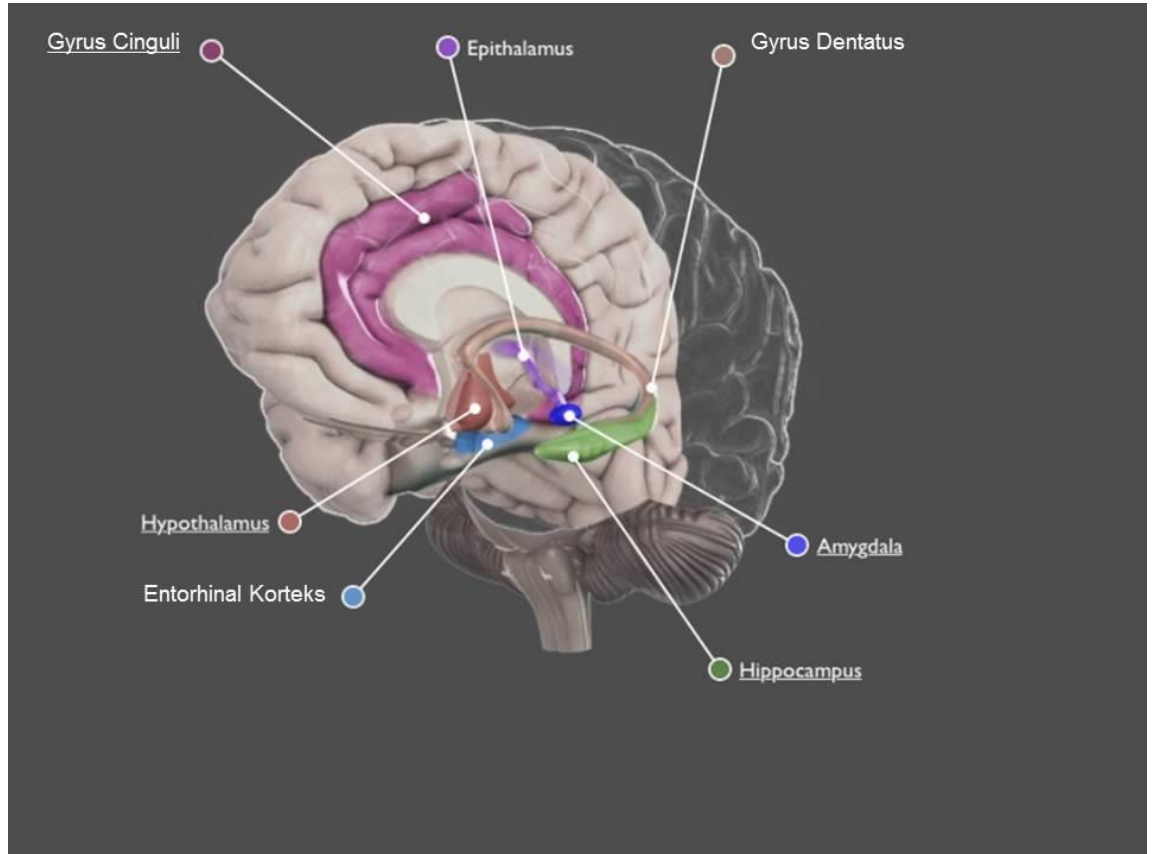
Bu çalışmanın amacı LS ve MS'deki GABAerjik nöronların GAD-65 ve GAD-67 alt tiplerinin yerleşim farklarını ortaya koymaktır.

2. GENEL BİLGİLER

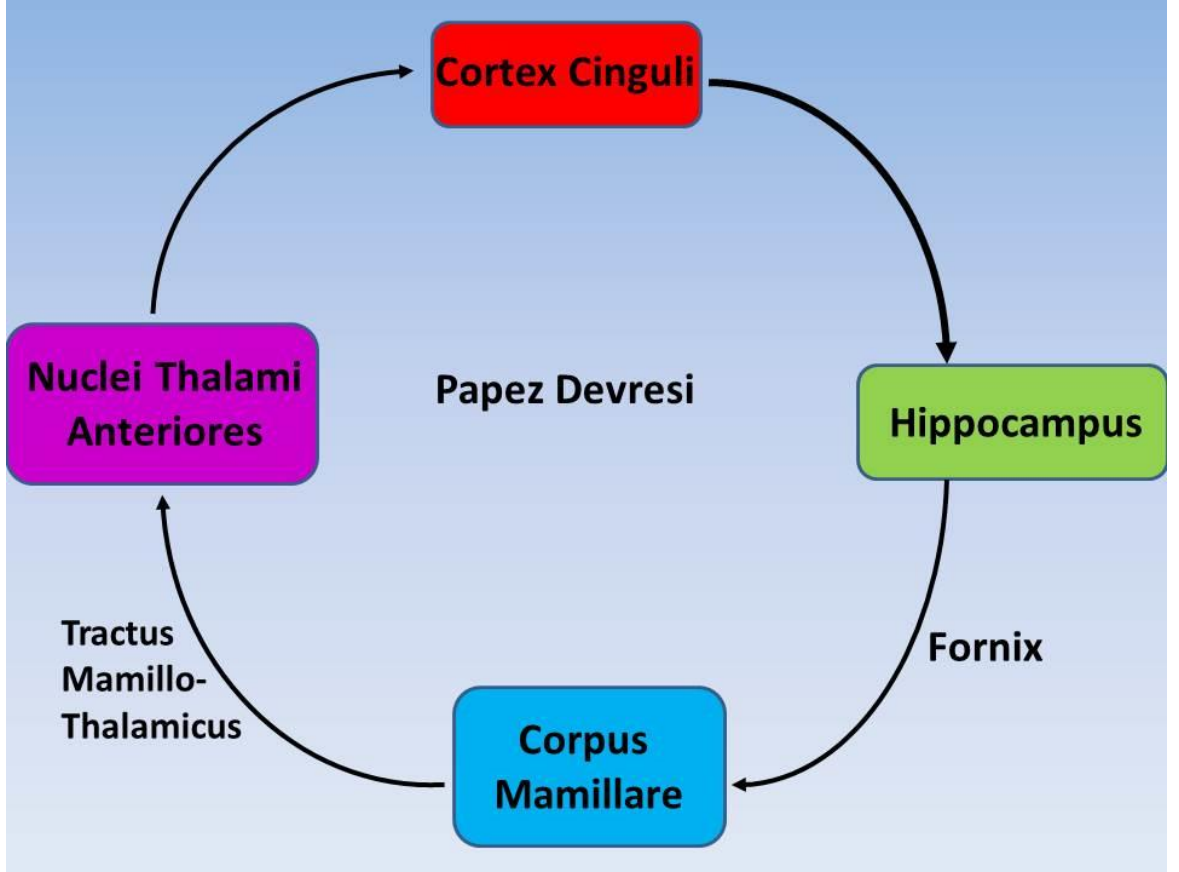
2.1. Limbik Sistem

2.1.1 Limbik Sistem Tarihçesi

“Limbik” kelimesi latince sınır anlamına gelen “limbus” kelimesinden türemiştir. Limbik sistem fikri ise ilk kez Pierre Paul Broca isimli nöroanatomist tarafından beyin sapını saran gyrus halkasını tanımlamak amacıyla ortaya atılmıştır. 1937’de ise James Papez “duygulanım”ın anatomik merkezi olarak bir sinir devresi tanımlamıştır. Papez’in tanımladığı bu sinir devresi hypothalamus, corpus mamillare, nuclei anteriores thalami, gyrus cinguli ve formatio hippocampi’den oluşmaktaydı (1) (Şekil 1) (Şekil 2a).



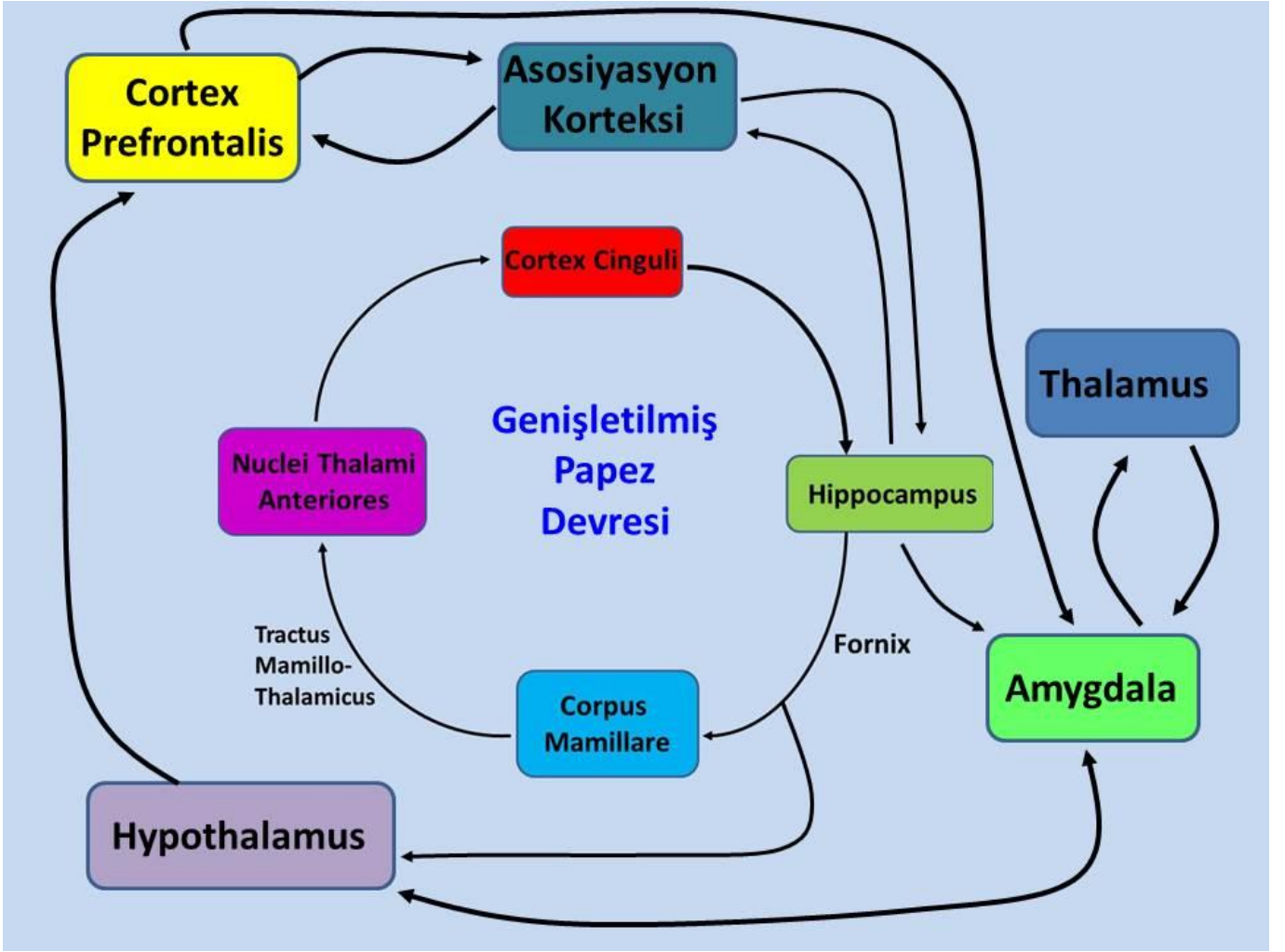
Şekil 1. Limbik Sistem yapıları. (3D Brain, DNA Learning Center, Cold Spring Harbour Laboratory uygulamasından alınmıştır.)



Şekil 2a. James Papez'in tanımladığı Papez Devresi.

2.1.2 Limbik Sistem Yapıları

Papez'in temel önermesi günümüzde kabul görse de, ortaya konan sinir devresine area septalis, nucleus accumbens ve amygdala ile orbitofrontal korteks gibi neokortikal alanlar katılmıştır (Şekil 2b). Filogenetik olarak eski olan limbik sistem yapıları evrimsel gelişim sürecinde korteks'in primitif bir varyantı olarak düşünülmektedir (1).



Şekil 2b. Genişletilmiş Papez Devresi.

Limbik lob tanımlaması diğer loblarda olduğu gibi yapısal bir tanımlama olmayıp, daha çok fonksiyonel ilişkiler sonucunda ortaya konmuş bir tanımlamadır. İçerisinde gyrus parahippocampi, gyrus cingulum, gyrus subcallosalis gibi birbirine cingulum denilen bir band ile bağlı kortikal yapılar ve hippocampus, amygdala ve septal alan gibi subkortikal yapıları barındırır. Bunlara ek olarak hippocampus'u saran gyrus parahippocampi'nin anterior kısmında bulunan entorhinal korteks gibi yapılar da limbik lob olarak tanımlanan alanın içerisinde yer alır (5).

Tüm bunlara ek olarak hypothalamus'un limbik sistemle önemli bağlantılar kurduğu ve duygulanımdaki visseral etkilerden (mide bulantısı gibi) sorumlu olduğu bilinmektedir. Nuclei anteriores thalami ve dorsomedialis'in, ventral striatum'un, area tegmentalis ventralisin ve prefrontal korteksin de limbik sistemle önemli bağlantılar kurduğu ve bu sistemin parçası olduğu bilinmektedir (6).

Amygdala da limbik sistemin önemli bir parçasıdır. Hippocampus'un hemen rostral kısmında bulunan bu yapı bir nukleus kompleksidir. Basolateral, santral ve kortikomedial çekirdek gruplarından oluşur. Basolateral grup insanda çok gelişmiştir. Temel görevinin, bir uyarıya emosyonel anlam kazandırmak olduğu düşünülmektedir. Dolayısıyla prefrontal korteks başta olmak üzere birçok kortikal alanla, hippocampus ile thalamus ile önemli bağlantılar kurar (7).

Santral grup ise genel duygusal tepkilerin oluşmasında görevli olup beyin sapı ve medulla spinalis aracılığıyla visseral tepkileri düzenlediği düşünülmektedir (5). Kortikomedial grup ise insanlarda çok gelişmemiş olup koku yolları üzerinden koku ve beslenmeyle ilgili tepkilerden sorumludur (5).

Papez'in önermesinde duygulanımın yüksek kortikal bölgelerle de ilintili olduğu ve bu sebeple hypothalamus duygulanım merkezlerinin üst kortikal alanlarla resiprokal olarak haberleştiği vurgulanmıştır (1).

Bu hipoteze göre hypothalamus duygusal enformasyonu corpus mamillare aracılığıyla gyrus cinguli'ye, tractus mamillothalamicus ile de nuclei anteriores thalami'ye iletmektedir. Korteks ise, fornix üzerinden hypothalamus ile bağlantısı olan hippocampus aracılığıyla hipotalamik fonksiyonu düzenlemektedir. Halen kabul gören bu hipoteze bilim ilerledikçe asosiyasyon korteksi, gyrus cinguli ve entorhinal korteks de katılmıştır. Hippocampus entorhinal korteks'ten subiculum içerisinde seyreden "perforan yol" (perforant path) ile ileti alır. Subiculum ise hippocampus'tan önemi uyarılar alan ve neokorteks ile resiprokal innervasyonları bulunan bir kortikal alan olarak karşımıza çıkmaktadır (8).

2.1.3. Limbik Sistem Fonksiyonel Özellikleri

Limbik sistemin anatomik yapılarının fonksiyonel özellikleri ile ilgili bilgiler genelde elektrik stimülasyon, kayıt ve ablasyon deneyleri sonucu elde edilmiştir. Örneğin hypothalamus'un emosyonel tepki üzerine etkileri ile ilgili ortaya konmuş bilgiler, deney hayvanlarında tüm cortex cerebri, nuclei basales ve thalamus'un büyük bir kısmının çıkarılması sonucu görülmektedir. Sonuç olarak hypothalamus'un stimülasyonu sonucu bu deney hayvanı "sham rage" denen öfke davranışını sergilediği ancak bu davranışın spesifik hedefe yönelik olmadığı görülmüştür. Gyrus cinguli'nin bilateral olarak çıkarıldığı maymunlarda ise, bu hayvanların aşırı derecede uysallaştığı görülmüştür (9).

Limbik sisteme ait yapıların bazı fonksiyonları birbiriyle kesişme gösterirken bazı fonksiyonlar da spesifik yapılara özeldir. Genel olarak bakıldığında limbik sistem hafıza, duygulanım, öğrenme and emosyonel davranış, motivasyon ve ödüllendirme gibi fonksiyonlardan sorumludur (5).

Hippocampus'un fonksiyonel özelliklerine bakılacak olursa, hafıza oluşturma görevinin yanı sıra diğer limbik yapılarla oluşturduğu önemli bağlantılar sebebiyle duygulanım ve viseral görevlerinin de olduğu bilinmektedir. Hafıza oluşumunda hippocampus'un gyrus parahippocampi gibi çevre yapılarla beraber çalıştığı da yaptığı bağlantılar sonucunda ortaya konmuştur (10).

Amygdala'nın fonksiyonel özelliklerine bakılacak olursa duygusal hafıza ve öğrenme, korku ve korku koşullanması ve ödüllendirme mekanizmalarında görev aldığı bilinmektedir. Daha önceden tanınmış olan bir stimulusa verilecek olan duygusal cevap, o stimulusla ilgili duygusal hafıza sonucunda ortaya çıkar. Tam burada amygdala'nın nuclei basolateralis'i stimuluslara duygusal önem veya anlam bağlamakla görevlidir. Amygdala'nın santral grup nükleusu da duygusal stimuluslara verilecek olan visseral cevapların (mide bulantısı gibi) düzenlenmesinde görevlidir (11).

Bunların dışında korku ve korku koşullanması formasyonunda amygdala'nın önemli görevleri vardır. Korku koşullanması adından da anlaşılacağı gibi koşullanmış bir duygusal reaksiyon olup, bir stimulusun (koşullanılmış stimulus) istenmeyen bir durumla bağdaştırılması sonucu oluşur. Bu tür uyarılara verilecek olan visseral yanıtlardan da santral amygdala nukleus grubu sorumludur. Bu süreçte amygdala diğer limbik yapılarla beraber çalışır. Ödüllendirme mekanizması da içinde amygdala'nın etkisinin olduğu ve madde bağımlılığında büyük önemi olan bir fonksiyondur. Ödüllendirme mekanizmasında area septalis, nucleus accumbens, amygdala, area tegmentalis ventralis gibi subkortikal alanların yanı sıra bu alanlarla sıkı bağlantılar prefrontal korteks ve korteksin his alanları gibi kortikal yapılar da görev almaktadır (5).

Limbik yapılarla ilgili klinik durumlara bakıldığında Alzheimer Hastalığı, temporal epilepsi, çeşitli amneziler ve Kluver-Bucy sendromu gibi patolojilerle karşılaşmaktadır. Temporal epilepside medial temporal loba lokalize ve bu bölgede bulunan hippocampus, amygdala ve bu bölgeyi saran kortikal alanda anormal nöral elektrik deşajları görülmektedir. Alzheimer hastalığı ve çeşitli amnezilerde de hippocampus gibi hafıza formasyonunda görevli bölgelerde kolinerjik nöron kayıplarına bağlı patolojiler görülmektedir. Bu patolojiler içerisinde en spesifik olanı ise Kluver-Bucy sendromudur (5). Bilateral amygdala lezyonunda ortaya çıkan bu klinik durum hiperfaji ve hiperseksualite ile seyreden bir patolojidir. İnme, herpes simplex ensefaliti veya lobektomilere bağlı gelişir (12).

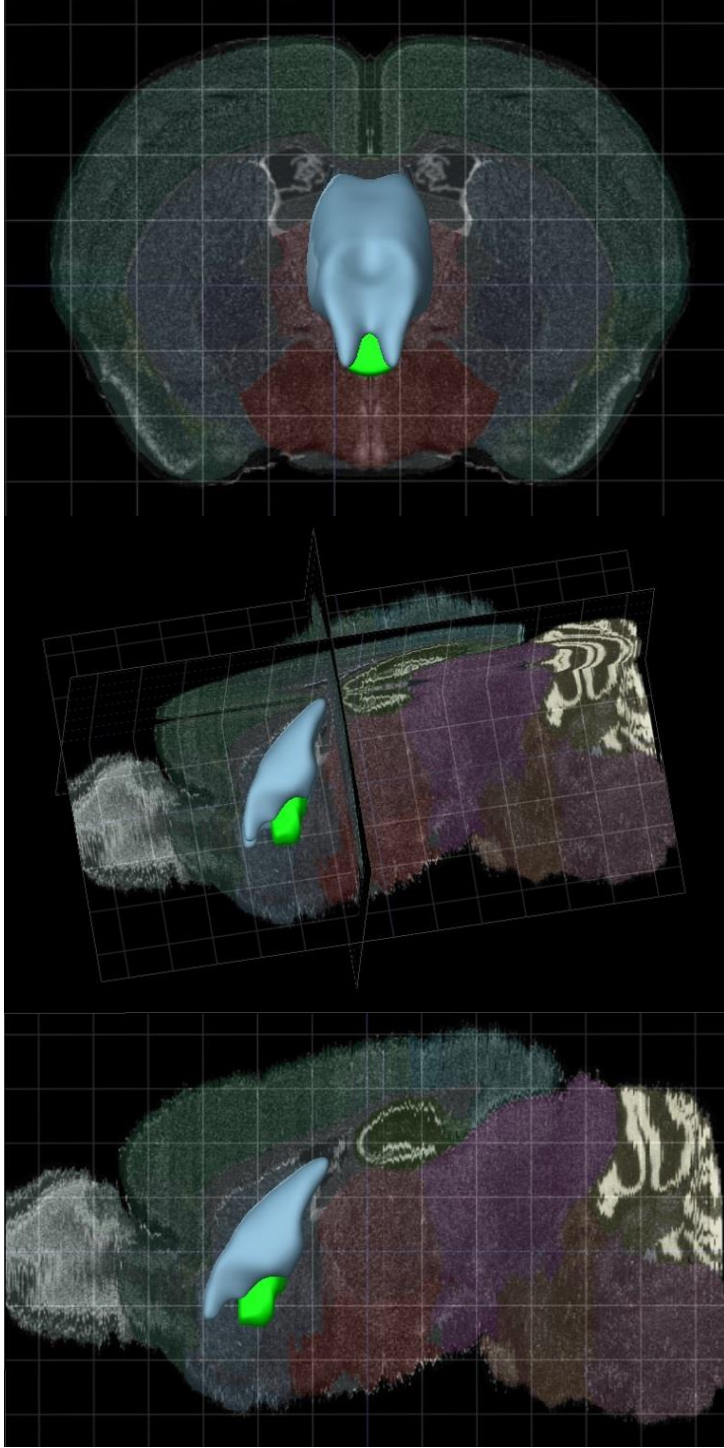
Limbik sistemin duygulanım üzerine önemi literatürde ortaya konmakla beraber, limbik sisteme katılmış ve fonksiyonları halen tam anlamıyla ortaya konamamış birçok yapı vardır. Area septalis de bunlardan birisidir.

2.2 Area Septalis

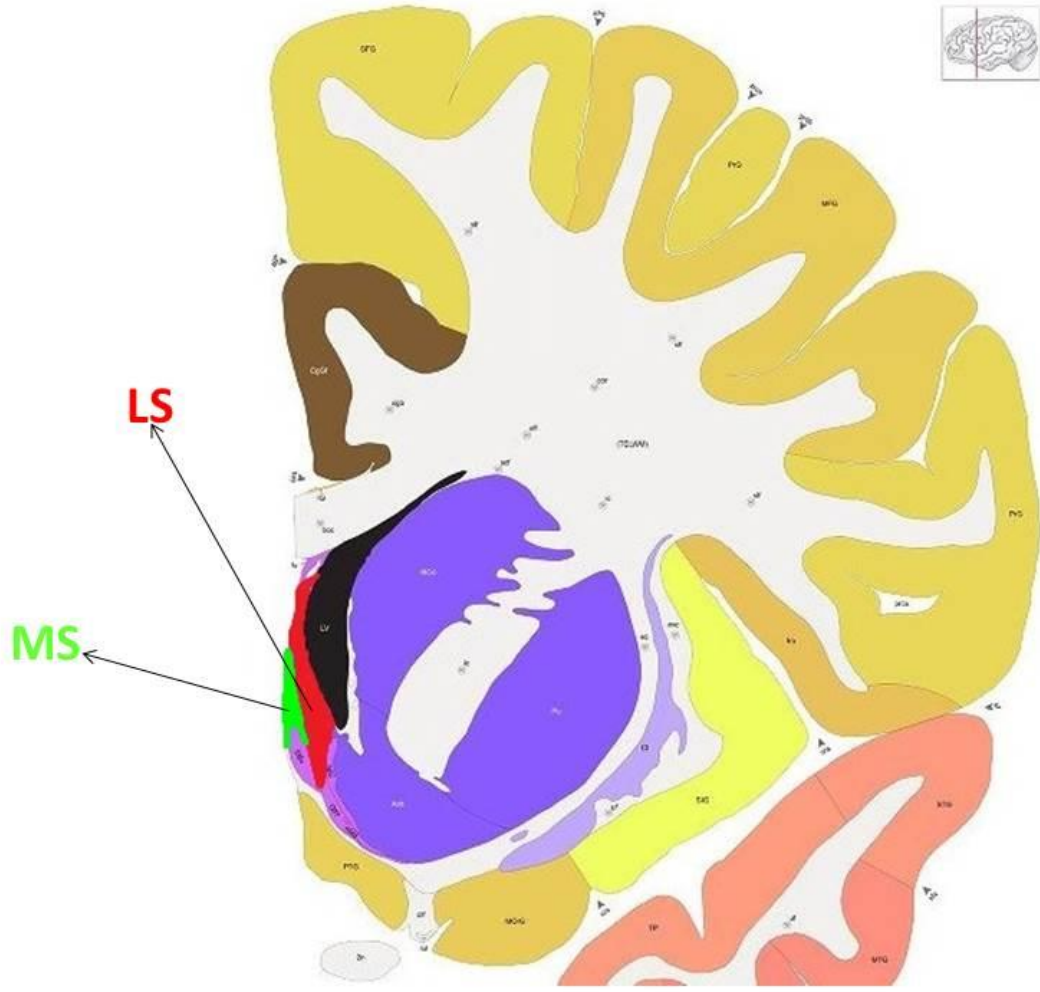
2.2.1 Area Septalis Anatomisi ve Lokasyonu

Area septalis, insanda lobus frontalis'in posterior, inferior ve medial kısımlarında commissura anterior'un hemen rostrumunda, corpus callosum'un rostral kısmının altında, nucleus accumbens'in dorsocaudal'inde bulunur. Bu alan çok da iyi tanımlanamamış çekirdek kümelerinden oluşur. Dolayısıyla insanlarda ve diğer gelişmiş primatlarda area septalis genelde detaylı bir gruplandırma veya spesifik çekirdekleri belirtmeden bu bölgenin genel anatomik lokasyonunu vurgulamak için kullanılır (13).

Area septalis'in yerleşimi kemirgen memelilerle insanlar karşılaştırıldığında oldukça farklıdır. Kemirgenlerde area septalis iki ventriculus lateralis'in arasında yerleşmiştir (Şekil 3). İnsanlarda ise area septalis, iki ventriculus lateralis'in ventral sınırında yerleşmiş ve her iki taraf birbirinden septum pellucidum ile ayrılmıştır (Şekil 4). Area septalis diğer memelilerle karşılaştırıldığında insanda daha büyüktür (14).

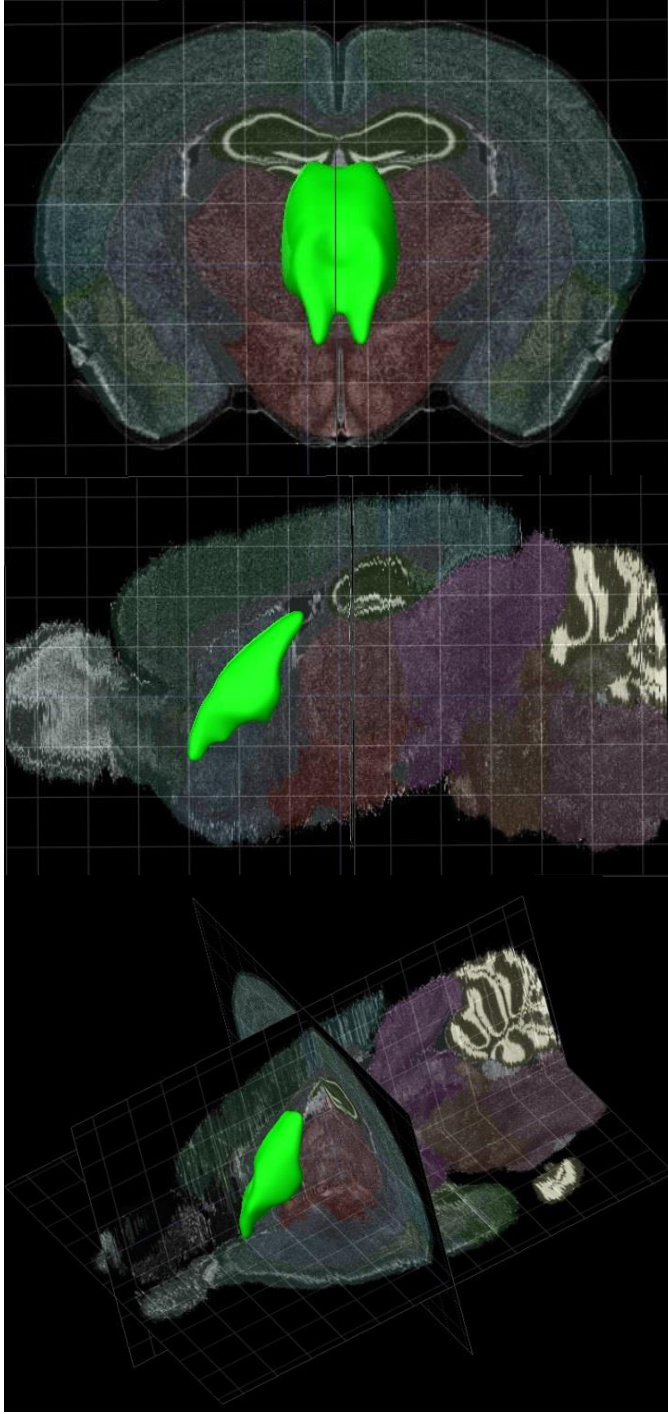


Şekil 3. Nuclei Septalis'i 3 boyutlu koronal, sagittal ve oblik açılardan göstermektedir. Gri olan alan Nucleus Septalis Lateralis'i, parlak yeşil alan Nucleus Septalis Medialis'i temsil etmektedir. (Allen 3D Mouse Brain Atlas'dan alınmıştır.)

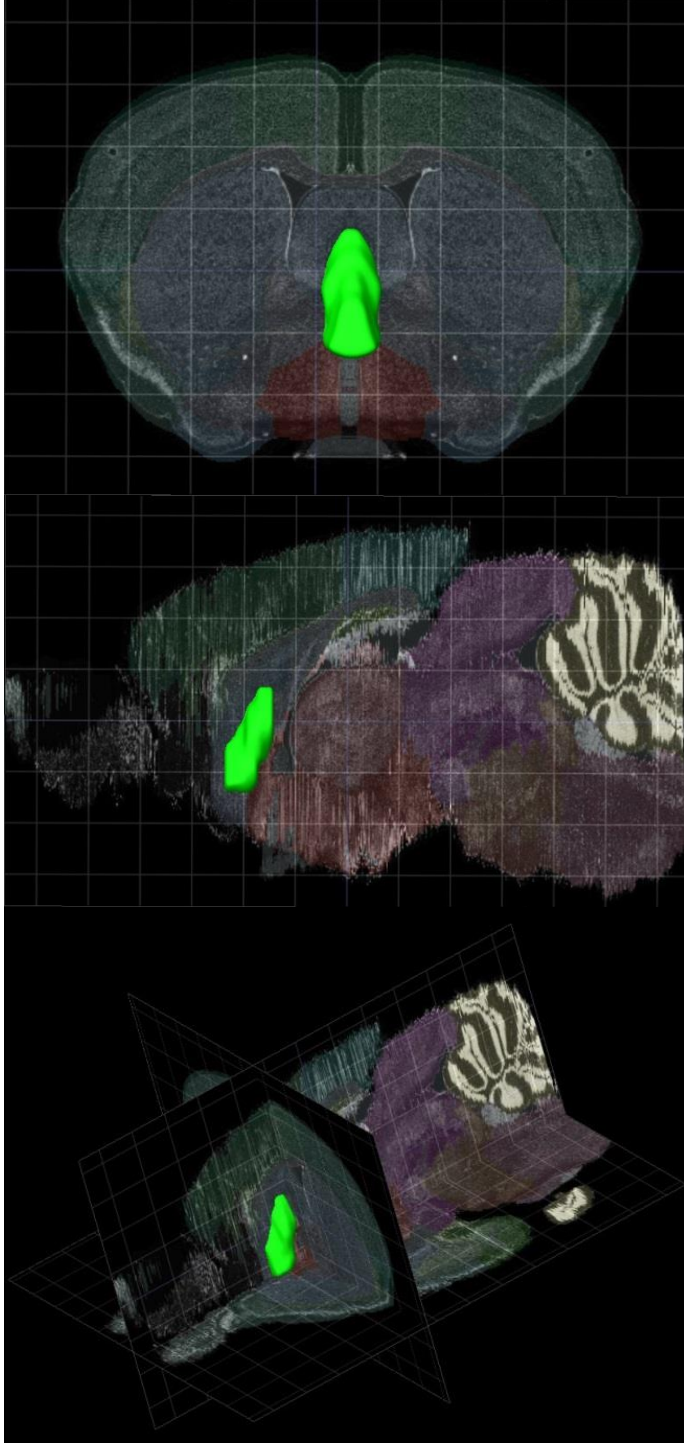


Şekil 4. İnsan beyninde koronal ekseninde Nucleus Septalis Lateralis'i (LS) kırmızı ve Nucleus Septalis Medialis'i yeşil olarak (MS) göstermektedir. (Allen Human Brain Atlas'dan alınıp modifiye edilmiştir.)

Beyinde area septalis heterojen yapıda bir prosencephalon bölgesidir. Area septalis lateral, medial ve posterior olmak üzere 3 bölgeye ayırmıştır. Area septalis'in lateral bölümünde sadece LS mevcuttur (Şekil 5). Medial bölümde ise MS mevcuttur (Şekil 6). Hemen MS'nin ventral'inde Broca'nın diagonal band nükleusu ve LS'den zona limitans ile ayrılan bed nucleus stria terminalis mevcuttur. Posterior bölümde de septofimbrial nucleus, triangular septal nucleus (santral yerleşimli) bulunmaktadır (2).



Şekil 5. Nucleus Septalis Lateralis'i açık yeşil olarak 3 boyutlu koronal, sagital ve oblik açılardan göstermektedir. (Allen 3D Mouse Brain Atlas'dan alınmıştır.)



Şekil 6. Nucleus Septalis Medialis'i açık yeşil olarak 3 boyutlu koronal, sagittal ve oblik açılardan göstermektedir. (Allen 3D Mouse Brain Atlas'dan alınmıştır.)

MS hücreleri, LS hücrelerine kıyasla daha büyük somalara sahiptirler (1). MS daha çok hippocampus ile bağlantılı olup öğrenme, dikkat ve hafıza gibi fonksiyonlarda rolü vardır.

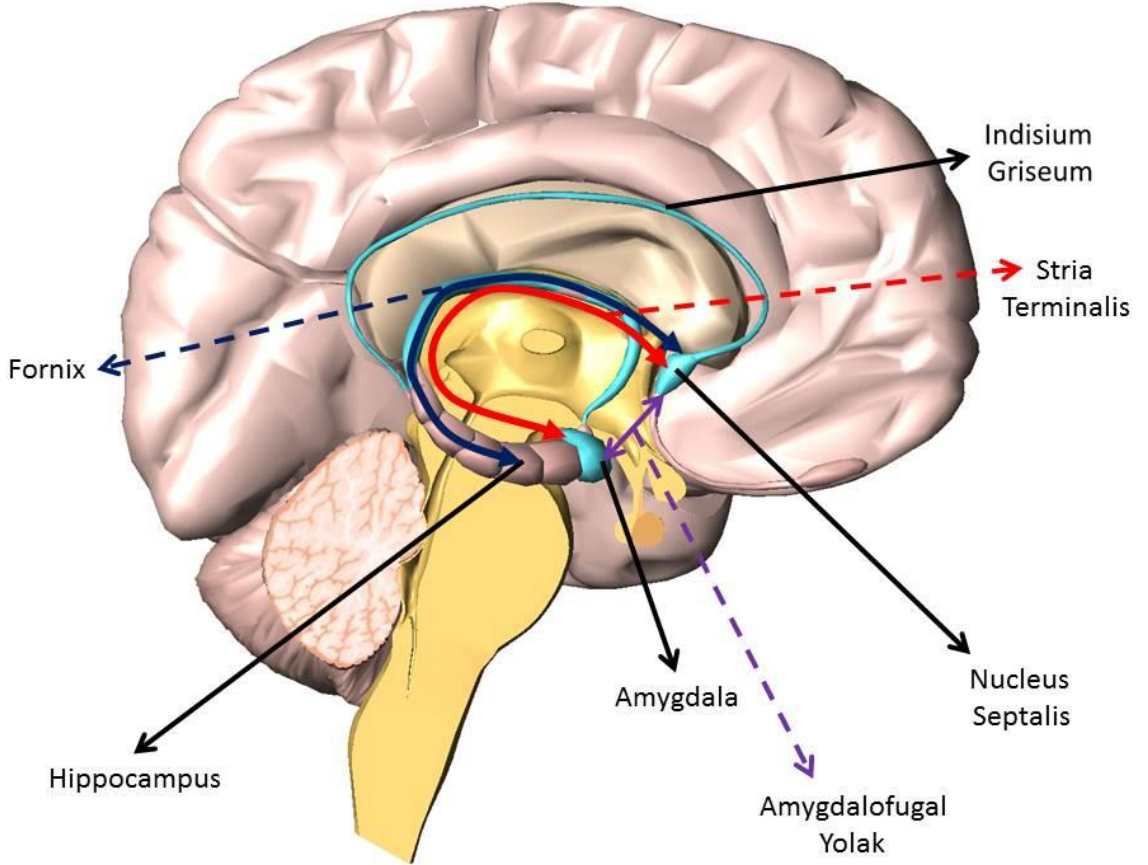
Swanson ve arkadaşları (1979) LS'yi dorsal, intermediate ve ventral olarak bu bölgenin hem sitoarkitektürüne hem de anatomik bağlantılarına göre sınıflandırmıştır (14). Daha sonra Swanson ve arkadaşları (1997) bu klasifikasyonu yeterli bulmamış ve LS'yi gelişmiş anatomik bağlantılarına ve ileri nörokimyasal özelliklerine göre tekrar kategorize etmiştir. Bu sisteme göre de LS üç gruba ayrılır. Bunlar Rostral LS (LSr), Caudal LS (LSc) ve Ventral LS (LSv)'dir. Rostral LS (LSr) nörotensin ve enkefalin mRNA pozitif ancak somatostatin mRNA negatif hücrelerden oluşur ve hippocampus CA 1 alanından input alır ayrıca medial hypothalamus ile bağlantılar kurar. Kaudal LS (LSc) ise somatostatin mRNA pozitif ancak nörotensin veya enkefalin mRNA negatif hücrelerden oluşur ve hippocampus CA 3 alanından input alır ve lateral hipotalamus ile bağlantılar kurar. Son olarak Ventral LS (Lsv) ise konum olarak posterior LSc nin ventralinde bulunur, östrojen reseptörü pozitif, diğerler markerlar negatif hücrelerden oluşur ve ventral subiculumdan input alır. Ayrıca hipotalamus'un medial preoptik alanıyla bağlantılar kurar (14) (Tablo 1). MS'nin ve LS'nin diğer yapılarla kurdukları bağlantılardan ilerleyen bölümlerde daha detaylı bahsedilecektir.

LS Alt bölge	Hücre Özellikleri	Bağlantılar
Rostral LS (LSr)	Nörotensin mRNA (+)	Hippocampus CA1
	Enkefalin mRNA (+)	Medial Hipotalamus
	Somatostatin mRNA (-)	
Kaudal LS (LSc)	Nörotensin mRNA (-)	Hippocampus CA3
	Enkefalin mRNA (-)	Lateral Hipotalamus
	Somatostatin mRNA (+)	
Ventral LS (LSv)	Nörotensin mRNA (-)	Subiculum
	Enkefalin mRNA (-)	Hipotalamus medial
	Somatostatin mRNA (-)	Preoptik alan
	Östrojen reseptörü (+)	

Tablo 1. Nucleus Septalis Lateralis'in rostral, kaudal ve ventral bölümlerinin hücre özellikleri ve bağlantılarını göstermektedir.

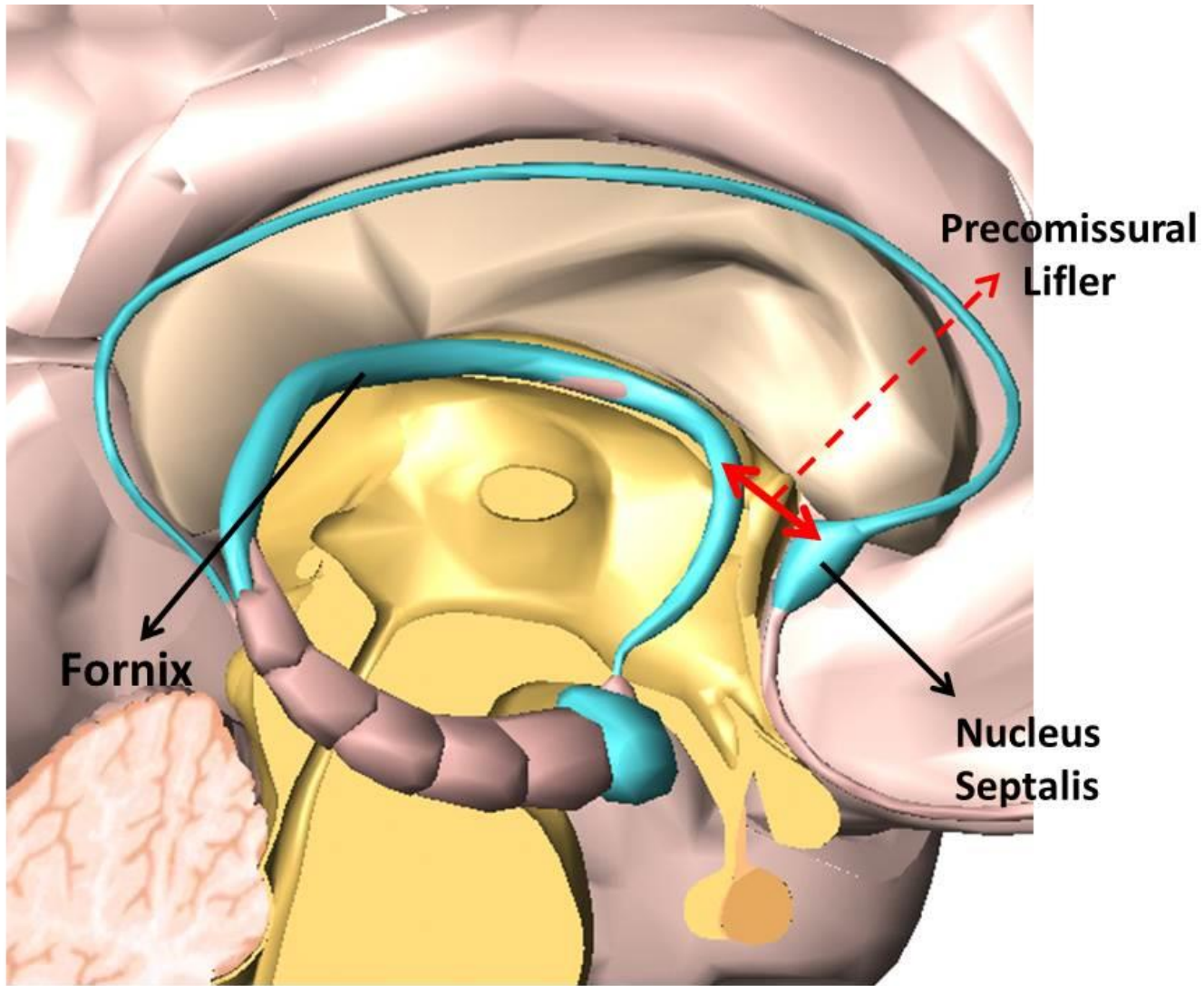
2.2.2 Area Septalis Afferent ve Efferent Bağlantıları

Santral sinir sisteminin evrimsel gelişiminin ilk safhalarında area septalis'in gyrus hippocampi'nin posterior parçasının devamı olduğu düşünülmektedir. Telencephalon geliştikçe bu iki yapı anatomik olarak birbirlerinden ayrılmış ve gelişmiş primat beyinde bulunan yerlerini almışlardır. Ancak hippocampus'un posterior bölgesine area septalis'den giden veya bu bölgeden area septalis'e gelen çok sayıda sinir lifleri, bu iki yapının evrimsel ve fonksiyonel ilişkisini yansıtmaktadır (15). Bu sebeple bu iki bölge genelde area septohippocampi olarak isimlendirilir (14). Bu liflerin en önemlileri stria terminalis ve ventral amygdalofugal yolak ve fornix'tir (Şekil 7).



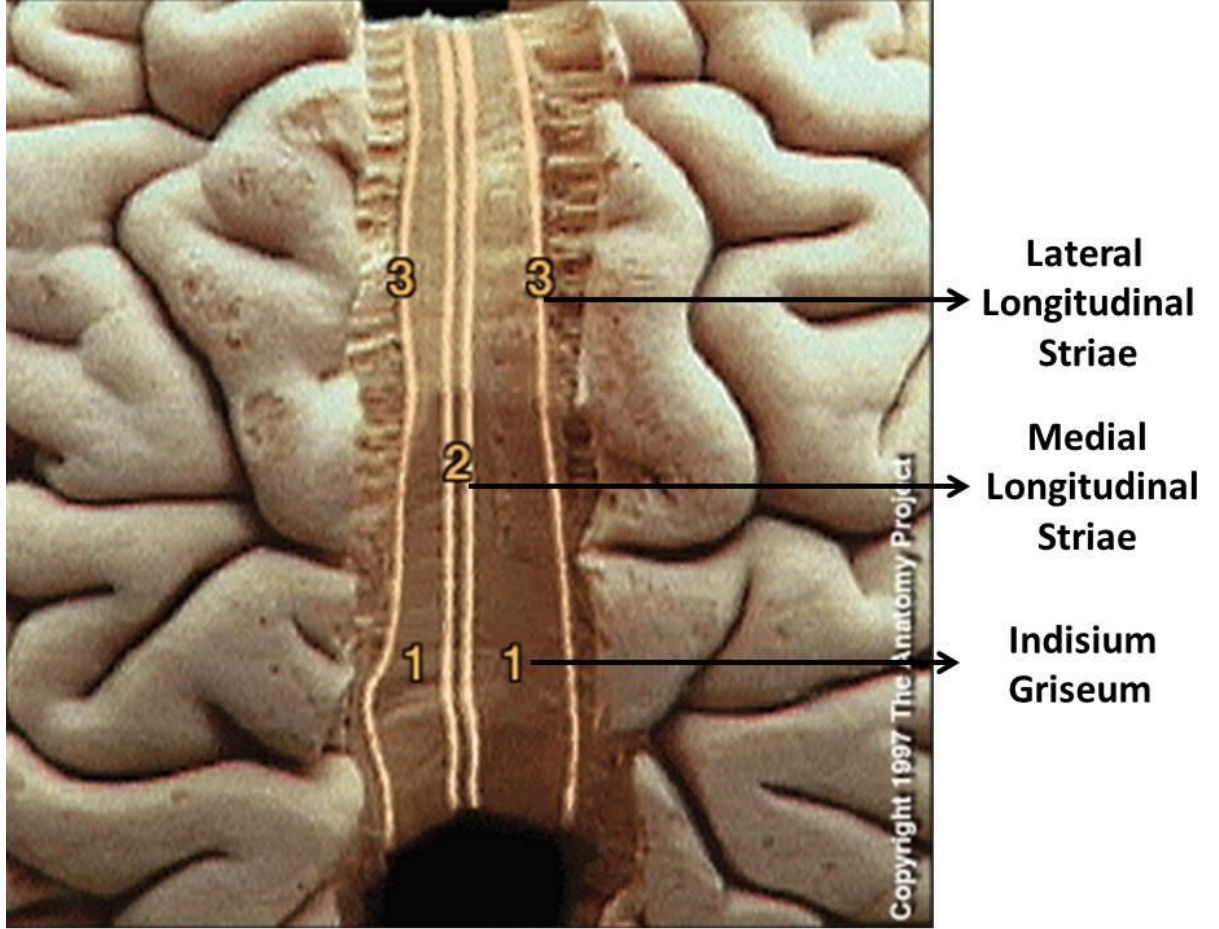
Şekil 7. Area Septalis'in major bağlantı yolları olan Fornix, Stria Terminalis ve Amydalofugal yolları göstermektedir. (Visible Body 3D Human Anatomy Atlas'dan alınıp modifiye edilmiştir.)

Stria terminalis, dorsolateral thalamus'un üstünden dolanarak amygdala ve area septalis arasında afferent ve efferent bağlantıları taşır. Ventral amygdalofugal yolak ise amygdala ve area septalis arasında daha direkt bir bilgi alışverişi sağlar (16). Fornix ise primer olarak formatio hippocampi'den corpus mamillare'ye efferent yolak olsa da hypothalamus'a inerken precomissural lifler olarak bilinen ve nuclei septales'e ulaşan kollateral lifler verir (17) (Şekil 8). Ayrıca fornix area septalis'den thalamus ve hippocampus'a afferent lifler taşır (13).



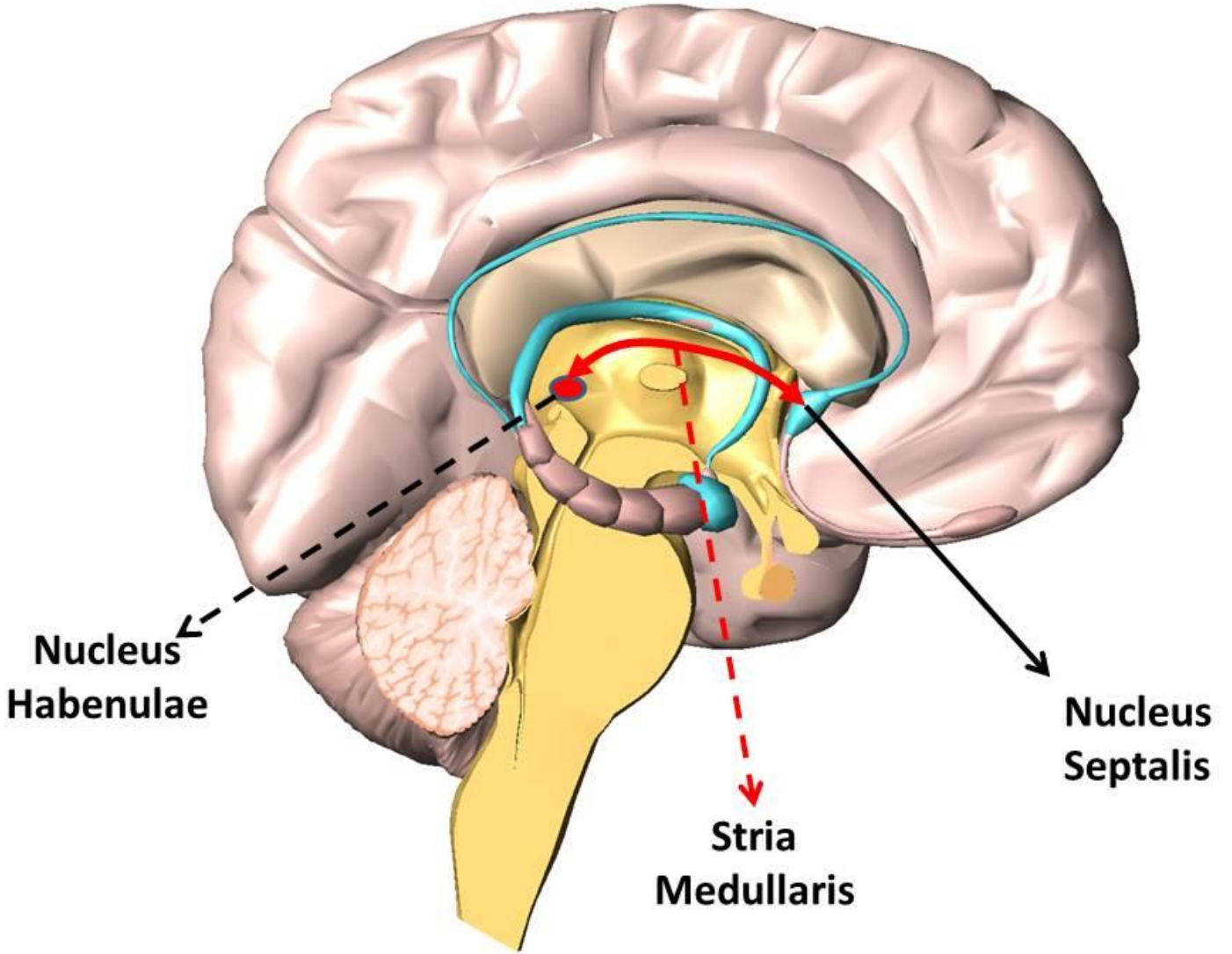
Şekil 8. Fornix'den çıkan ve Area Septalis'e gelen precomissural lifleri göstermektedir. (Visible Body 3D Human Anatomy Atlas'dan alınıp modifiye edilmiştir.)

Bunlarla beraber gyrus hippocampi'nin area septalis ile başka bir dorsal bağlantısı da mevcuttur. Indusium griseum adında hippokampal bölgeden corpus callosum'un dorsal yüzüne (corpus callosum ve gyrus cinguli arasında) anterior doğrultuda seyreden gri bir banttandır söz edilmektedir. Bu bant içerisinde medial ve lateral longitudinal striae (Lancisi striae) adında area septalis ile bağlantı kuran iki yolak bulunmaktadır (Şekil 9) (13, 18).



Şekil 9. Corpus Callosum'un dorsal yüzünde bulunan Indisium griseum, Striae Longitudinalis Lateralis ve Medialis'i göstermektedir. (The Anatomy Project 1997'den alınıp modifiye edilmiştir.)

Tüm bunlara ek olarak, hypothalamus ile ilgili bir dorsal yolak olan stria medullaris thalami mevcuttur. Thalamus'un dorsomedial yüzünde bulunan bu yolak, nuclei septales'den nucleus habenulae ve nuclei thalami'nin bir kısmına primer efferent bir yolaktır (Şekil 10). Nucleus habenulae'ye gelen projeksiyonlar truncus cerebri'nin nucleus interpeduncularis'ine fasciculus retroflexus aracılığıyla taşınmaktadır (19).

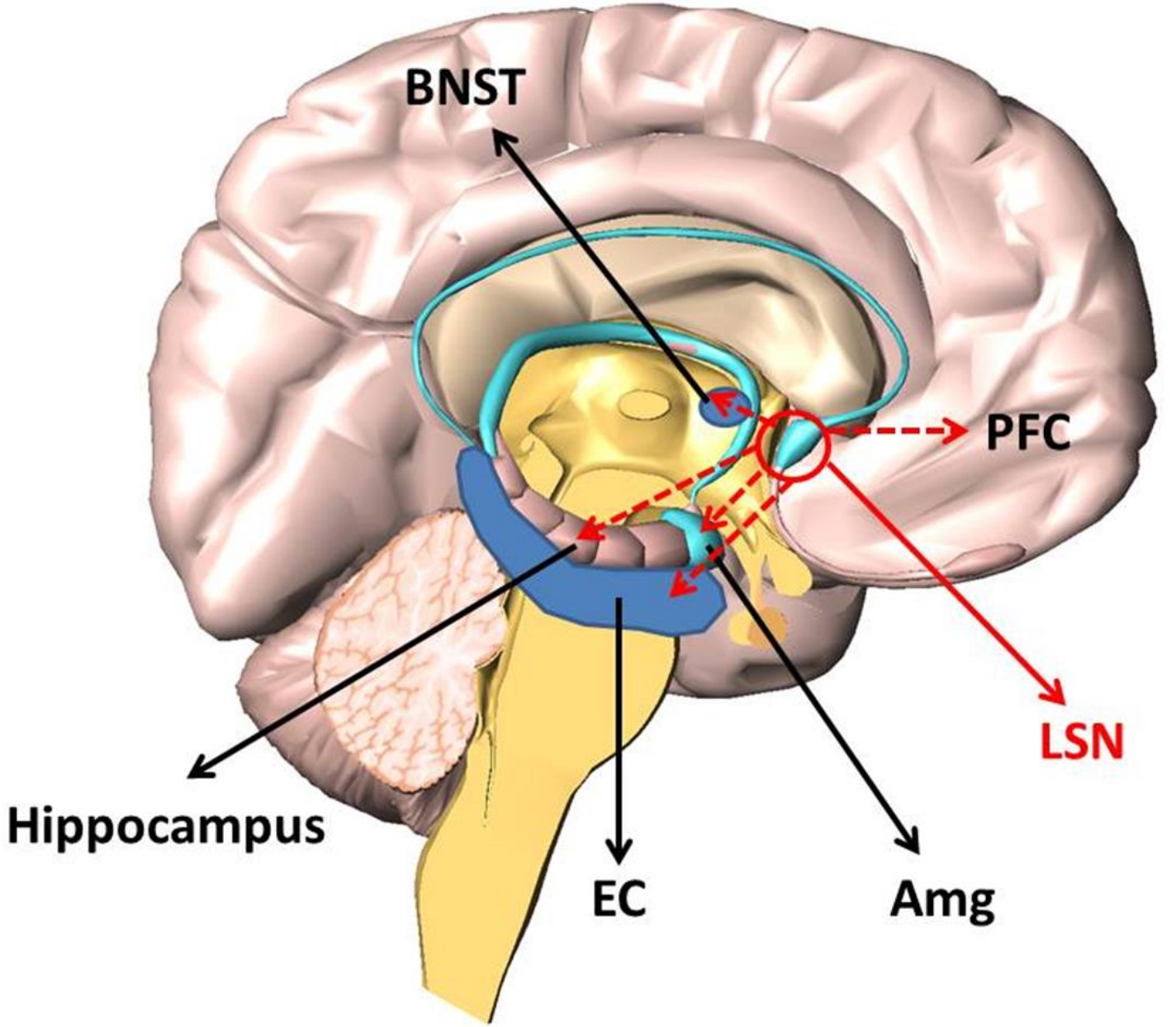


Şekil 10. Nucleus Habenulae ile Area Septalis bağlantısını sağlayan Stria Medullaris Thalami'yi göstermektedir. (Visible Body 3D Human Anatomy Atlas'dan alınıp modifiye edilmiştir.)

Yukarıda bahsi geçen uzun ve dorsal yerleşimli yolakların dışında, ventral yerleşimli yolaklar da mevcuttur. Bunlar nuclei septales'e basal prosencephalon, amygdala, hypothalamus, ve truncus cerebri'nin bağlantılarını sağlar (13). Ek olarak amygdalofugal yolak dışında iki ana yolak da nuclei septales'in cortex frontalis basillaris'in, hypothalamus ve truncus cerebri ile olan ventral bağlantılarını oluşturur. Bunlar Broca'nın diagonal bandı (20), ve fasciculus medialis telencephali'dir (13).

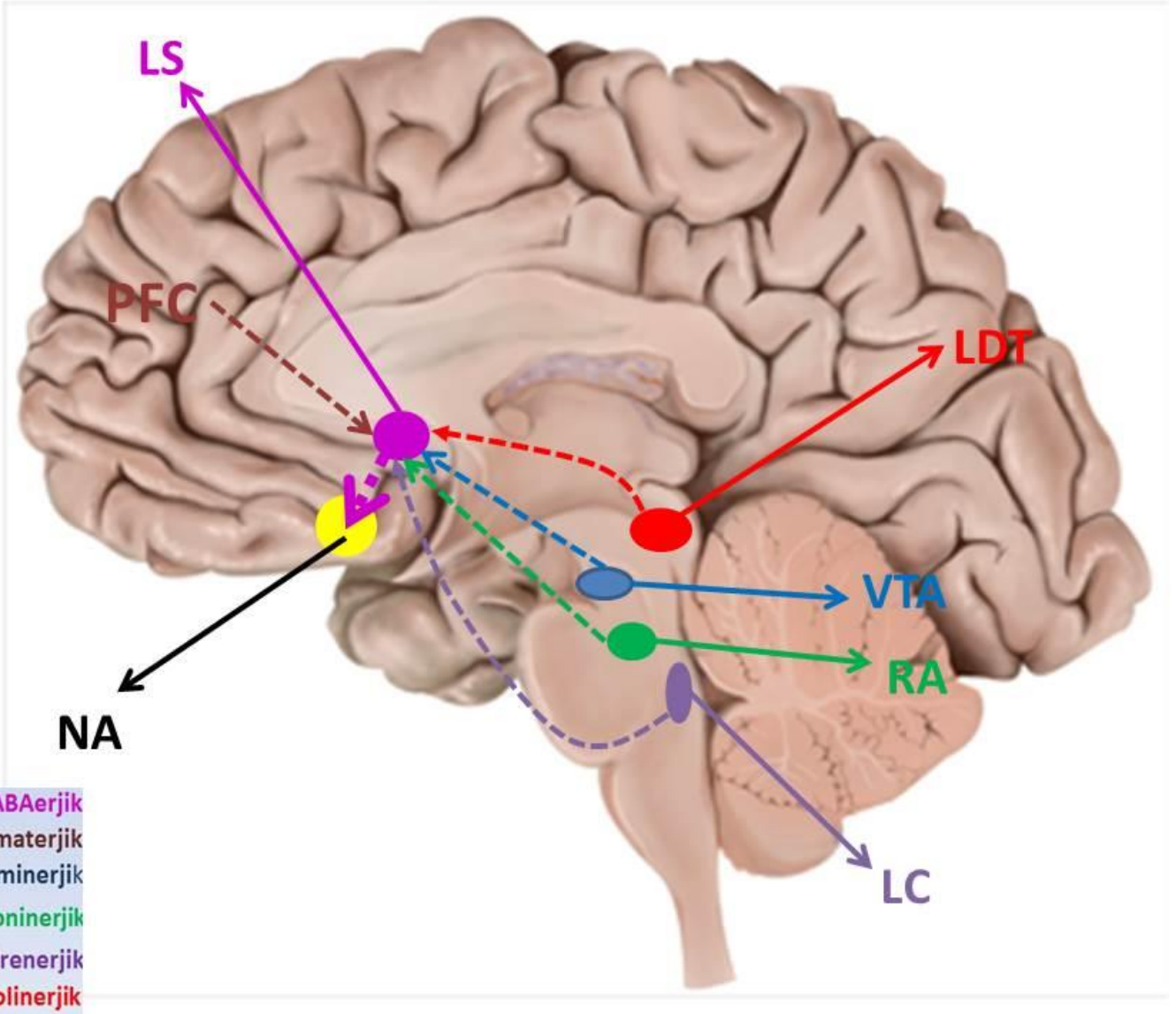
Korteks, subkorteks ve truncus cerebri bağlantılarının sonucunda area septalis amygdala'ya benzer şekilde muhakeme, duygulanım, duyuusal ve viseral enformasyona katılımda bulunur. Böylece area septalis'in aynı hypothalamus ve amygdala gibi limbik sistem bağlantıları dışında cortex frontalis, thalamus ve truncus cerebri ile önemli bağlantılar yaptığı görülmektedir (13).

Area septalis'in bağlantılarına, bu bölgeyi alt birimlerine ayırarak bakacak olursak LS'nin amygdala, bed nucleus stria terminalis, medial prefrontal korteks ve entorhinal korteks gibi emosyonel fonksiyon merkezleriyle yoğun bağlantılar kurduğu literatürde karşımıza çıkmaktadır. LS'nin yerleşimi birçok kognitif fonksiyonun merkezi olan prefrontal korteks, entorhinal korteks hippocampus gibi bölgelerden gelen uyarıların; amygdala, hypothalamus gibi duygu-durum merkezlerinden gelen uyarılarla birleştirilmesinde ve bu uyarıların gerekli merkezlere yönlendirilmesinde görev almasını sağladığı literatürde bilinmektedir (14) (Şekil 11).



Şekil 11. Nucleus Septalis Lateralis'in (LS), cortex prefrontalis (PFC), Amygdala (Amg), Entorhinal korteks (EC), Bed Nucleus Stria Terminalis (BNST) ve Hippocampus'a olan efferent bağlantılarını göstermektedir. (Visible Body 3D Human Anatomy Atlas'dan alınıp modifiye edilmiştir.)

Ayrıca LS'nin area tegmentalis ventralis'den (VTA) dopaminerjik, Raphe Nucleus'dan (RA) serotoninerjik, Locus Ceruleus'dan (LC) adrenerjik ve Area Tegmentalis Laterodorsalis'den (LDT) de kolinerjik uyarılar aldığı tespit edilmiştir (14) (Şekil 12).



Şekil 12. Nucleus Septalis Lateralis'in (LS), cortex prefrontalis'den (PFC) aldığı glutamaterjik, Locus Ceruleus'dan (LC) aldığı noradrenerjik, Raphe Nucleus'dan (RA) aldığı serotoninerjik, Area Tegmentalis Ventralis'den (VTA) aldığı dopaminerjik, Area Tegmentalis Laterodorsalis'den (LDT) aldığı kolinerjik uyarıları ve Nucleus Accumbens'e (NA) gönderdiği GABAerjik uyarıları göstermektedir. Nörotransmitterler farklı renkte şekillendirilmiş olup lejand şeklinin sol alt köşesinde yer almaktadır. (Visible Body 3D Human Anatomy Atlas'dan alınıp modifiye edilmiştir.)

2.2.3. Area Septalis Nörokimyasal Özellikleri

Area septalis’de de, beynin diğer bölgelerinde olduğu gibi çeşitli nörotransmitterler mevcut olup, bu nörotransmitterlerin kimyasal özellikleri depolandıkları ve salındıkları nöronların fonksiyonları ile ilgili önemli etkilere sahiptir. Bu bölgede başta GABAerjik nöronlar olmak üzere birçok grup nöron mevcuttur. Area septalis’de kolinerjik nöronların varlığı ve bu nöronların hippocampus’a kadar uzanıp terminaller verdiği bilinmektedir (21). LS’de de GABAerjik nöronlar yoğun olup, diğer nöron tipleri de görülmektedir.

Enkefalin, somatostatin, nörotensin, substans P ve dinorfin ihtiva eden nöronlar buna örnektir. GABAerjik nöronlar haricindeki nöronların LS içerisinde görülme yoğunlukları bu çekirdeğin alt bölgelerine göre değişiklik göstermektedir. Örneğin enkefalin içeren nöronlar daha çok LS’nin rostral kısmında tespit edilirken, somatostatin içeren nöronlar daha çok LS’nin caudal kısmında tespit edilmektedir (22).

Area septalis’de GABAerjik ve kolinerjik nöronların yanısıra son yapılan çalışmalar bu bölgede ayrıca glutamaterjik nöronların varlığını da göstermiştir. Kolinerjik ve glutamaterjik nöronlar daha çok MS’de görünürken, GABAerjik nöronların LS’de yoğun olduğu bilinmektedir. GAD immünohistokimya sonuçlarına göre her iki GAD alt tipinin area septalis’de bulunduğu görülmektedir. Bu enzimleri taşıyan hücrelere bakıldığında ise GAD-65 pozitif olanların daha küçük boyutlu oldukları ve daha çok LS’de görüldükleri, GAD-67 pozitif olanların boyutlarının daha büyük olduğu ve daha çok MS bölgesinde tespit edildikleri görülmüştür (3).

2.2.3.1. Area Septalis Kolinerjik Nöronlarının Özellikleri

Area septalis’in kolinerjik nöronlarına bakılacak olursa, GABAerjik nöronların geniş dağılım gösterdiği area septalis’de kolinerjik nöronların MS bölgesinde yoğun olarak görüldüğü bilinmektedir. LS’deki kolinerjik nöron dağılımının MS’ye kıyasla çok kısıtlı olduğu bilinmektedir. Area septalis’deki kolinerjik nöronların Alzheimer Hastalığı’nda şiddetli derecede kayba uğradığı ve bu hastalığın patogenezinde rolü olduğu düşünülmektedir (3).

2.2.3.2. Area Septalis Glutamaterjik Nöronlarının Özellikleri

Area septalis glutamaterjik nöronlarına bakıldığında, bu grubun da MS bölgesinde yoğun olarak görüldüğü, ancak LS bölgesinde ise MS bölgesi kadar yoğun olmadığı ve tek tük dağınık halde bulunduğu gösterilmiştir. Area septalide tespit edilmiş olan glutamaterjik hücrelerin de orta boyutlu (yaklaşık 10 mikron çapında) hücreler olduğu görülmüştür. Glutamaterjik nöronlar area septalide en son tespit edilmiş grup olmalarına rağmen kolinerjik nöronlardan sayıca daha fazla oldukları yapılan çalışmalarda görülmüştür. Glutamaterjik nöronların bu bölgede gösterilmesi sonucunda da daha önceden iki tip nöron grubuna (kolinerjik ve GABAerjik) bağlı olduğu düşünülen septal fonksiyonda günümüzde glutamaterjik nöronların da görev aldığı bilinmektedir (23).

2.2.3.3. Area Septalis GABAerjik Nöronlarının Özellikleri

Area septalis'deki GABAerjik nöronlara bakılacak olursa bu bölgede yoğun olarak tespit edildikleri gösterilmiştir. Literatürde, in situ hibridizasyon tekniği kullanılarak GAD-65 ve GAD-67 mRNA içeren hücreler LS'nin dorsal kısmında, orta kısmında ve ventral kısmında yoğun olarak görüldüğü gösterilmiştir. Bölgenin genelinde GAD-67 mRNA içeren nöronların görülme sıklığı, GAD-65 mRNA içeren nöronlardan çok farklı olmamakla birlikte, sayıca daha fazla görüldüğünü bildiren yayınlar mevcuttur (24). MS'ye bakıldığında ise GAD-67 baskın olarak görülür. Buna ek olarak LS incelendiğinde, ana nöron popülasyonunun GABAerjik olduğu anlaşılmıştır. Bu sebebiyle hipokampal - lateral septal aksonların da bu GABAerjik nöronlara terminaller verdiği düşünülmektedir (4). Ayrıca bu GABAerjik nöronlarının bir kısmının, içerisinde GABAerjik internöronların da bulunduğu septal nöronların inhibisyonunu gerçekleştirdiği düşünülmektedir (25).

2.2.4. Area Septalis Fonksiyonel İlişkileri

Göreceli olarak küçük bir alan olan area septalis'in, boyutuyla kıyaslanamayacak kadar önemli ve çeşitli fonksiyonları mevcuttur. Memelilerde yapılmış olan lezyon çalışmalarına bakıldığında sonuçların çoğunun amygdala lezyonlarında görünenlerin tam tersi olduğu ortaya çıkmaktadır. Normal şartlarda laboratuvarlarda deney amaçlı kullanılan albino sıçanlar çok uysal ve evcil davranışlı hayvanlardır. Area septalis stereotaksik olarak hasarlanmış olan bir albino sıçan, herhangi bir stimulus olmadığında hiçbir değişiklik yokmuş gibi hareketsiz dururken, normal şartlarda tehlike arz etmeyecek kadar küçük bir uyarı sonucu, çok şiddetli bir öfke reaksiyonu verip tehdit olarak algıladığı kaynağa saldırdığı gözlemlenmektedir. Bu durum sadece sıçanlarla sınırlı olmamakla birlikte genelde tüm memelilerde benzer sonuçlarla karşılaşmıştır. Bu tepkiye "septal öfke" (septal rage) denmektedir (1,13). Lezyon sonucu oluşan bu tepki zamanla azalmakta, bu azalmadan da amygdala'nın sorumlu olduğu düşünülmektedir. Septal lezyonların tam tersine, area septalis'e yapılan stimulyasyonlar agresif davranışları azalttığı veya inhibe ettiği gözlenmiştir (13).

Amygdala lezyonlarında ortaya çıkan sosyal geri çekilmenin tam aksine area septalis lezyonlarında artmış bir sosyalleşme ihtiyacı gözlemlenmektedir. Bu durum bazı zamanlara canlı olmayan nesnelere veya normal şartlarda uzak durulan diğer bir türle artmış fiziksel temas ihtiyacı şeklinde görülmektedir. İnsanlarda ise bu durum sosyal yapışıklık olarak adlandırılan ve area septalis lezyonunu takiben bireyin sosyal iletişimde bulunması gereken uygun sınırı algılayamaması ve uygulayamaması şeklindedir. Burada vurgulanmış olan sosyal cevaplar artmış agresif davranış modeline ters gibi görünse de aslında iki durumda da karşılaşılan sosyal veya emosyonel davranışların düzenlenmesinde veya inhibe edilmesindeki yetersizliktir (26).

Area septalis'in stimulasyonunun insanlarda keyif verici etkilere sahip olduğu gözlemlenmiştir (27). 1950'lerde hayvanlarda yapılan stimulasyon deneylerinde ilk kez Olds & Milner deney sıçanlarının area septalis'ine stimulasyon elektrodu yerleştirmiş ve sıçanların bulunduğu kafese bu elektrodu aktive edebilecek bir düzenek kurmuşlar sonrasında ise hayvanların düzeneği kullanarak bu stimulasyonun devamını sağlamaya çalıştığını gözlemlemişlerdir. Bu etkiler stimulasyon elektrodunun konumunun ne kadar doğru olduğuna göre değişiklik göstermektedir (13).

Bu tür bir stimulasyon amygdaloid ve hypothalamus alanlarından endojen opiyat salınımını tektiklemesi sonucu olduğu düşünölmektedir. Ayrıca Area septalis'in stimulasyonunda bu bölgenin hypothalamus ve truncus cerebri gibi otonom merkezlerle bağlantısından dolayı bazı otonomik değişiklikler de gözlemlenmektedir (13). Tüm bunlara ek olarak area septalis'e gelen dopaminerjik uyarıların da bu keyif verici etkilere sebep olabileceği ve antipsikotik ilaçların dopaminerjik etkilerini nuclei septales üzerinden sağladığı da düşünölmektedir (1).

Area septalis'de genel olarak LS'nin fonksiyonu için duygulanıma direkt etki etmeden, gelen uyarıları önem ve şiddet sırasına göre değerlendirmek ve primer olarak duygulanımdan sorumlu olan merkezlere iletmek olduğu söylenebilir. LS nöronları sahip oldukları kimyasal özellikler sebebiyle bağımlılık yapan maddelere yüksek derecede duyarlıdırlar. LS korku ve anksiyete regölasyonunda önemli role sahip olduğu için spesifik lezyon çalışmalarında korku hissini arttığı, daha önce de bahsedildiği gibi deney hayvanlarının verdikleri tepkilere bakıldığında görölmektedir. Benzer şekilde LS spesifik olarak elektrik stimulasyona uğratılması durumunda da anksiyete hissini azaldığı yapılan deneylerde gözlenmiştir (14).

Tüm bunlara ek olarak area septalis'in truncus cerebri ve hypothalamus'dan neokortekse iletimin düzenleyici düğümü gibi çalıştığını unutulmamalıdır. Aynı zamanda area septalis, hedef bölgelerden kortikoseptal bağlantılarla geribildirim de alır. Nuclei septales'in hippocampus eksitabilitesi üzerinde düzenleyici bir etkisi vardır. Bu düzenleyici etki sebebiyle septal nöronlar, özellikle nucleus septalis medialis nöronları, hippocampus devreleri üzerinde antiepileptik bir etki yaparlar (4).

2.3. γ -Amino-Butirik Asit (GABA) Genel Bilgiler

GABA, glutamat'a benzer şekilde santral sinir sisteminin genelinde bulunan bir amino asittir. Beyindeki tüm sinaptik bağlantıların %40 'ının GABAerjik olduğu tahmin edilmektedir. Glutamat 'ın aksine GABA reseptörleri postsinaptik nöronlarda inhibitör bir etki oluşturmaktadır. GABA inhibisyonunun motor hareketlerin koordinasyonunda öneminin yanında input stimulusların derecelendirilip önem sırasına konmasında da önemli etkisi mevcuttur (13). Organizmanın kognitif ve nörolojik gelişimi karmaşıklıkla koordinasyon ve filtreleme için gerekli inhibitör kapasite de bununla doğru orantılı olarak karmaşıklıkla artmaktadır. Bu sebeple GABA reseptör dansitesinin türün gelişmişlik oranına göre artış sergilediği bilinmektedir. Diğer nörotransmitterlerde olduğu gibi GABA salınımına kadar nöronların içindeki veziküllerde depolanır ve presinaptik terminalde oluşan depolarizasyon ile salınımı gerçekleşir. Sinaptik boşluğa salınımını müteakip presinaptik veya postsinaptik reseptörüne yapışarak etki eder. Sinaptik boşlukta bulunan GABA'nın degradasyonu ise presinaptik terminale geri alınımından sonra GABA transaminaz enziminin katalizlediği bir reaksiyonla gerçekleşir (28).

2.3.1. GABA Sentezi

GABA santral sinir sisteminde inhibitör etkileriyle bilinen, lokomotor aktivite, öğrenme, üreme ve sirkadian ritim ile ilgili görevleri olan ana nörotransmitterdir. Bozulmuş GABA iletimi Parkinson, epilepsi, depresyon, anksiyete ve panik bozuklukların patofizyolojisinde önemli rol sahibidir. GABA iletiminin düzenlenmesinde başta hız kısıtlayıcı enzim olan GAD'ın etkisi altındaki GABA sentezi gelir. Moleküler klonlama çalışmaları sonucunda GAD enziminin iki alt tipinin olduğu ve bu alt tiplerin de birbirlerinden bağımsız şekilde regüle edilen iki farklı genin ürünleri oldukları gösterilmiştir (29).

GAD-65 geni kromozom 2, GAD-67 geni ise kromozom 10 üzerindedir. Bu iki alt tip enzimin mevcudiyeti GABA'yı serotonin ve asetil kolin gibi diğer nörotransmitterlerden ayırır. GABA sentezi için neden iki enzim bulunduğu ise net olarak bilinmemektedir.(29, 30).

GAD enziminin isimlendirilmesinde kullanan sayılar bu iki alt tipin yaklaşık moleküler ağırlıkları olan 65400 Da u 66600 Da 'dır. Bu enzimin kendi içinde de N-terminal ve C-terminal parçaları mevcuttur. N-terminal parçası membrane asosiyasyonu, subselüler hedefleme ve heteromerik ilişkilerden sorumluyken, C-terminal parçası enzimin katalitik merkezini barındırır. GAD-65 ve GAD-67 alt tiplerinin bir diğer farkı da hücre membranıyla olan ilişkileridir. GAD-65 N-terminali fosforilasyonu sonucunda membran asosiyasyonu sağlarken, GAD-67 ise GAD-65 asosiyasyonu sonrası meydana gelecek olan 65-67 heteromer oluşumuna gereksinim duyar. Bu farklar iki enzimin subselüler yerleşimleriyle ilgili farkların da sebebi olabilir (29).

Bu enzimlerin fonksiyon görmeleri için piridoksal fosfat çok önemli bir kofaktör olarak karşımıza çıkar. Literatüre göre GAD-65 alt tipi ortamda piridoksal fosfat varlığına GAD-67'den daha duyarlıdır (31).

Literatürde GAD-67 alt tipinin sinir hücrelerinin genel metabolik fonksiyonları için sitrik asit siklusu üzerinden metabolizmaya katılmak üzere GABA ürettiği düşünülmektedir. Ancak yapılan araştırmalarda GAD-65 "knock-out" farelerde GAD-67 ve GABA seviyelerinde düşme gözlemlenmemiştir. Aksine GAD-67 "knockout" farelerde GABA seviyelerinin düştüğü gösterilmiştir. Bunun sonucunda GAD-67'nin beyinde GABA üretimi için öncelikli alt birim olduğu fikri uyanmıştır. Tüm bu yeni bilgiler ışığında GAD-65'in etkinliğinin kofaktör olarak görev yapan piridoksal fosfat ile kontrol edildiği de düşünülürse GAD-67 alt biriminin daha fazla etkin gibi görünmesi açıklanabilir (29, 30).

Çoğu GABAerjik internöron GAD enziminin iki alt tipini de barındırır. GAD-67 aksonlarda ve hücre gövdelerinde bulunurken, GAD-65 daha çok sinaptik terminallerde mevcuttur. Dolayısıyla GAD-67 'nin genel metabolik aktiviteye GABA havuzu sağlamakta görevli olduğu, GAD65 'in ise sinaptik aktarımda görevli olduğu düşünülmektedir (32). GAD65 eksikliği olan farelerde beyindeki GABA içeriğinde bir değişiklik olmadığı ancak nöbet geçirmeye yatkın oldukları gözlenmiştir. Bu durumun aksine GAD-67 eksikliği olan farelerin şiddetle azalmış GABA seviyeleri ve bazı solunum sıkıntıları sebebiyle hayatta kalmaları mümkün olmadığı yapılmış "knock-out" çalışmalarında gösterilmiştir (33).

2.3.2. GABAerjik Nöronların Görüntülenmesinde Kullanılan Teknikler

GABAerjik nöronların saptanmasında ve görüntülenmesinde çeşitli yöntemler geliştirilmiş olup, GAD enzimi de bu yöntemlerin bazılarında spesifik marker olarak kullanılır (34). Tüm bu süreç içerisinde bu yöntemlerin çoğu beraberinde GABAerjik hücreleri görüntüleme çözünürlük problemleri getirmiştir. Yakın zamanda geliştirilmiş olan GAD-GFP (Green Fluorescent Protein) “knock in” fareler kullanılarak GAD enzimi floresan tekniklerle görüntülenerek GABAerjik nöronların tespitinde kullanılmaya başlanmıştır (24).

Bu çalışmamızda kullandığımız bu teknik temel olarak bir deniz anası türünden elde edilmiş ve floresan ışık yapan bir tür protein geninin farelerin genetik yapısı içerisinde GAD enzimini kodlayan bölgeye yerleştirilmesi ile, GAD enzimine bir antikor bağlama olanağı sağlamaktadır. Sonuç olarak işaretlenmiş olan GAD enzimi deney hayvanının bu enzimi barındıran dokuların (bizim çalışmamızda beyin) floresan mikroskop altında incelenmesi sonucu tespit edilebilir hale gelmektedir.

Bunun yanında in situ hibridizasyon teknikleri de GAD enzimi üzerinden GABAerjik nöronların görüntülenmesinde kullanılmaya başlanmıştır. Yapılan araştırmalarda GAD-65 subtipi daha çok akson terminallerinde, GAD-67 ise nöronların somalarında yaygın olarak gözlemlenmiştir (24).

Gelişimsel dönemde GABA fonksiyon ve dağılımında yetişkin beyniyle karşılaştırıldığında önemli farklar mevcuttur. Yetişkin sinir sisteminde GABA fazik cevaplar ortaya çıkaran bir nörotransmitter olarak görevli iken, gelişmekte olan sinir sisteminde otokrin-parakrin mesaj molekülü olarak tonik sinyallerden sorumludur (35).

2.3.3. GABAerjik Nöronların Gelişimsel Özellikleri

Gelişimsel dönemde yapılmış olan çalışmalarda Subventriküler alanda çok sayıda GABAerjik nöron gözlenmiştir. Bu bölge yaşam boyunca nörogenezin olduğu, nöroblastlara başkalaşan kök hücrelerin bulunduğu ve bu hücrelerin göç ederek internöronları oluşturduğu bölgedir. Dolayısıyla bu bölgede gelişmeye başlamış GABAerjik nöronların, gelişimsel süreç içerisinde beynin farklı yerlerine göç ettikleri, bu bölgelerden birinin de septal bölge olduğu bilinmektedir (36).

Yavru ratlarda tespit edilen GAD-65 ve GAD-67 seviyelerinin yetişkin düzeye ancak ilk üç postnatal haftanın sonunda geldiği gözlenmiştir. In situ hibridizasyon ile çalışılmış alanlarda GAD-67 'nin, GAD-65 'e kıyasla daha yüksek oranda tespit edildiğini gösteren yayınlar mevcuttur ancak bu durumla ilgili birbiriyle çelişen sonuçlar literatüre katılmaktadır. Bazı yayınlar ise GAD-65 izoformunun yetişkin ratlarda, GAD-67'ye kıyasla daha yüksek derecede tespit edildiğini söylemektedir (33).

Embriyonik dönemin başlarında GABA, yetişkinde olduğu gibi inhibisyonundan sorumlu değildir. Aksine reseptörü açıldığında hücre dışına Cl salınımına sebep olur ve depolarizasyona sebep olur. Embriyonik dönemde migrasyon gösteren nöron öncülleri GABA-A reseptörü eksprese ederler ve GABA bu reseptöre bağlandığında depolarizasyona sebep olur. Bu sebeple Erken embriyonik dönemde GABA, nöron migrasyonu için gerekli bir nörotransmitterdir (35).

Bir nörotransmitter, fonksiyonu düşünüldüğünde etki ettiği reseptörüne muhtaçtır. Bu sebeple fonksiyonel anlamda reseptöründen ayrı düşünülemez. Aslında bir nörotransmitter'in etkisi, bağlandığı reseptörünün ortaya çıkarmış olduğu etkilerin bütünüdür.

2.3.4. GABA Reseptörleri

GABA'nın üç büyük reseptör alttipi mevcuttur. Bunlar GABA-A, GABA-B ve GABA-C reseptörleridir. Bunlar hem postsinaptik hem de presinaptik membranlarda bulunabilirler. Bu sebeple GABA salınımı yapan presinaptik sinir hücresinde GABA reseptörü mevcut ise bu reseptör otoreseptör olup salınımı "feed back" mekanizması ile kontrol eder (28).

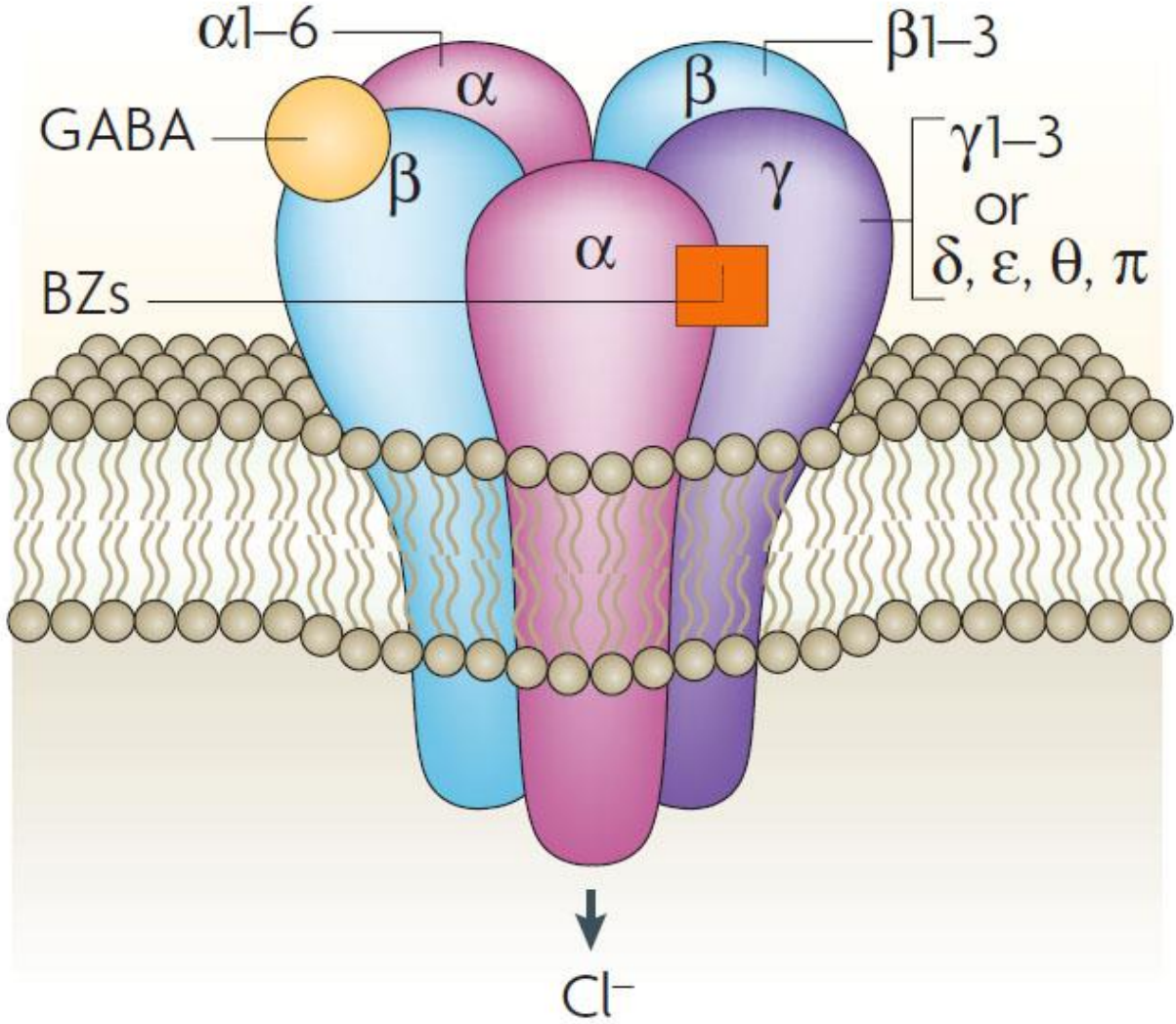
2.3.4.1. GABA-A Reseptörleri

GABA-A reseptörleri bilinen karmaşık yapıdaki reseptörlerdendir. Nöropsikiyatride kullanılan anksiyolitik ajanların, kas gevşetici özelliği bulunan ajanların, antikonvülsan ajanların ve hipnosedatif ajanların birçoğu bu reseptör üzerinden etki gösterir. GABA-A reseptörü bir "ligand gated" iyon kanalıdır (ionotropik).

Kalsiyum ve sodyum gibi pozitif iyonların geçişine sebep olan ve eksitatuvar postsinaptik potansiyele sebep olan glutamatın tam tersine, GABA reseptörleri hücre membranında fazladan klor kanalları açarak hücre içine daha da fazla klor iyonu girmesine sebep olurlar (13, 28).

Böylece hücrenin uyarılabilirliği oluşan bu hiperpolarizasyon sebebiyle azalır ve inhibituar postsinaptik potansiyele sebep olurlar. Tüm bu olayların sonucunda aksiyon potansiyelinin başlaması için gerekli eşik dereceye ulaşamadığından GABA inhibituar etki yapar. Bu mekanizmalar basit görünse de GABA-A reseptörünün yapısı oldukça komplekstir. Alfa, beta, gamma, delta ve rho adlı multiple altbirimleri ve bu birimlerin kombinasyonları mevcuttur (1) (Şekil 13).

GABA_A receptor



Şekil 13. GABA-A reseptörü. BZs alanı benzodiyazepinlerin yapışma bölgesini, GABA alanı da GABA'nın yapışma bölgesini göstermektedir. (Jacob ve ark. , Nature Reviews Neuroscience 2008 'den alınmıştır.)

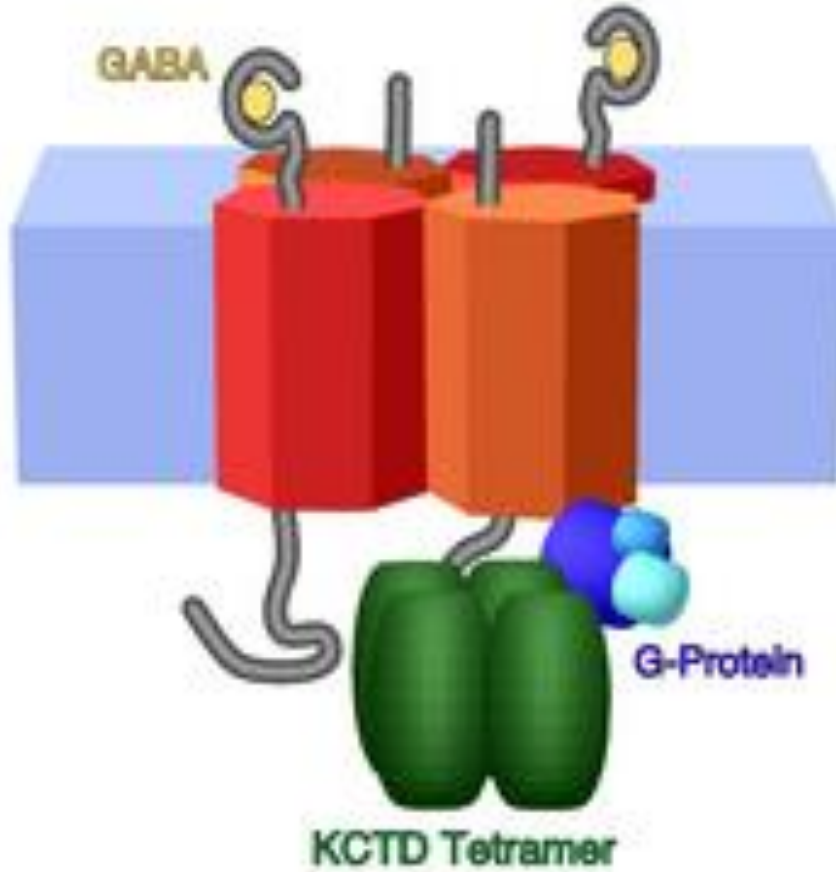
Bu alt birimler ion kanalını oluşturmakla kalmaz ayrıca hem GABA hem de alkol, benzodiazepinler ve bazı anestejik maddeler için de allosterik bağlanma alanları oluşturur. Bahsi geçen allosterik moleküller GABA kendi reseptörüne bağlanmışken etki gösterir ve bu etki GABAerjik uyarıyı artırıcı bir etkidir (28).

Bu allosterik bağlanma bölgeleri GABA etkinliğinin reseptör üzerinde artırmanın yanı sıra bazı terapötik veya yan etkilere de sebep olurlar. Örneğin bir benzodiazepine türevi tedavi için anksiyolitik etkileri sebebiyle seçilmiş olsa da kas gevşetici, sedasyon, ataksi ve kısa dönem hafıza sorunları ortaya çıkarır. Herhangi bir GABA reseptörünün ise hangi farmakolojik ajana nasıl tepki vereceği, reseptör molekülünün spesifik olarak hangi konfigürasyonda bulunduğuna bağlıdır. Çünkü bu kombinasyonların tipi, farmakolojik ajanın bağlanacağı allosterik bağlanma alanını belirler. Reseptörün yapısındaki farklı alt birimlerin kombinasyonlarının yanı sıra, bu alt birimlerin de kendi içlerinde varyasyonları mevcuttur. Bu da farklı tür benzodiazepinlerin veya barbitüratların etkilerinin neden değişebildiğini gösterir (13, 28).

GABAfilik farmakolojik ajanların hepsi GABAerjik etki oluşturmaz. Bicuculline gibi bazı ajanlar kompetitif antagonizma yolu ile GABA reseptörü bağlanma bölgesini GABA ile yarışarak bloke eder ve hücre içerisine bu yolla klor girmesini engelleyerek antagonistik etki gösterirler. Pikrotoksin de bir non-kompetitif GABA reseptör antagonistidir. GABA reseptörüne non kompetitif yolla bağlanır ve GABA reseptörünü tamamen bloke eder. Pikrotoksin'in yapışma bölgesi agonist GABA'nın yapıştığı yer değildir bu nedenle oluşturduğu etki negatif allosterik modülasyon olarak tanımlanır. Bicuculline ve pikrotoksin normal GABAerjik fonksiyonu sekteye uğrattıklarından nöbet tetikleyici özelliklere sahiptirler. Bu sebeple deneysel amaçlı kullanılırlar. Bunun dışında bir benzodiazepin antagonisti olan flumazenil ise benzodiazepin aşırı dozunda veya midazolam kullanılmış bir cerrahi işlem sonrası psikomotor aktivitenin normale döndürülmesinde terapötik amaçlı kullanılır (1,13).

2.3.4.2. GABA-B Reseptörleri

GABA-B Reseptörleri ise G proteinine bağılı metabotropik tür bir reseptör olup presinaptik veya post sinaptik bulunabilirler. GABA-A reseptörleri gibi iyon kanalı olmayıp ikincil mesajcı kullanırlar. Bazı iyon kanallarının geçirgenliğini artırarak hücre dışına potasyum çıkışıını kolaylaştırırlar, hücre içine sodyum veya kalsiyum girişini engellerler ve adenilil siklaz enzimini inhibe ederek cAMP oluşumunu engellerler. Tüm bu fonksiyonlar inhibitör niteliktedir (28) (Şekil 14).



Şekil 14. GABA-B reseptörü. GABA'nın yapışma alanlarını ve reseptörün G-proteini bağılı olduğunu göstermektedir. (University of Freiburg Copyright)

GABA-A reseptörlerinden daha az bilinmekle birlikte GABA-B reseptörlere affinitesi bilinen farmakolojik ajanlar mevcuttur. Bunlara en iyi örnek baklofen'dir. Baklofen antispazmotik etkinliği olduğu bilinen bir ajandır. GABA-B reseptörleri metabotropik olduklarından oluşturdukları cevap daha geç ortaya çıkar ancak daha uzun sürelidir (37).

2.3.4.3. GABA-C Reseptörleri

GABA-C reseptörleri diğer alt tiplerle kıyasla daha yeni bir buluş olup yoğun olarak omurgalı retinasında mevcuttur. Bu reseptöre GABA, muscimol ve cis veya trans-aminokrotonik asit bağlanır. Bu reseptör alt tipi baklofen veya bicuculline maddelerini bağlamaz. Retina dışında GABA-C reseptör alt tipi hippocampus ve neokorteks yapılarında da yoğun olarak görülür. Agonist madde bu reseptöre yapıştığında bir klor ionoforu aktive olur. Buna ek olarak serotonin ve glutamat gibi nörotransmitterlerin kendi reseptörlerine bağlanarak miktarını artırdıkları diaçil gliserol, GABA-C reseptörlerini fosforilleyerek inaktive ettikleri bilinmektedir (1, 27).

2.3.5. GABAerjik Nöronların Santral Sinir Sistemi Dağılımı

GABA ve reseptörlerinin dağılımı glutamat'a benzer şekilde santral sinir sisteminde yaygın bir dağılıma sahiptir ancak Periferik sinir sisteminde bu dağılım daha sınırlıdır . GABAerjik nöronlar özellikle cerebrum ve cerebellum'da yaygınken GABA'ya benzer bir inhibitör nörotransmitter olan glisin daha çok beyin sapı ve Medulla spinalis'te yaygındır. Santral Sinir Sistemindeki GABAerjik nöronların büyük bir çoğunluğu lokal sinir bağlantılarında görev alan kısa internöronlardır (13).

Bu bölgelerdeki görevleri ya post sinaptik nöronlara inhibituar etkidir ya da presinaptik GABA reseptörleri üzerinden bölgedeki GABA ve benzeri nörotransmitterlerin sentez veya salınımlarını inhibe etmektir (28).

Tüm bu lokal bağlantılar dışında projeksiyon nöronları da nörotransmitter olarak GABA'yı kullanabilir. Cerebellum'un purkinje hücreleri, nucleus caudatus, putamen ve globus pallidus yapılarında bulunan nöronların büyük bir kısmı GABAerjiktir. Spesifik alt birimlerin mevcudiyeti veya kombinasyonları gibi GABAerjik reseptörlerin santral sinir sisteminde buldukları bölgelerdeki değişiklikler, GABA'nın beyindeki etkisinin neden bu denli farklılık gösterebileceğini veya çeşitli ilaç gruplarına olan hassasiyetin neden bu derece farklı olabileceğini göstermektedir (38).

GAD-65 ve GAD-67 nin beyindeki dağılımına bakılacak olursa GAD-65'in sinaptik teminal yerleşimli olduğu, GAD-67'nin ise terminallerde, hücre somalarında ve dendritlerde mevcut olduğu görülmüştür (39).

Sıçanlarda yapılan in situ hibridizasyona dayalı çalışmalarda medial septumda GAD-67, GAD-65 isoformuna kıyasla daha yoğun gözlemlenmişken, LS'de GAD-65 ve GAD-67 birbirine benzer oranda gözlemlenmiştir (39).

GAD-65 mRNA seviyeleri, diagonal band nukleusunda, stria terminalis bed nukleusunda, nucleus lateralis dışındaki tüm amygdala nukleuslarında, corpus geniculatum laterale'de, superior colliculus ve pontine nukleuslarda daha baskın gözlemlenmişken, GAD-67 mRNA bulbus olfactorius, korteks, septum, globus pallidus, inferior colliculus ve cerebellumda enzimin GAD-65 izoformuna göre daha baskın olduğu tespit edilmiştir (39).

2.3.6. GABA'nın davranış üzerindeki muhtemel rolü

GABA'nın ana inhibitör nörotransmitter olması ve daha çok internöronlarda bulunması GABA'yı elementer düzeyde stimulusların, bağlantıların ve üretilen cevapların süzgeçten geçirilmesinde görev alan bir nörotransmitter olarak düşünmemize sebep olur. GABA beyindeki tüm eksituar mekanizmaları kontrol eden ve eksituar dengeyi sağlayan nörotransmitterdir. Tüm bu nöronal deşarj ihhibisyonu görevi dışında özellikle GABA-B reseptörleri diğer nörotransmitterlerin salınımını kontrol etmenin yanında çeşitli hormonların salınımlarını düzenleyerek endokrin sistem üzerinde de etkiye sahiptir (1). Beklenenin aksine bazı durumlarda GABA belli nörotransmitterlerin salınımını inhibe etmek yerine artırmaktadır. Buna depresyon patogenezinde azalmış olan mono aminler iyi bir örnektir. Depresyon patogenezinde lokal sinir bağlantılarında GABA deplesyonu olduğu gösterilmiştir. Sonuç olarak GABA'nın anksiyoliz, sedasyon, nöbet kontrolü ve kas gevşetici etkileri temeldir (40).

2.3.7. GABAerjik Sisteme Etkili ilaçlar ve Klinik Özellikleri

2.3.7.1. Barbituratlar

Etil alkolden sonra GABA-A reseptörleri üzerine etkili bulunan ilk farmakolojik ajandır. Hipnosedatif ve anti konvulzan etkileri vardır. Epilepsinin bazı türlerinde ve çeşitli cerrahi girişimlerde anestezi ve sedatif olarak kullanılırlar. Günümüzde benzodiyazepinler daha güvenli olduklarından aksiyete ve uyku bozuklukları tedavisinde barbituratlara tercih edilirler. Barbituratlar benzodiyazepinlere göre daha fazla tolerans ve bağımlılığa sebep olurlar (41).

Bunlara ilave olarak çok daha yüksek aşırı doz ve solunum depresyonu riski taşırlar. Barbituratlar düşük dozda benzodiazepinler gibi davranarak GABA-A reseptörü üzerinden hücreye klor girişini artırır. Yüksek dozda ise GABA'dan bağımsız olarak klor kanallarını açar .Bu nedenle yüksek doz kullanıldıklarında etkinlikleri sadece ilacın konsantrasyonuna bağlıdır dolayısıyla artmış risk de buna bağlıdır (1).

2.3.7.2. Benzodiyazepinler

Benzodiyazepinler iyonotropik GABA-A reseptörü üzerinde alfa ve gamma2 alt birimlerinin hemen komşuluk yaptığı bölgede bulunan yüksek derecede spesifik bağlanma gösteren bağlantı noktasına yapışarak fonksiyon görürler. Bu bölgeler benzodiyazepin reseptörü olarak da adlandırılırlar. Benzodiyazepinler reseptörlerine yapıştıklarında GABA'nın GABA-A reseptörü üzerine etkinliğini artırır. Sonuç olarak GABA-A reseptörü daha uzun süre açık kalarak hücre içine daha fazla klor iyonu sokar ve hücrenin eksitabilitesi azalır.Barbituratlara benzer anksiyolitik ve sedatif etkileri olmasına karşın GABA'dan bağımsız klor kanallarını açamadıkları için barbituratlardan daha güvenlidirler (41).

Benzodiyazepinler generalize anksiyete bozukluğunda, panik bozuklukta, fobilerde, uyku bozukluklarında akut psikozlarda ve nöbetlere müdahalede sıklıkla kullanılırlar. GABA-A reseptörü üzerindeki allosterik bağlanma noktalarına bağlanırlar ve GABA varlığında iyonotropik reseptörün açılıp hücre içine klor girişini kolaylaştırırlar (42).

2.3.7.3. Alkol

Alkolün GABA-A reseptörü üzerinde benzodiazepinbağlanma bölgesine benzer bir bağlanma noktası mevcuttur. Bu bölgeye bağlandığında benzodiyazepinlere benzer şekilde GABA'nin inhibisyon etkisini artırır. Bu mekanizma alkol intoksikasyonu sonucu ortaya çıkan sedasyon, motor inkoordinasyon, kognitif fonksiyon bozuklukları ve konuşma bozukluklarını açıklamaktadır. Buna ek olarak kronik alkol alımı sonucu GABA reseptörlerinde bir "down regülasyon" oluşur. Bu etki alkol geri çekilme sendromu bulgularından sorumlu tutulmaktadır. Kronik alkol kullanımı sonucu tolerans, bağımlılık ve ani kesilmede geri çekilme bulguları görülür. Tüm bunlara benzer bulgular benzodiyazepin türevi ajanlar için de geçerlidir (13, 41).

2.3.7.4. GABA pentin ve Vigabatrin

GABA pentin bir GABA agonisti olarak üretilmiştir ancak daha sonraları antiepileptik etkileri sebebiyle daha çok antiepileptik olarak kullanılmaya başlanmıştır. Ayrıca nöropatik ağrı durumlarında ağrı kesici olarak kullanılmaktadır. Lipofilik bir kimyasal halkaya bağlı GABA'dan oluşan bu maddenin bir GABA agonist olarak bulunması GABA etkisini taklit ettiği düşüncesini oluşturmuş olsa da hücre kültürlerinde GABA fonksiyonunu taklit ettiği gösterilmemiştir. GABA salınımını artırdığı ve bu yolla etki ettiği düşünülmektedir (43). Vigabatrin ise GABA'yı yıkan GABA transaminaz enzimini geri dönüşümsüz inhibe ederek etkinliğini gösterir. Antiepileptik grup ilaçlar içerisinde (41, 42).

3. ARAÇ VE YÖNTEM

3.1. Fare Beyinlerinin Temini

Çalışmamızda, Oxford Üniversitesi Farmakolojik Nöroanatomî Birimi'nden elde ettiğimiz, postnatal 21 ila 23 günlük 5 adet glutamik asit dekarboksilaz 65 Kda GFP (Green Fluorescent Protein) “knock-in” ve 3 adet glutamik asit dekarboksilaz 67Kda “knock-in” farelerden elde edilmişmiş beyinler kullanılmıştır. Bu fareler Oxford Üniversitesi Farmakolojik Nöroanatomî Birimi'nde postnatal 21. ila 23. günde, 60mg/kg ketamin-HCl ve 5 mg/kg Ksilazin-HCl kullanılarak intraperitoneal enjeksiyonla anestezi altında transkardiyak perfüzyon işleminden geçirilmiştir. Transkardiyak perfüzyon işleminde % 0.9 NaCl sonrası 0.1 M fosfat tamponu (pH=7.4) içerisinde %4 paraformaldehit solüsyonu kullanılmıştır. Perfüzyon işlemi sonrası farelerin beyinleri çıkarılmış ve kryoprotektan sıvı içerisinde bölümümüze gönderilmiştir.

3.2. Fare Beyinlerinden Kesit Alma İşlemi

Bölümümüze ulaşan beyinler (n= 8) koronal ekseninde kaudal kısımlarından yaklaşık 5mm, rostral kısımlarından da yaklaşık 3mm trimlendikten sonra, kesit alınacak olan blok rostral kısım yukarı bakacak şekilde kryojel kullanılarak tablaya yapıştırılmış, beyinlerin sol tarafına bistüri ucuyla işaret konup, koronal ekseninde rostralden kaudale doğru -21°C 'de, MICROM marka HM 430 model mikrotomda 40 mikron kalınlığında seri şekilde kesilmiştir ve 0.1 M fosfat tamponu'na (pH=7.4) alınmıştır.

3.3. Elde Edilen Kesitlerin Boyanması

40 mikron kalınlığında seri kesitlerden area septalis içerisinde bulunanlar tespit edilmiş ve 5 kesitten bir tanesi sırayla alınıp Anti-GFP protokolüne göre (Tablo 2) 3 kez 0.1 M fosfat tamponu'nda (pH=7.4) 10'ar dakika yıkandıktan sonra %1 hidrojen peroksit solüsyonunda 30 dakika boyunca yıkanmıştır. Daha sonra kesitler 1/400 oranında Molecular Probes marka anti-GFP tavşan poliklonal antikor Alexa Fluor 488 konjugattan, %0.3 oranında PBS-TritonX ve %1 oranında non-immun eşek serumundan hazırlanmış primer antikor solüsyonunda karanlıkta 12 saat bekletilmiştir.

0.1M Fosfat Tamponu (Sigma Aldrich P4417)	3 Kez, 10'ar dakika
%1 Hidrojen Peroksit	30 dakika
Primer Antikor Safhası 1/400 Anti-GFP (Molecular Probes A21311) %0.3 PBS-TritonX (Merck 108643) %1 Non-immün serum (Sigma D9663)	12 saat (Karanlık)

Tablo 2. Anti-GFP protokolü

3.4. Kesitlerin Değerlendirilmesi

Primer antikor safhasını bitirmiş olan kesitler jelatinli lamlara alınmış ve kurumaları için oda sıcaklığında ve karanlıkta bir gece bekletildikten sonra Fluoromount kullanılarak kapatılmıştır. Bir gece kurumaları beklendikten sonra, OLYMPUS marka BH2-RFL-T3 florasan burner entgre edilmiş OLYMPUS marka BX51 model mikroskopta, 452-490 nanometre dalga boyu duyarlı UMWIBA3 kodlu filtre kullanılarak görüntülenmiş, X2, X10,X40 ve X60 büyütmelerde OLYMPUS marka DP73 model kamera ile fotoğraflanmış ve DP73 model kameranın kendi bilgisayar yazılımı kullanılarak değerlendirilmiştir ve hücre ölçümleri yapılmıştır.

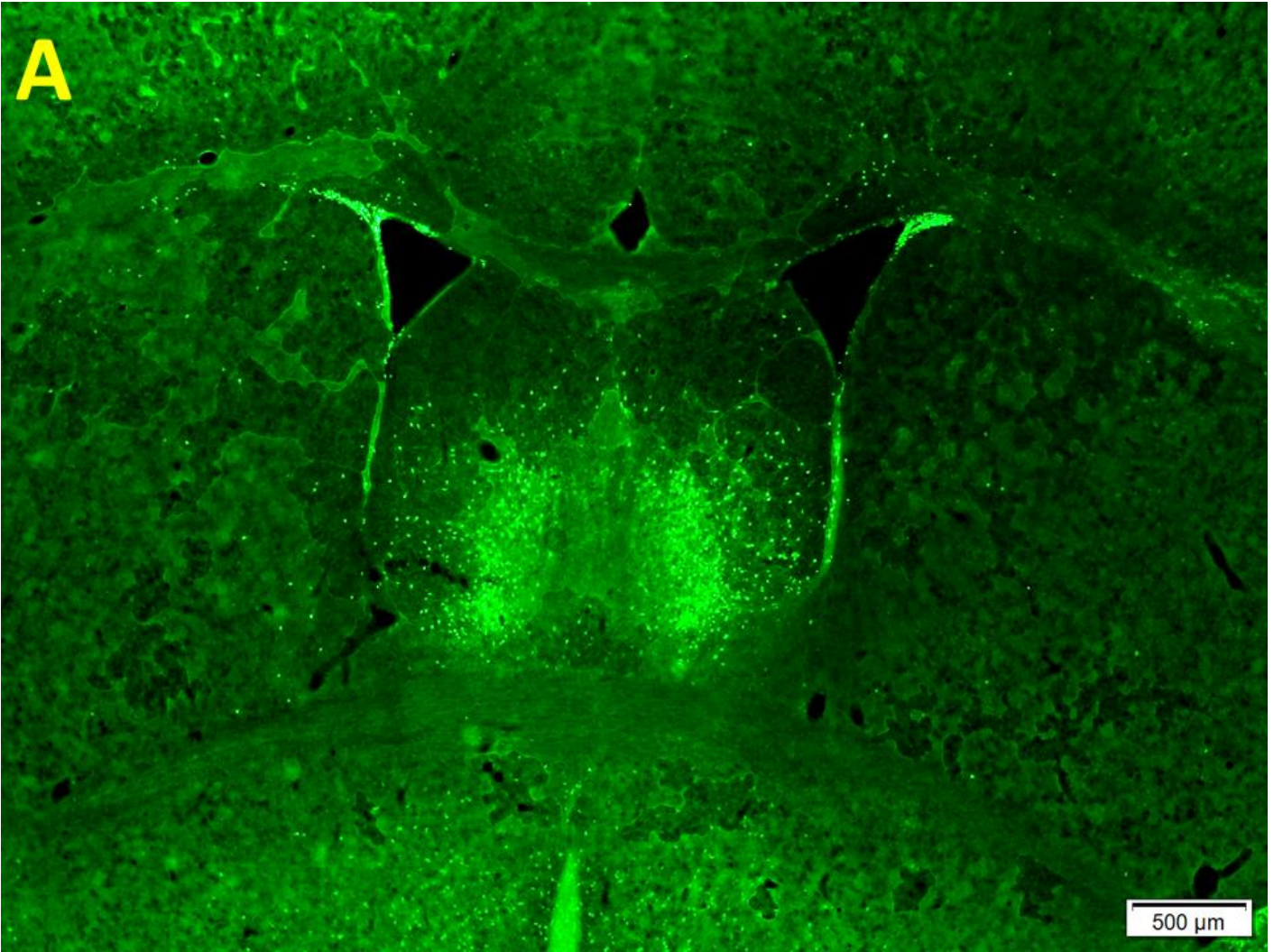
3.5. İstatistiksel İncelemeler

Elde edilmiş olan görüntüler üzerinden beyinlerin sağ ve sol hemisferlerinde, 5 kesitte bir LS ve MS bölgelerinde Anti-GFP (+) boyanmış hücre sayımları yapılmıştır. Daha sonra bu sayımların her örnek için ortalama hücre sayıları belirlenmiştir. GAD-65 ve GAD-67 örneklerin LS'lerinde bulunan ortalama Anti-GFP (+) hücre sayıları GraphPad Prism 6 programı kullanılarak, unpaired two tailed t-test metoduyla karşılaştırılmıştır. Aynı yöntem örneklerin MS'deki ortalama Anti GFP (+) hücre sayıları için de uygulanmıştır. Buna ek olarak GAD-65 ve GAD-67 farelerin LS ve MS bölgeleri kendi içlerinde sağ ve sol hemisferler olarak karşılaştırılmıştır. (GraphPad Prism version 6.00 for Windows, GraphPad Software, San Diego, California, USA, www.graphpad.com)

4. BULGULAR

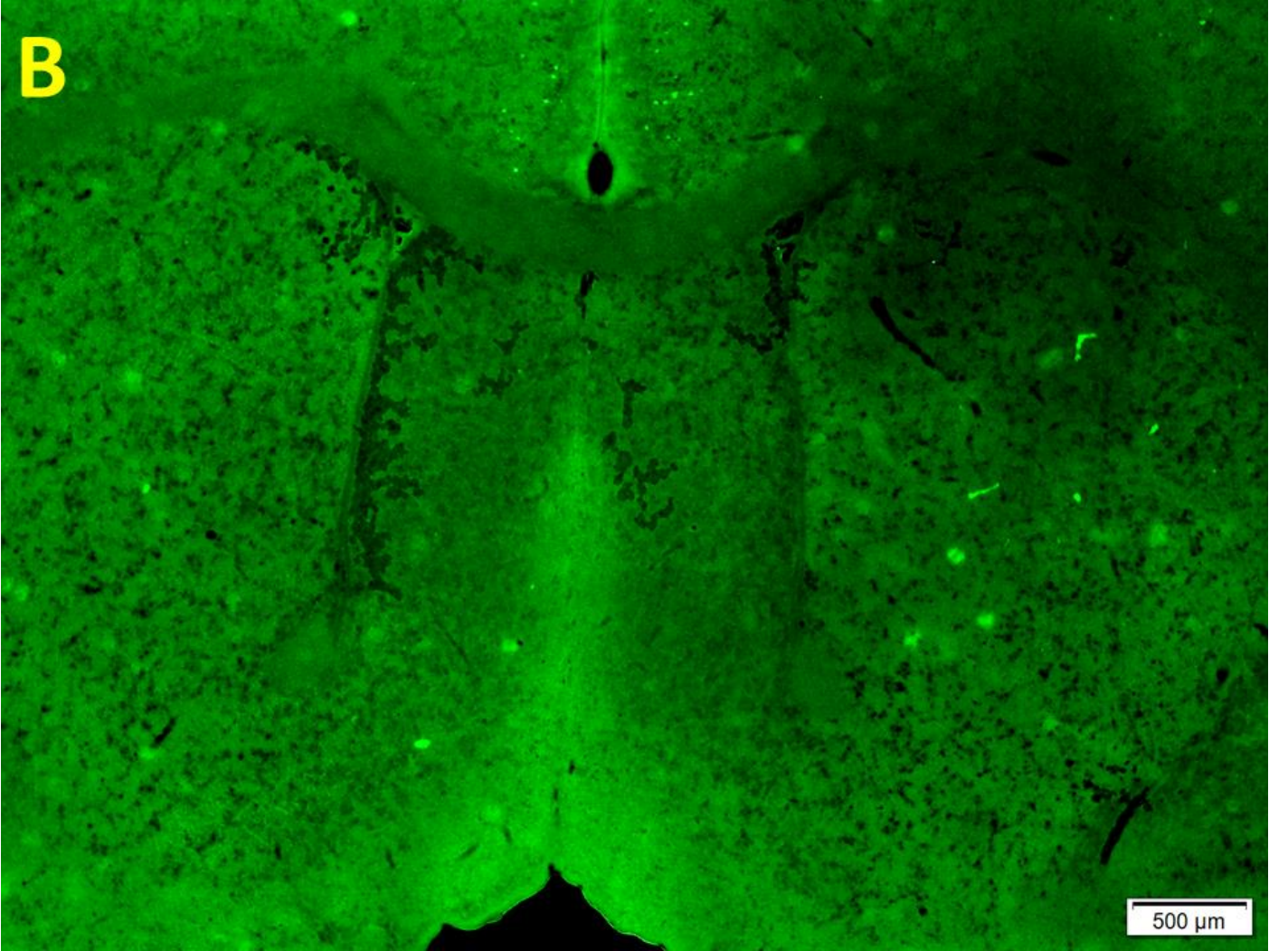
4.1. Kesit Görüntüleri

Kesitlerin florasan mikroskop altında değerlendirilmesinde GAD-65 kesitlerinin, area septalis'de GABAerjik nöronların 2X büyütmede noktasal şekilde yoğun ışımalar gösterdikleri tespit edilmiştir (Şekil 15A).

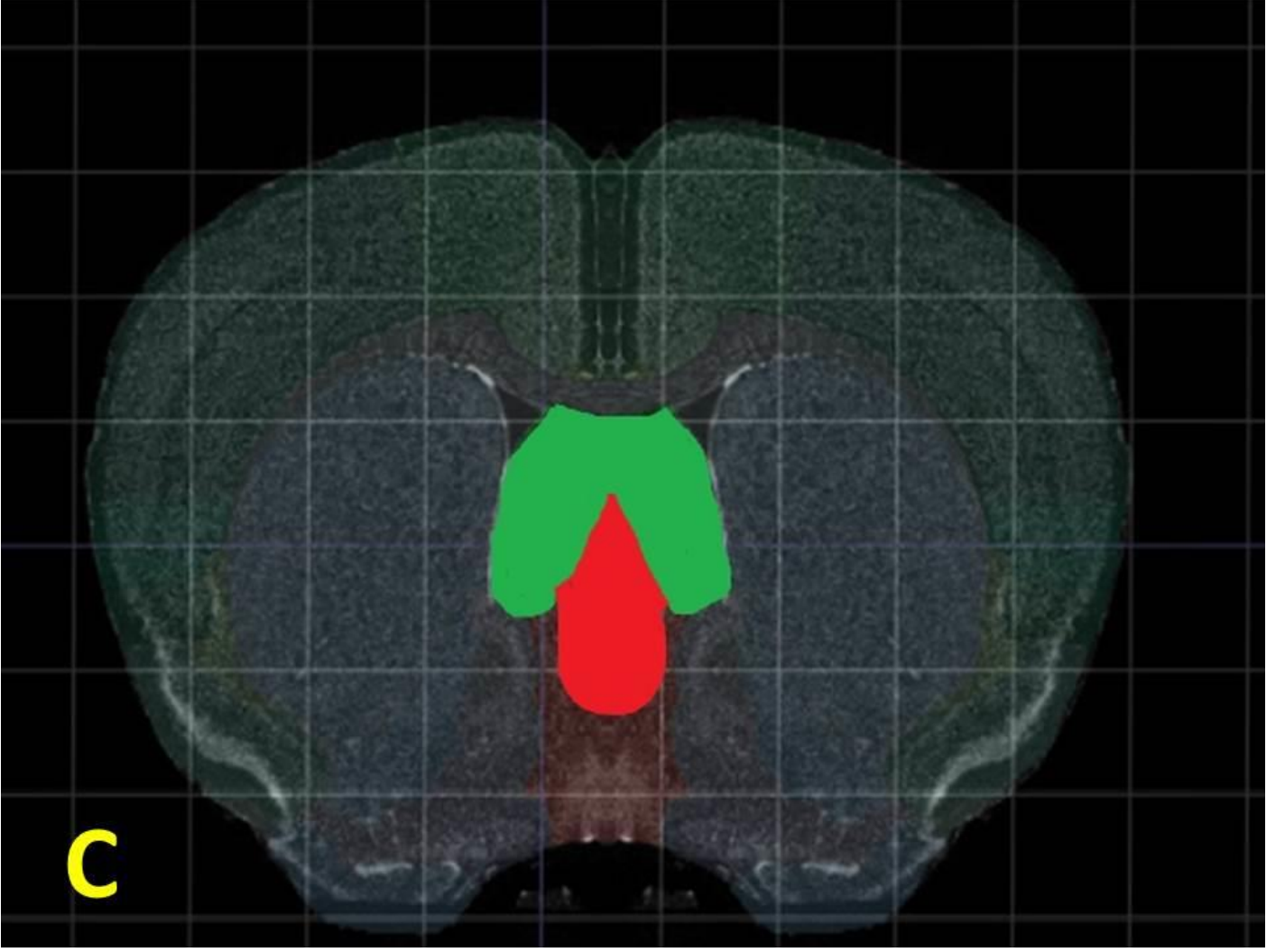


Şekil 15A. 2X büyütmede GAD-65 area septalis boyanması.

Bu ışımalar daha çok LS kısmında göze çarpmaktadır. Daha büyük magnifikasyonlarda MS'de de GABAerjik nöronlar net olarak tespit edilmiştir (LS ve MS lokalizasyonları için Şekil 15C'ye bakınız). Ancak sayısal olarak LS GABAerjik hücrelerinden daha düşük olarak tespit edilmiştir. Bu durumla ilgili sayısal bilgiler istatistik değerlendirme bölümünde ortaya konacaktır. 2X büyütmede GAD-67 kesitler incelendiğindeyse, bu küçük magnifikasyonda GAD-65 kesitlerine kıyasla net ışımalar gözlenmemektedir (Şekil 15B).

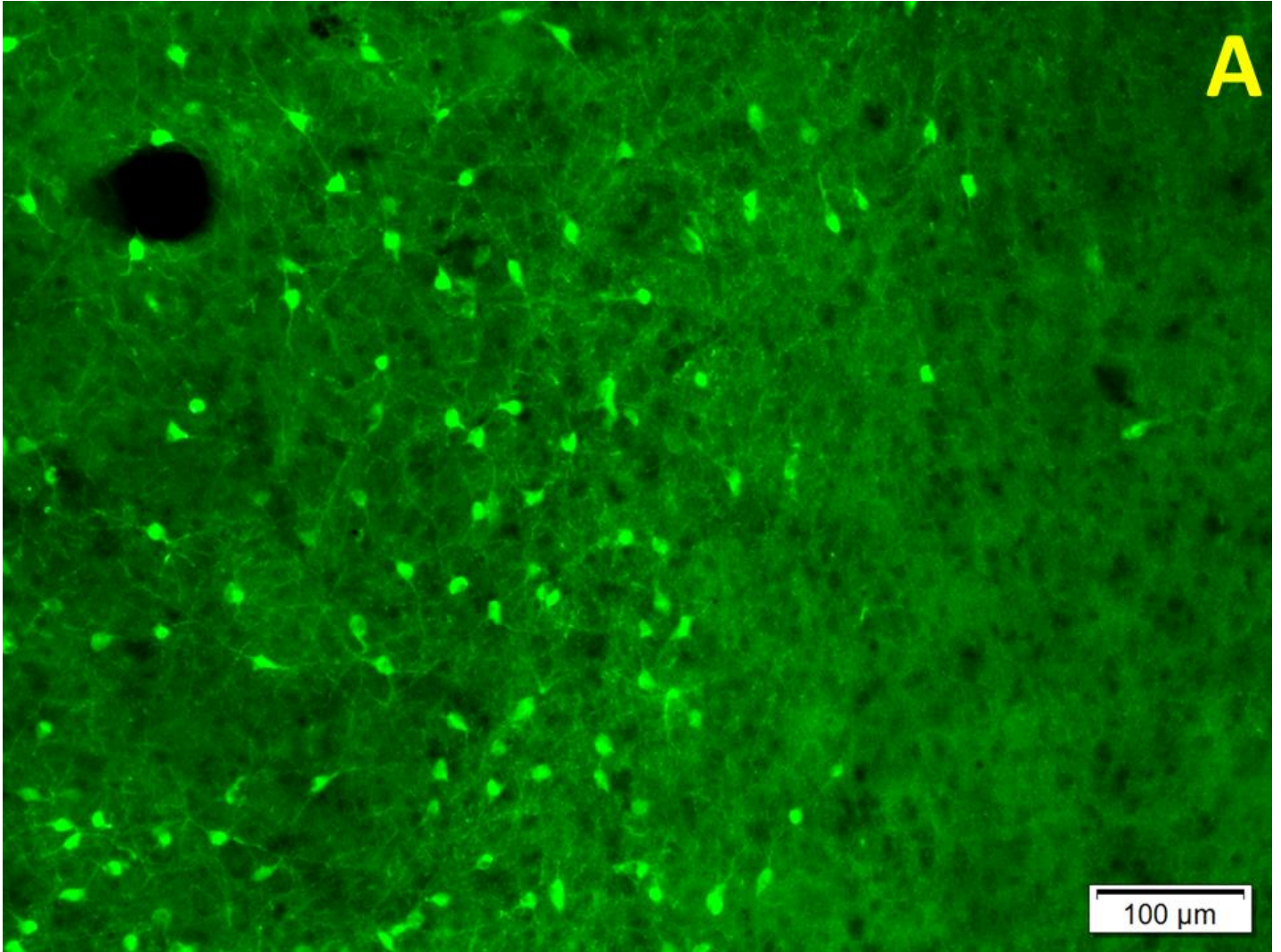


Şekil 15B: 2X büyütmede GAD-67 area septalis boyanması

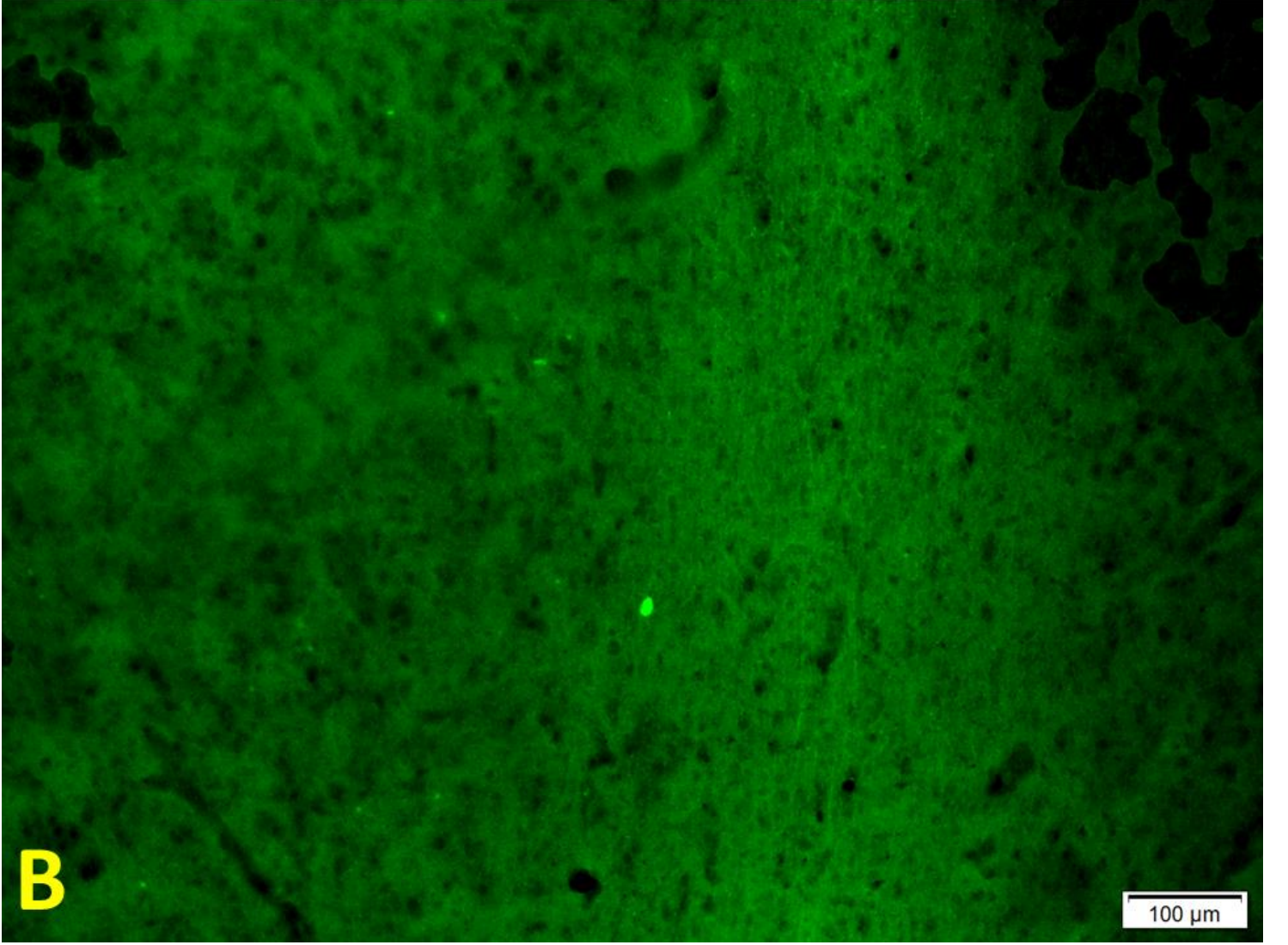


Şekil 15C: Farede koronal kesit area septalis lokalizasyonu, yeşil Nucleus Septalis Lateralis, kırmızı Nucleus Septalis Medialis.(Allen 3D Mouse Brain Atlas üzerinden modifiye edilmiştir.)

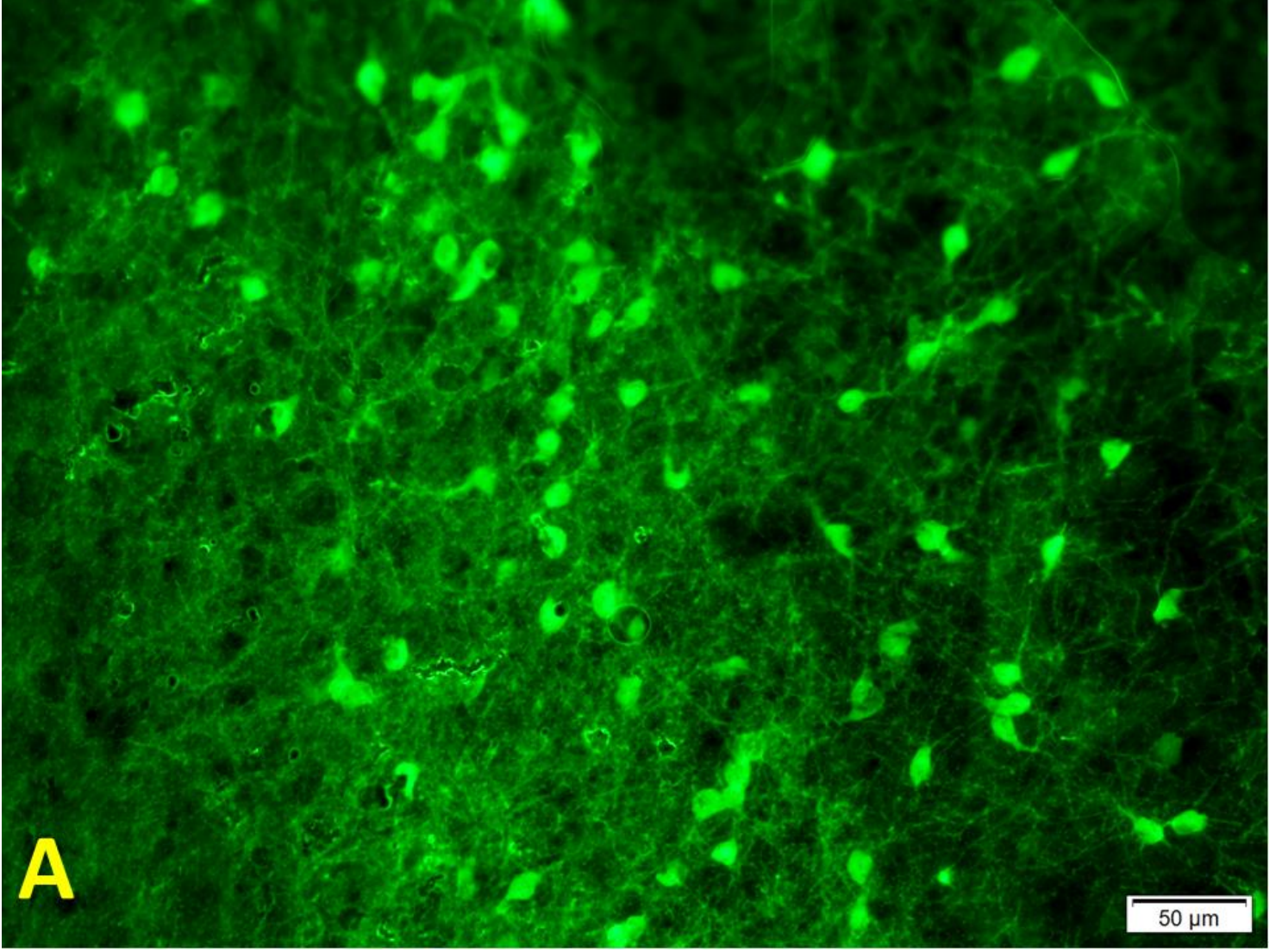
GAD-65 kesitlerinin 10X ve 20X magnifikasyonda değerlendirilmesine bakıldığında, GABAerjik nöron morfolojisinin netleşmeye başladığı göze çarpmaktadır. Bu magnifikasyonda da GABAerjik nöronların yoğunluk bakımından LS'de daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. LS'nin ventral ve intermedius kısımlarında GABAerjik nöronların daha iç içe ve yoğun oldukları, LS'nin dorsal kısmında ise seyrekleşmeye başladıkları gözlemlenmektedir (Şekil 16A ve Şekil 17A). GAD-67 kesitlerin 10X ve 20X magnifikasyonda değerlendirilmesinde ise area septalis bölgesinde tek tük GABAerjik nöron ışımaları gözlemlenmektedir (Şekil 16B ve Şekil 17B).



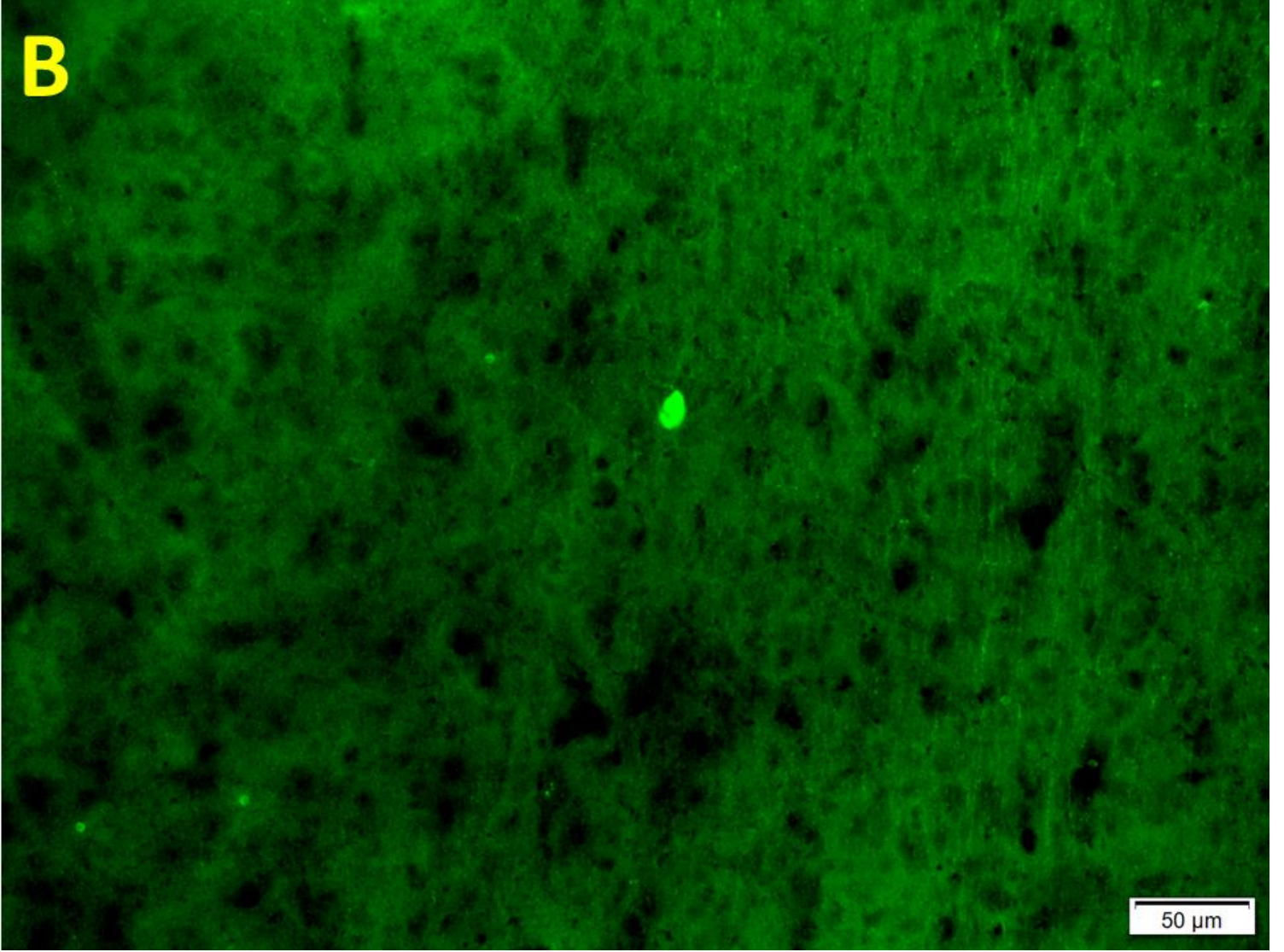
Şekil 16A: 10X büyütmede GAD-65 area septalis boyanması



Şekil 16B: 10X büyütmede GAD-67 Area Septalis boyanması

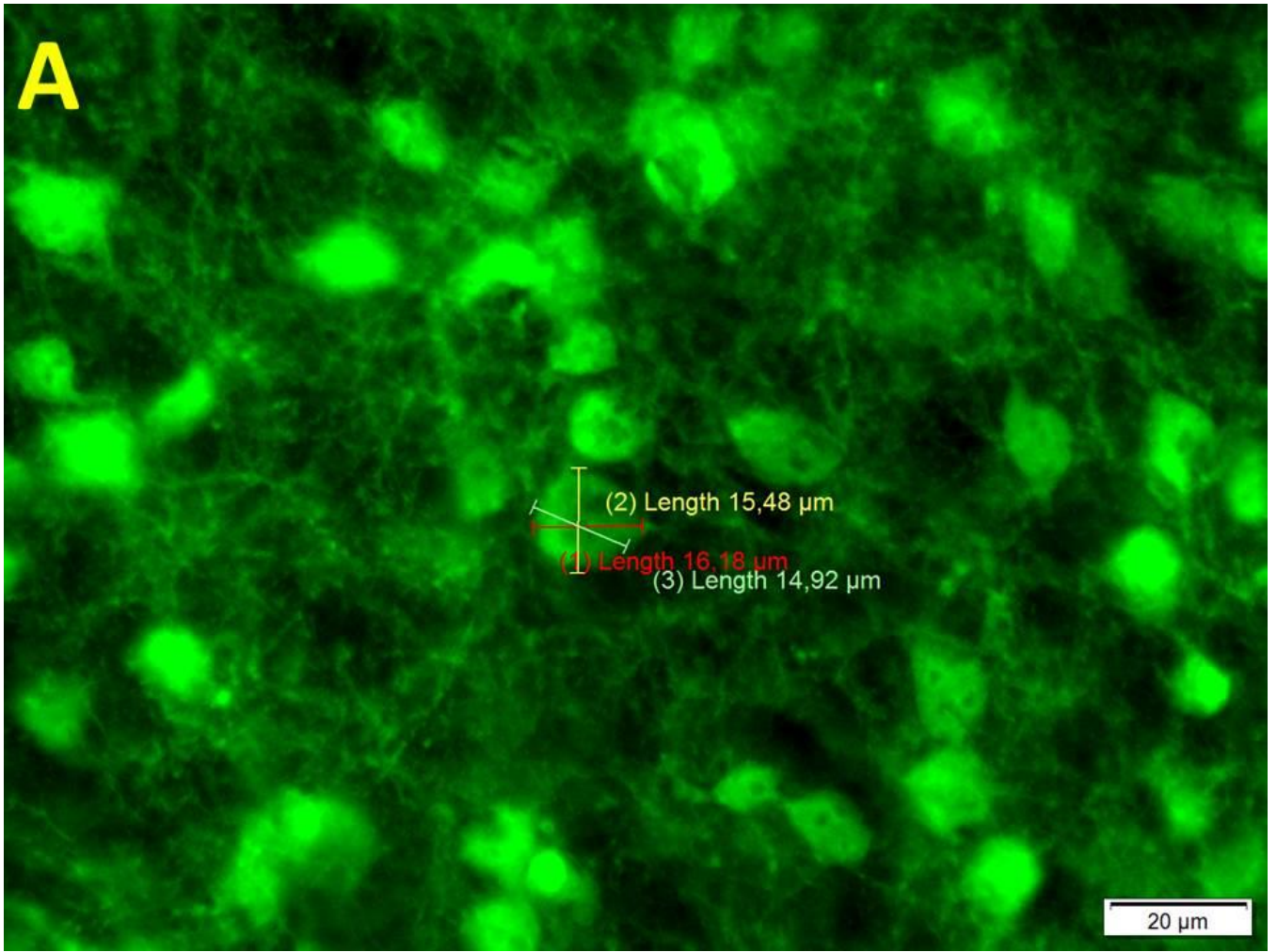


Şekil 17. A: 20X büyütmede GAD-65 area septalis boyanması



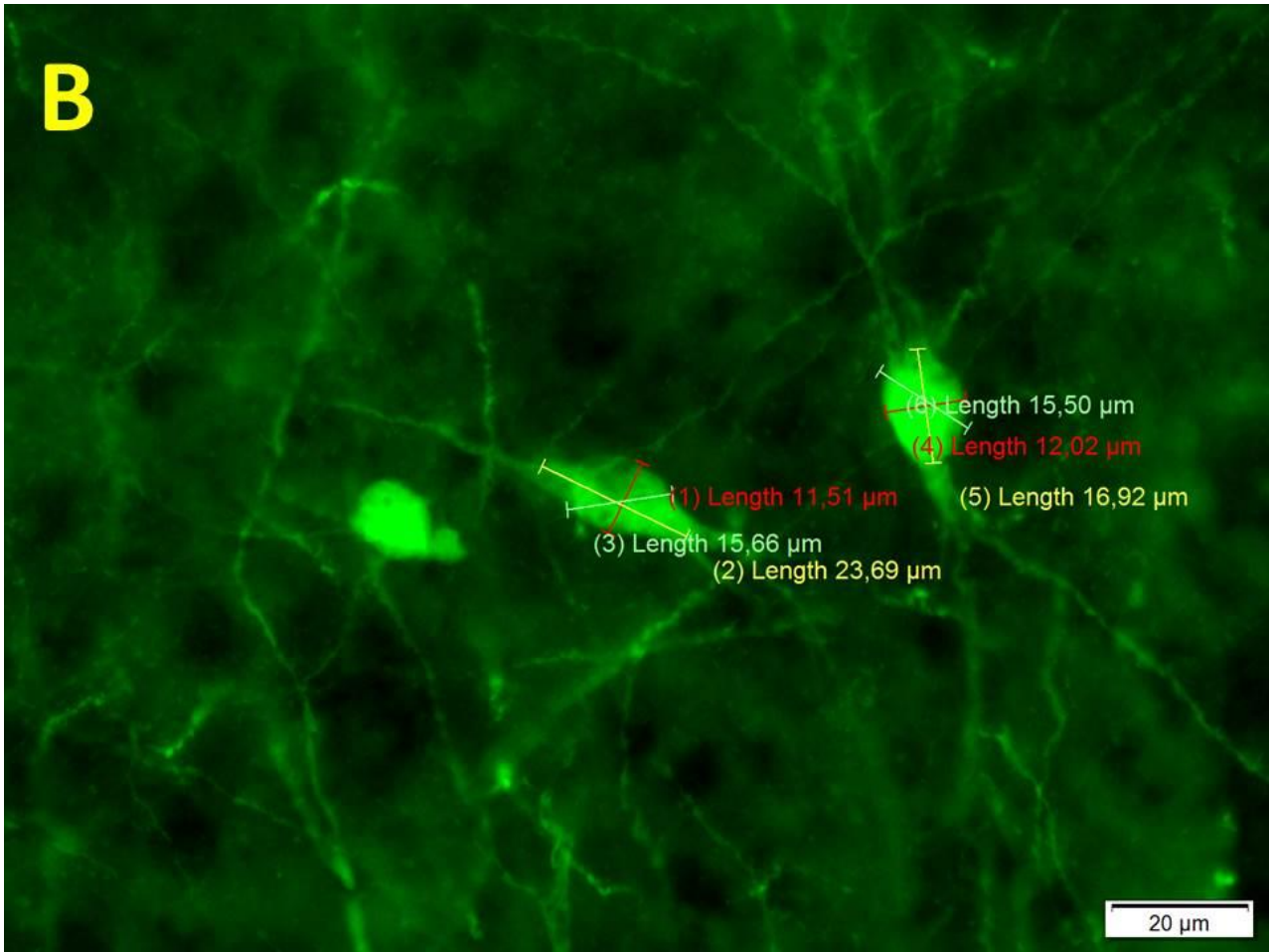
Şekil 17B: 20X büyütmede GAD- 67 area septalis boyanması.

GAD-65 kesitlerinin 60X magnifikasyonda değerlendirilmesinde ise artık GABAerjik nronların morfolojisinin netleştii görölmektedir. Bu magnifikasyonda area septalis'de LS'nin ventral kısmında ve MS GABAerjik nronlarının (LS'de sayıca daha yoğun olmakla birlikte) morfolojik olarak birbirlerine benzedikleri görölmektedir. Bu bölgedeki GABAerjik nronların boyutlarına bakıldığında ortalama 15µm çapında oldukları gözlenmiştir (Şekil 18A).



Şekil 18A: 60X büyütmede GAD-65 area septalis LS dorsal bölge boyanması ve bu bölgeden GABAerjik nron çapı ölçümü.

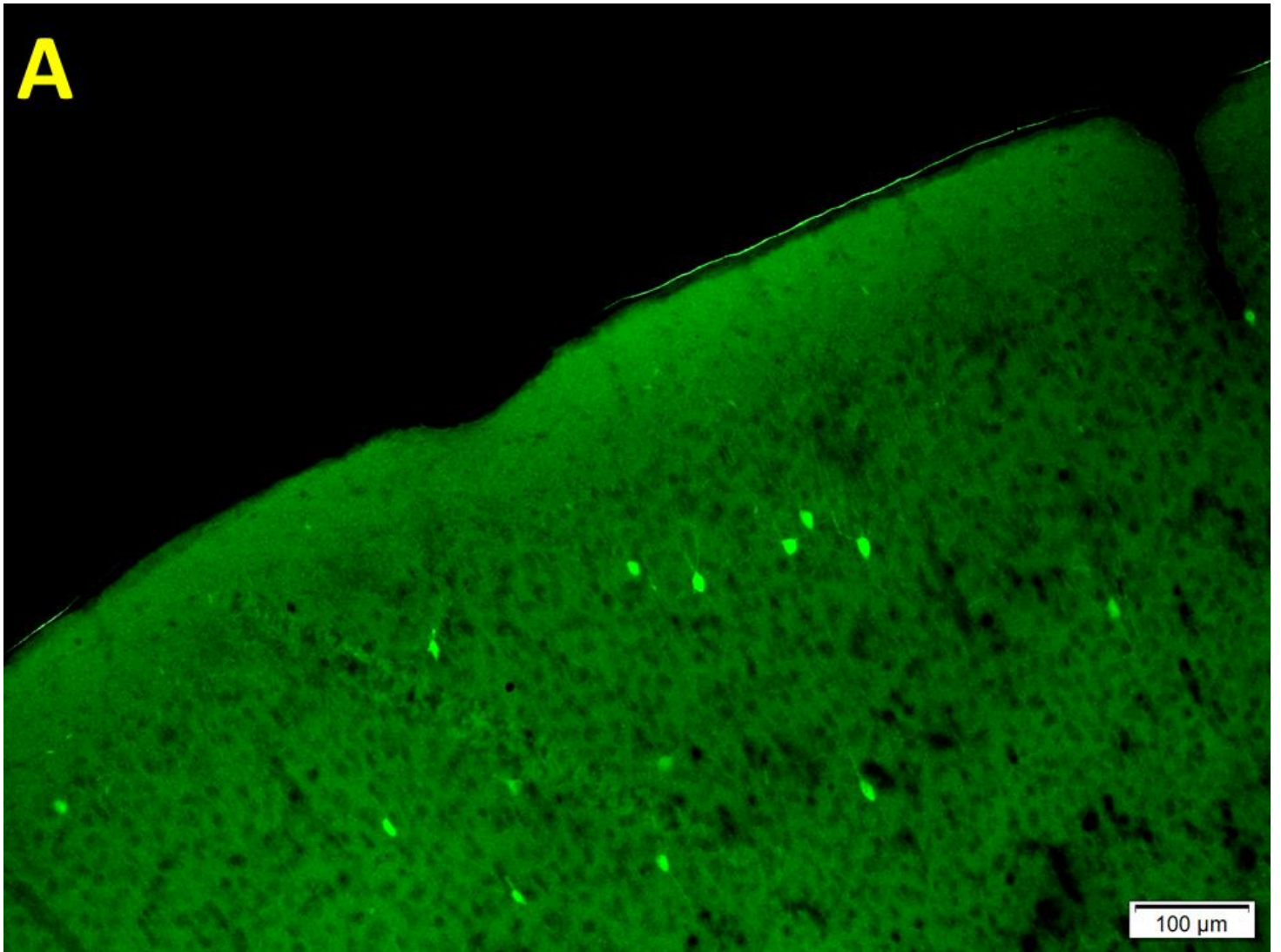
LS dorsal kısmında tespit edilen GABAerjik nöronlara bakıldığında ise intermedius ve ventral kısımlara göre hem sayıca daha az hem de iç içe geçmemiş şekilde bir dağılım gösterdikleri tespit edilmiştir. Dorsal kısımdaki GABAerjik nöronların boyutlarına bakıldığında area septalis'in diğer alanlarına benzer şekilde yaklaşık 15µm çapında nöronlarla karşılaşmıştır. Ancak bu bölge nöronlarının diğer bölgelere kıyasla dendritik veya aksonal arborizasyonlarının daha fazla olduğu ve bu yapıların daha uzun olduğu gözlemlenmektedir (Şekil 18B).



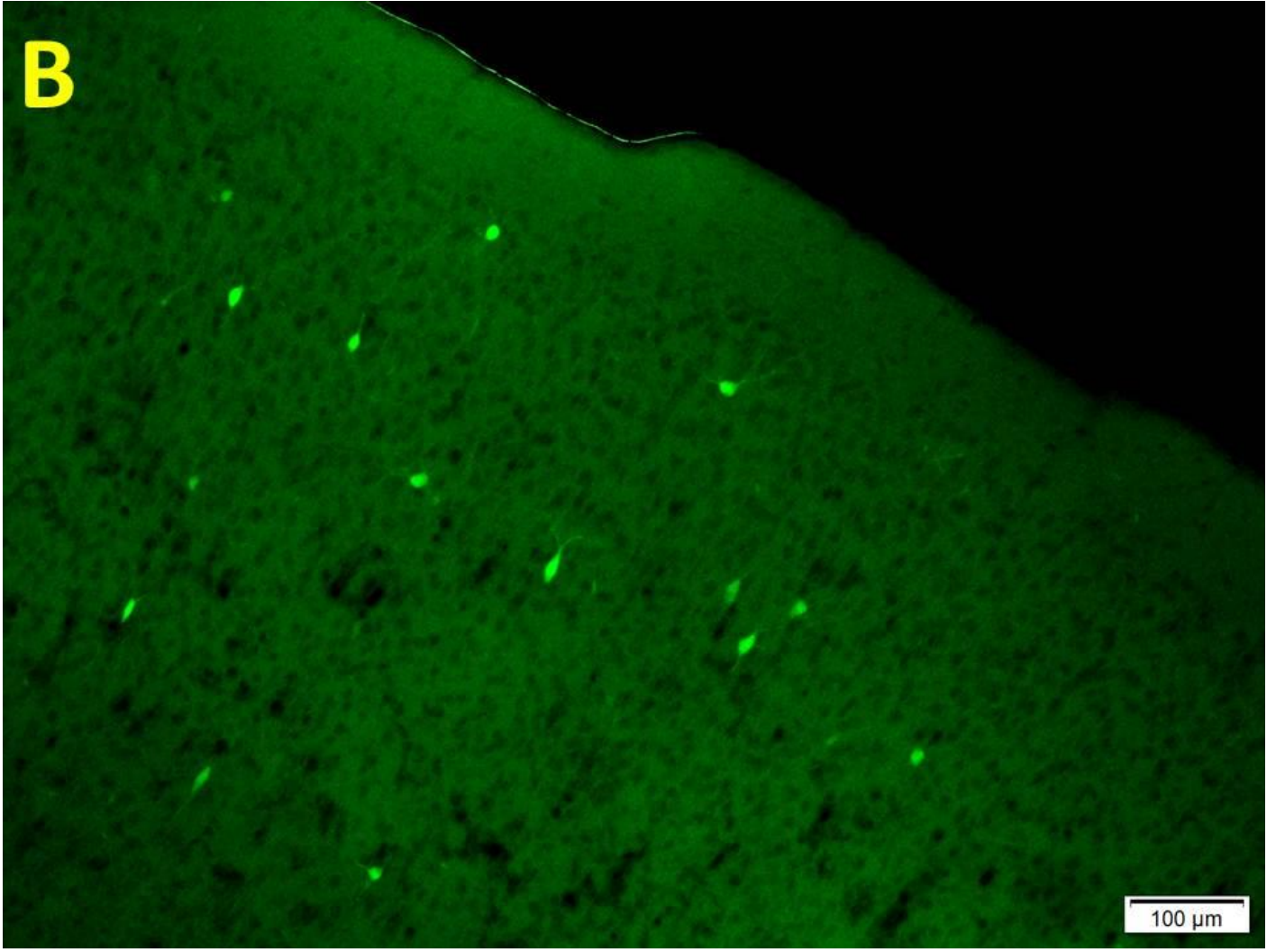
Şekil 18B: 60X büyütmede GAD-65 area septalis LS ventral bölge boyanması ve bu bölgeden GABAerjik nöron çapı ölçümü.

GAD-67 kesitlerinin 60X magnifikasyonda incelenmesinde ise yok denecek kadar az ışımalar gözlemlenmiş ve nöron boyutları veya dendritik arborizasyonları açısından değerlendirme yapılamamıştır.

GAD-65 ve GAD-67 kesitlerinin kortikal bölgeleri değerlendirildiğinde ise her iki alt tip enzim grubunda boyanma açısından bir fark bulunmamıştır. Özellikle GAD-67 grubu kortikal boyanmaların mevcudiyeti GAD-67 “knock-in” işleminin başarılı olduğunu ve GAD-67 grubunda yanlış negatif boyanma olmadığını göstermektedir (Şekil 19A ve 19B).



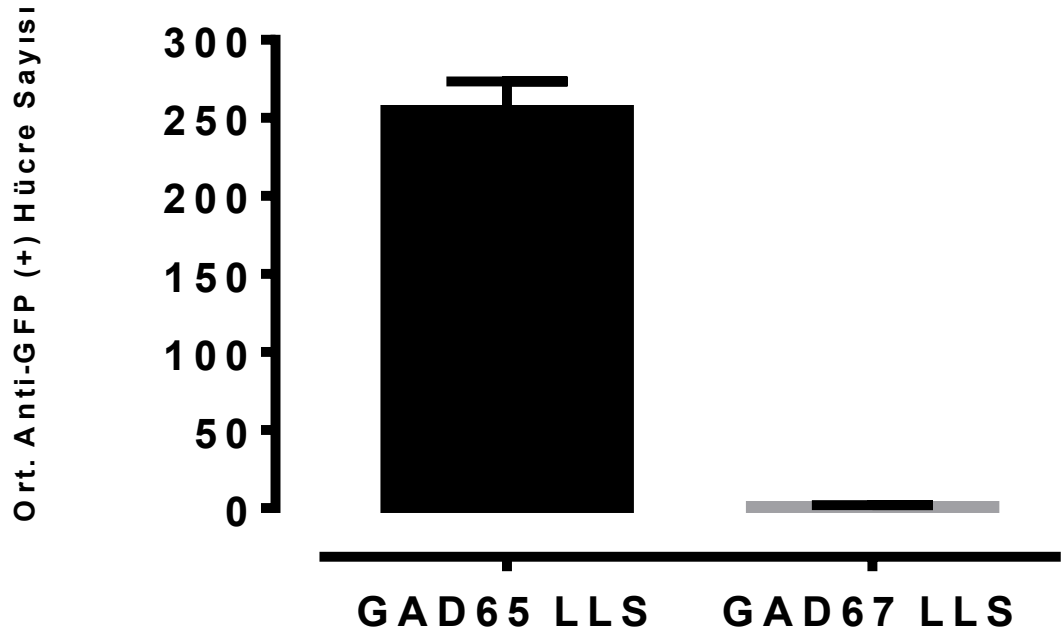
Şekil 19A: 10X büyütmede GAD-67 korteks boyanması.



Şekil 19B: 10X büyütmede GAD-65 korteks boyanması.

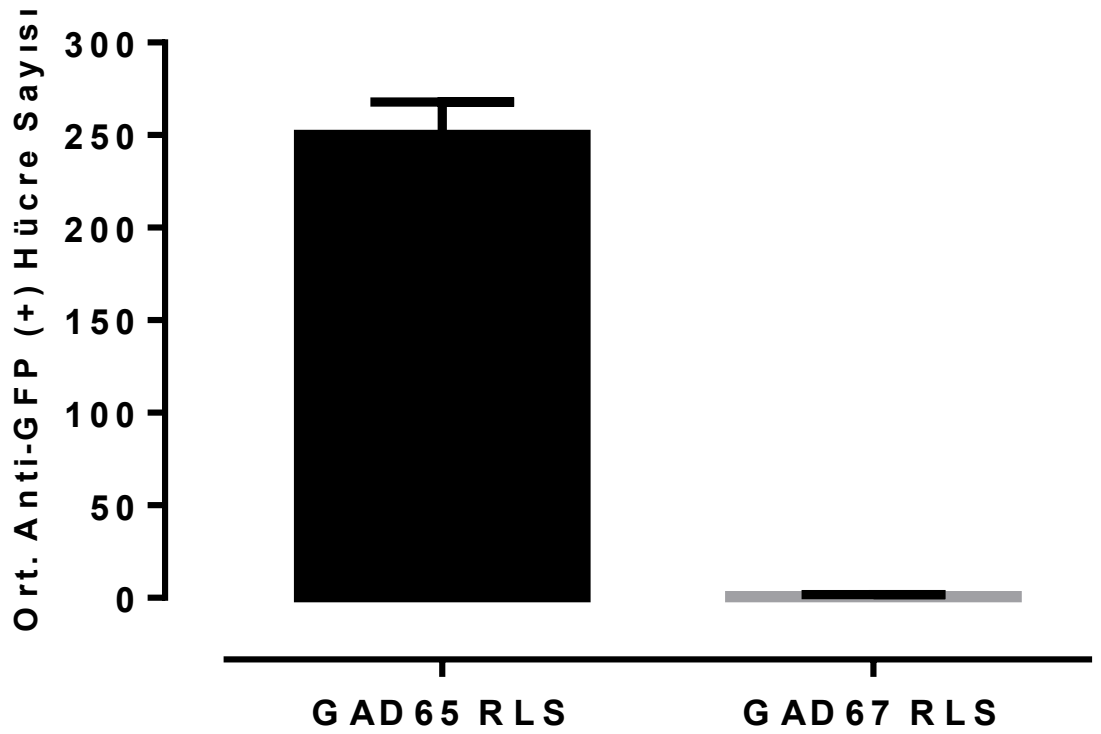
4.2. İstatistik Sonuçlar

GAD-65 ve GAD-67 sol nucleus septalis lateralis (LLS) kesitlerinden elde edilmiş ortalama GFP (+) hücre sayıları karşılaştırıldığında $p < 0.0001$ değeri elde edilmiş ve bu iki grup arasındaki karşılaştırmada anlamlı farklılık gözlenmiştir (Grafik 1).



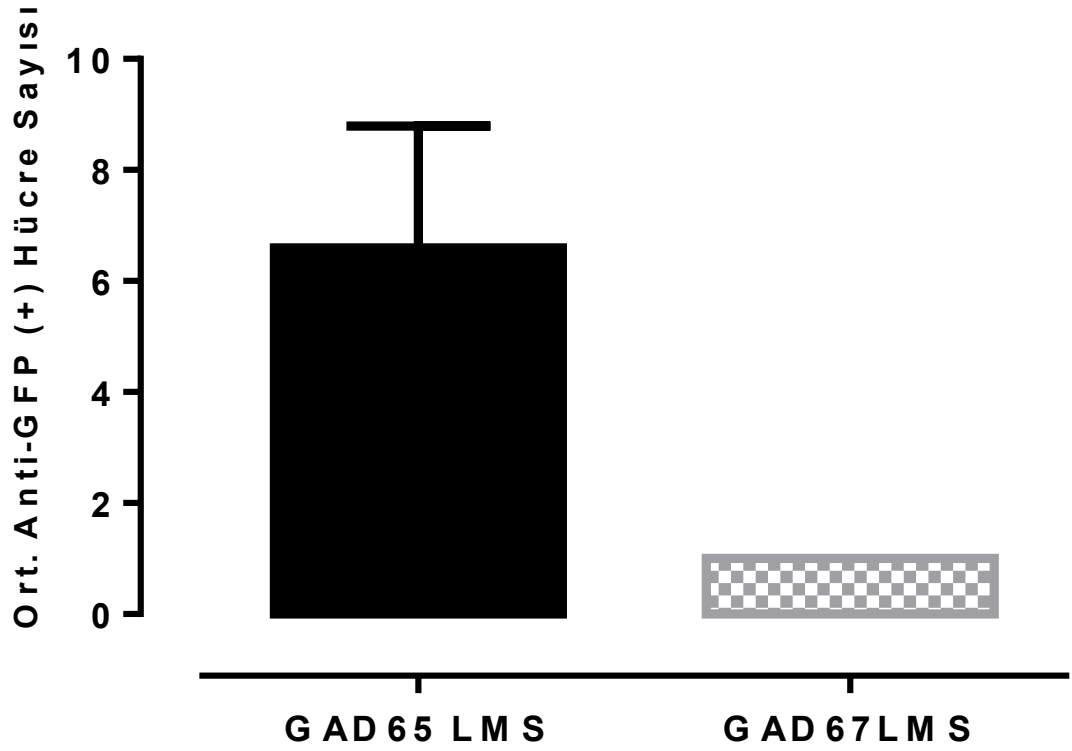
Şekil 20. GAD-65 ve GAD-67 farelerin sol hemisferlerinde LS'de bulunan ortalama GFP (+) hücre sayılarının karşılaştırılması. Unpaired two tailed t-test yöntemine göre anlamlı değişim gözlenmiştir ($p < 0.0001$).

Aynı yöntemle GAD-65 ve GAD-67 sağ nucleus septalis lateralis (RLS) kesitlerinden elde edilmiş ortalama GFP (+) hücre sayıları karşılaştırıldığında da $p < 0.0001$ değeri elde edilmiş ve bu iki grup arasındaki karşılaştırmada da LLS karşılaştırılmasında olduğu gibi anlamlı farklılık gözlenmiştir (Grafik 2).



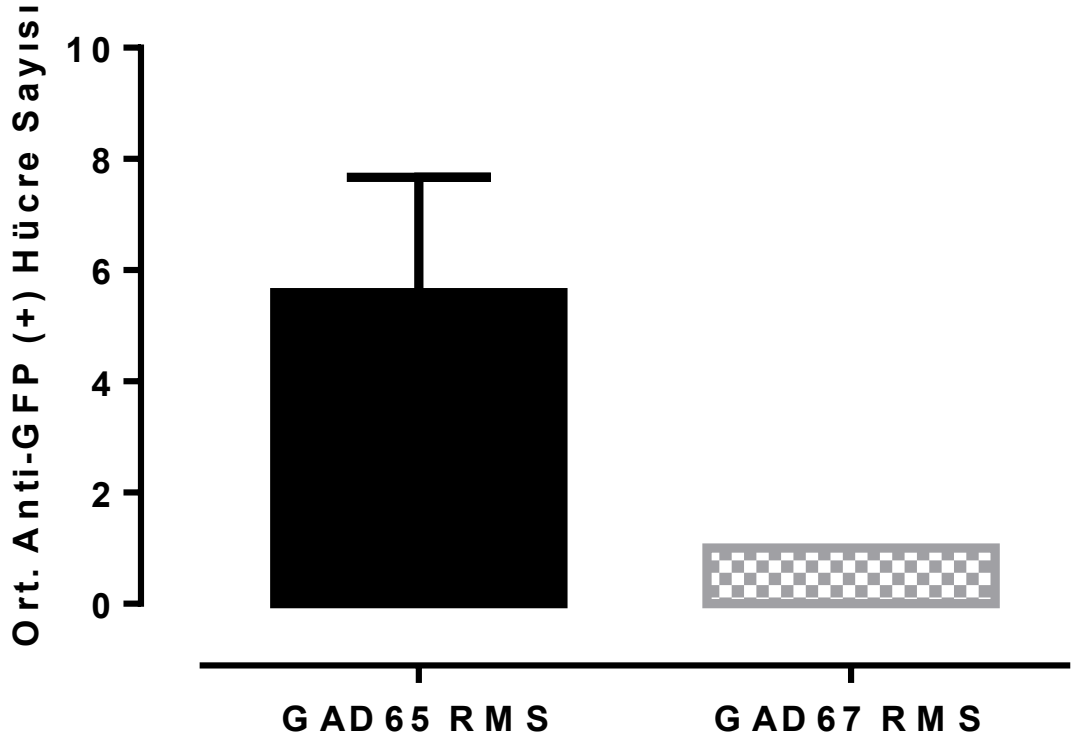
Şekil 21. GAD-65 ve GAD-67 farelerin sağ hemisferlerinde LS'de bulunan ortalama GFP (+) hücre sayılarının karşılaştırılması. Unpaired two tailed t-test yöntemine göre anlamlı değişim gözlenmiştir ($p < 0.0001$).

GAD-65 ve GAD-67 sol nucleus septalis medialis (LMS) kesitlerinden elde edilmiş ortalama GFP (+) hücre sayıları karşılaştırıldığında $p=0.0052$ değeri elde edilmiş ve sol nucleus septalis medialislerin karşılaştırılmasında anlamlı farklılık gözlenmiştir (Grafik 3).



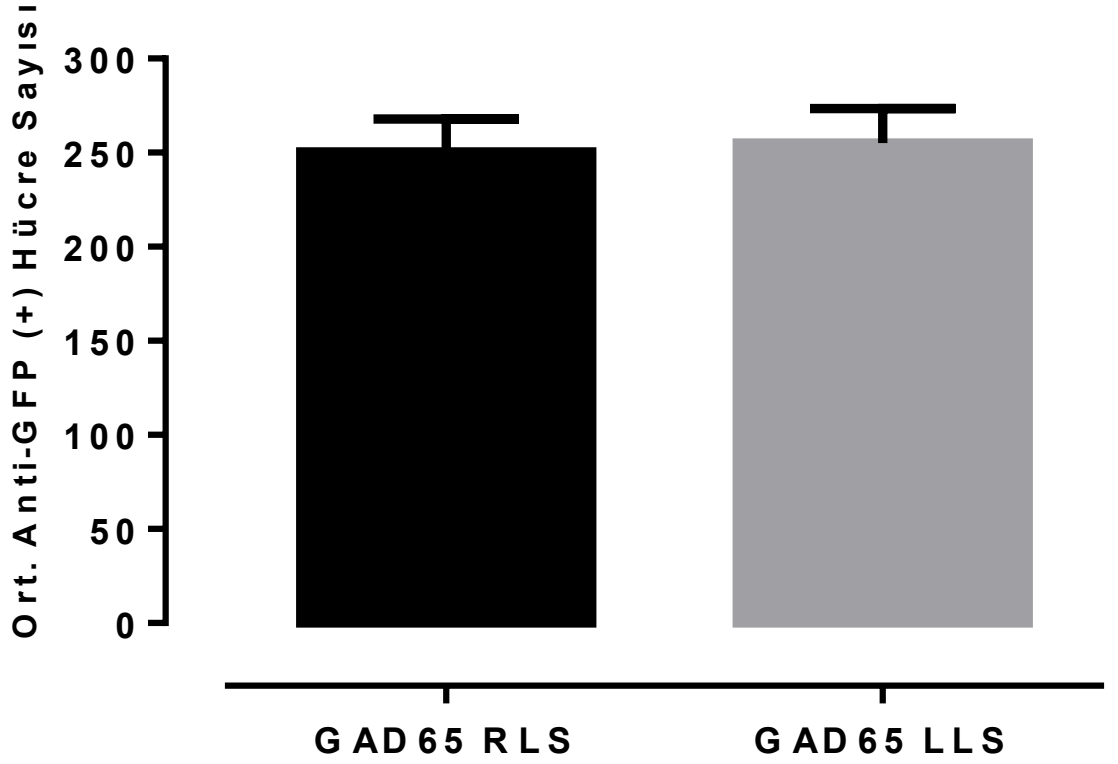
Şekil 22. GAD-65 ve GAD-67 farelerin sol hemisfer MS'de bulunan ortalama GFP (+) hücre sayılarının karşılaştırılması. Unpaired two tailed t-test yöntemine göre anlamlı değişim gözlenmiştir ($p=0.0052$).

Aynı şekilde GAD-65 ve GAD-67 sağ nucleus septalis medialis (RMS) kesitlerinden elde edilmiş ortalama GFP (+) hücre sayıları karşılaştırıldığında $p=0.0098$ değeri elde edilmiş ve sağ nucleus septalis medialislerin karşılaştırılmasında da anlamlı farklılık gözlenmiştir (Grafik 4).



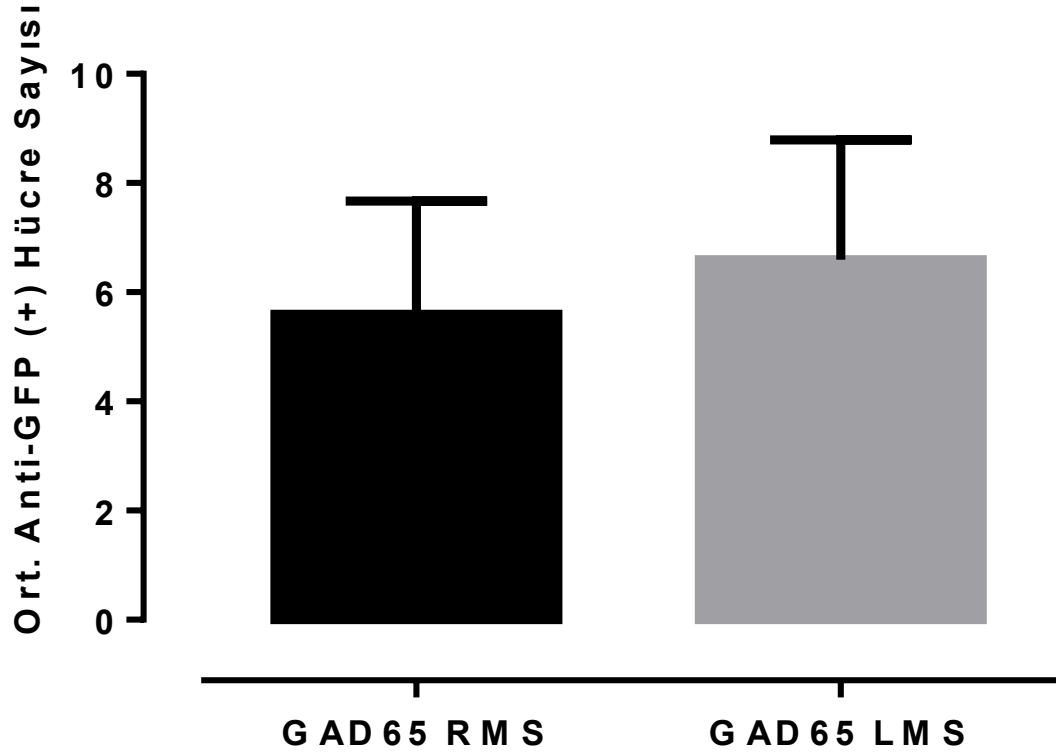
Şekil 23. GAD-65 ve GAD-67 farelerin sağ hemisfer MS'de bulunan ortalama GFP (+) hücre sayılarının karşılaştırılması. Unpaired two tailed t-test yöntemine göre anlamlı değişim gözlenmiştir ($p=0.0098$).

Aynı alt tip GAD “knock in” farelerde sağ ve sol hemisfer yapılarından elde edilmiş olan sonuçlara bakıldığında ise GAD-65 farelerin LLS ve RLS bölgeleri paired t-test kullanılarak karşılaştırılmış ve $p=0.6601$ değeri ile anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir (Grafik 5).



Şekil 24. GAD-65 farelerin sağ ve sol hemisferlerindeki LLS’de bulunan ortalama GFP (+) hücre sayılarının karşılaştırılması. Paired t-test yöntemine göre anlamlı değişim gözlenmemiştir ($p=0.6601$).

Benzer şekilde GAD-65 farelerin LMS ve RMS bölgeleri paired t-test kullanılarak karşılaştırılmış ve $p=0.3943$ değeri ile anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir (Grafik 6).



Şekil 25. GAD-65 farelerin sağ ve sol hemisferlerindeki MS'de bulunan ortalama GFP (+) hücre sayılarının karşılaştırılması. Paired t-test yöntemine göre anlamlı değişim gözlenmemiştir ($p=0.3943$).

5.TARTIŞMA

Area septalis, prosencephalonda bulunan ve oldukça heterojen bir yapı gösteren bir bölgedir. Bu bölgede bulunan LS'nin bu bölgedeki en yoğun GABAerjik nöron popülasyonuna sahip olduğu bilinmektedir (3). Buna ek olarak bu bölgede bulunan MS'nin de GABAerjik nöronlara sahip olduğu bilinmektedir. Literatürde GAD-65 ve GAD-67 “knock-in” farelerde yapılmış olan GABAerjik nöron özellikleri ile ilgili bilgiler mevcuttur. Bu bilgilerin elde edildiği çalışmalara göre LS'de bulunan GABAerjik nöronların, aralarında ciddi bir istatistiksel fark görülmemekle birlikte GAD-67 enzimi alt birimine sahip olduğu gösterilmiştir (24). Çalışmamızın sonuçları ise literatürün tersine bu bölgede GAD-65 alt tipinin çok daha yoğun olduğunu göstermiştir.

Ayrıca literatürde karşımıza çıkan bazı kaynaklarda GAD-67 (+) GABAerjik hücrelerin area septalis'te daha çok MS'de görüldüğü bilgisi de (3) bulgularımıza uymamaktadır. Aksine GAD-65 ve GAD-67 “knock in” farelerde MS için yapmış olduğumuz karşılaştırmada, LS'de olduğu gibi GAD-65 (+) GABAerjik hücrelerin daha yoğun izlendiği ortaya konmuştur (Grafik 3 ve 4).

GAD-65 (+) boyanmış GABAerjik hücrelerin sayısının GAD-67 (+) boyanmış hücrelerin sayısına göre çok yüksek çıkmış olması, bu sonuçlar yorumlanırken GAD-67 “knock in” farelerde transjenik müdahalenin gerçekleşmemiş olma ihtimalini (yani florasan ışına yapacak protein geninin, farenin genetik materyaline entegrasyonunda başarısızlık) düşündürmektedir. Ayrıca kesitlerde GAD-67 “knock in” farelerde yanlış negatif boyanma olmuş olma ihtimali de düşünülmelidir. Bunlar ışığında yapılan deneylerde area septalis dışında boyanmalar olup olmadığına bakılmıştır. Sonuç olarak her iki “knock in” türünde kortikal bölgeler başta olmak üzere GABAerjik hücreler tespit edilmiştir. Başta kortikal bölgeler olmak üzere GAD-65 ve GAD-67 kesitlerinde GABAerjik nöronlar çok benzer şekilde boyanmıştır. Sonuç olarak area septalis'de karşımıza çıkmış olan ve çalışmamızın temelini oluşturan boyanma farkları diğer bölgelerde gözlemlenmemiştir (Şekil 19).

Literatürde GAD-67 alt tipinin GABAerjik sinir hücrelerinin genel metabolik fonksiyonları için sitrik asit siklusu üzerinden metabolizmaya katılmak üzere GABA ürettiği dolayısıyla hücrenin gövdesinde ve aksonunda yaygın bulunduğu literatürde yer almaktadır (29, 32). GAD-65'in ise akson terminallerinde yoğunlukla görüldüğü ve sinaptik aktarımda öncelikli olarak görevli olduğu düşünülmektedir (32). GAD-67'nin beyinde GABA üretimi için öncelikli GAD alt tipi olduğu fikri hakimdir (29).

Tüm bu bilgileri bulgularımızla karşılaştırdığımızda, area septalis çekirdeklerinden GABAerjik hücreleri yoğun şekilde barındıran LS'de GAD-65 alt tipinin, araştırmada kullanılmış olan transjenik farelerde daha yoğun gözlemlendiği görülmüştür. Bu bölgedeki GABAerjik nöronların sinaptik aktarım açısından önemli fonksiyonlar sergileyen tipte hücreler olduklarını düşündürmektedir. Bu bölgede gözlemlenen GABAerjik nöronların bir kısmının internöron oldukları ve bu sebeple buldukları bölgedeki diğer nörotransmitter iletimlerini de regüle ettikleri düşünülmektedir. Literatür ışığında GABA sentezindeki GAD-65 ve GAD-67 yollarının mevcudiyetini, GABA sentezinin diğer nörotransmitterlerden farklı işlediğini görmekte ve bu konu hakkındaki bilginin yetersizliğini anlamaktayız. Elde ettiğimiz bulgular ışığında LS ve MS bölgelerinde mevcut olan GABAerjik nöronların dağılımının bu konuyla ilgili genel literatür bilgisini desteklemediğini görmekteyiz. GABA sentezindeki çift enzimli yol, bu iki alt tip enzimi barındıran hücrelerin fonksiyonları ve dağılımları ile ilgili günümüzdeki yetersiz bilgi, gelecekte bu konuyla ilgili farklı sonuçlar veren çalışmaların karşımıza çıkabileceğini düşündürmektedir.

Area Septalise yapılan stimülasyon deneylerinin sonucunda hem insanlarda hem de hayvanlarda keyif verici etkiler ortaya çıkardığı bilinmektedir (27). Sözkonusu olan bu keyif verici etkilerin Area septalis'e gelen dopaminerjik uyarıların etkinliğinde gerçekleşebileceği düşünülmektedir. Dopaminerjik sistem üzerinden etkili antipsikotik ilaçların etkilerinin bir kısmının da bu sisteme etki ederek Area Septalis üzerinden gerçekleştiği düşünülmektedir (1). Bu bölgede bulunan GABAerjik nöronların tüm bu fonksiyonlar üzerinde düzenleyici bir internöron etkisi göz önünde bulundurulduğunda, bu bölgedeki GABAerjik nöronların önemi daha iyi anlaşılmaktadır. Bu aşamada düzenleyici internöron etkisinin ve GABAerjik nöronların primer inhibe edici etkisinin daha yüksek oranda hücre terminallerinde mevcut olan GAD-65 (+) hücreler aracılığıyla oluşması beklenmekteydi. Ancak tam tersine literatürde GAD-67 alt tipinin daha yoğun gözlenmiş olması bu beklentiyi sağlamamıştır (24). Çalışmamızın sonucunda ulaştığımız bilgiler GAD-65 (+) hücrelerin bahsi geçen düzen üzerine etkisinin, GAD-67 (+) hücrelerden daha fazla olabileceğini göstermiştir.

LS'nin limbik sistem bağlantıları sonucunda duygusal tepki oluşturabilecek uyarıları önem ve şiddet sırasıyla gerekli limbik merkezlere iletildiği bilinmektedir (14). Bu düzenleme fonksiyonunda da bu bölgede yoğun olarak bulunan GABAerjik nöronların düzenleyici veya inhibe edici etkisi akla gelmektedir. Bu süreçte de mevcut literatür bilgisinin aksine GAD-65 (+) hücrelerin bu fonksiyonlarda ön planda olma ihtimali çalışmamızın sonuçlarında ortaya konmuştur.

LS nöronlarının bağımlılık yapıcı maddelere karşı yüksek derecede duyarlı olduğu bilinmektedir. LS'nin korku ve anksiyete regülasyonunda önemli rolü olduğu da çeşitli stimülasyon deneyleriyle ortaya konmuştur (14). Daha önce de bahsi geçtiği gibi korku ve anksiyete gibi limbik fonksiyonlarda bu bölgedeki GABAerjik nöronların etkinliğinin önemi ortadadır. Çalışmamızın sonuçları tüm bu fonksiyonların düzenlenmesinde görev alan GABAerjik hücrelerin yoğunlukla GAD-65 (+) hücreler olduğunu düşündürmektedir.

Tüm bunlara ek olarak area septalis'in özellikle de MS'nin hippocampus eksitabilitesi üzerine düzenleyici bir etkisinin bulunduğu, bu sebeple de hippocampus orijinli temporal epilepsilerde hippocampus üzerinden antiepileptik bir fonksiyona sahip olduğu bilinmektedir (4). MS başta olmak üzere bu bölge GABAerjik nöronlarının bahsi geçen epilepsi türü patogeneğinde muhtemel rolü düşünöldüğünde çalışmamız sonucunda bu rolün yoğun olarak GAD65 (+) GABAerjik hücrelerin fonksiyonu sonucu oluştuğu ihtimali artmaktadır.

Bu çalışma literatürde ilk kez transjenik farelerde area septalis LS ve MS GABAerjik nöronlarının büyük bir yoğunluğunun GAD-67 alt tipi enzimi değil, GAD-65 alt tipi enzimi taşıdığını göstermiştir.

6. KAYNAKLAR

1. Greenstein, Color Atlas of Neuroscience, Neuroanatomy and Neurophysiology, 1. Baskı ,Thieme Basım Evi, New York, 2000.
2. Panula P, Revuelta AV, Cheney DL, WU JY, Costa EY. An Immunohistochemical Study on the Location of GABAergic Neurons in Rat Septum. *J Comp Neurol.* 1984 1;222(1):69-80.
3. Colom LV. Septal networks: relevance to theta rhythm, epilepsy and Alzheimer's disease. *J Neurochem.* 2006;96(3):609-23.
4. Garrido Sanabria ER, Castañeda MT, Banuelos C, Perez-Cordova MG, Hernandez S, Colom LV. Septal GABAergic neurons are selectively vulnerable to pilocarpine-induced status epilepticus and chronic spontaneous seizures. *Neuroscience.* 2006;142(3):871-83.
5. Krebs C, Weinberg J, Akesson E. Lippincott's Illustrated Review of Neuroscience. Lippincott Williams and Wilkins Basım Evi, USA, 2012.
6. Herman JP. Neural pathways of stress integration: relevance to alcohol abuse. *Alcohol Res.* 2012;34(4):441-7
7. Sarter M, Markowitsch HJ. Involvement of the amygdala in learning and memory: a critical review, with emphasis on anatomical relations. *Behav Neurosci.* 1985;99(2):342-80.
8. Morgane PJ, Galler JR, Mokler DJ. A review of systems and networks of the limbic forebrain/limbic midbrain. *Prog Neurobiol.* 2005;75(2):143-60.
9. Cheu JW, Siegel A. GABA receptor mediated suppression of defensive rage behavior elicited from the medial hypothalamus of the cat: role of the lateral hypothalamus. *Brain Res.* 1998;783(2):293-304.
10. Squire LR. Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. *Psychol Rev.* 1992;99(2):195-231.
11. Campeau S, Davis M. Involvement of the central nucleus and basolateral complex of the amygdala in fear conditioning measured with fear-potentiated startle in rats trained concurrently with auditory and visual conditioned stimuli. *J Neurosci.* 1995;15(3 Pt 2):2301-11.
12. Horel JA, Keating EG, Misantone LJ. Partial Klüver-Bucy syndrome produced by destroying temporal neocortex or amygdala. *Brain Res.* 1975;9:347-59.
13. Mendoza J, Foundas A, Clinical Neuroanatomy: A Neurobehavioral Approach. Springer Basım Evi, New York, 2008.

14. Sheehan TP, Chambers RA, Russell DS. Regulation of affect by the lateral septum: implications for neuropsychiatry. *Brain Res Brain Res Rev.* 2004;46(1):71-117.
15. Bannerman DM, Rawlins JN, McHugh SB, Deacon RM, Yee BK, Bast T, Zhang WN, Pothuisen HH, Feldon J. Regional dissociations within the hippocampus--memory and anxiety. *Neurosci Biobehav Rev.* 2004;28(3):273-83.
16. Leonard CM, Scott JW. Origin and distribution of the amygdalofugal pathways in the rat: an experimental neuroanatomical study. *J Comp Neurol.* 1971;141(3):313-29.
17. Brito GN, Brito LS. Septohippocampal system and the prelimbic sector of frontal cortex: a neuropsychological battery analysis in the rat. *Behav Brain Res.* 1990;36(1-2):127-46.
18. Wyss JM, Sripanidkulchai K. The indusium griseum and anterior hippocampal continuation in the rat. *J Comp Neurol.* 1983;219(3):251-72.
19. Blander A, Wise RA. Anatomical mapping of brain stimulation reward sites in the anterior hypothalamic area: special attention to the stria medullaris. *Brain Res.* 1989;483(1):12-6.
20. Tóth K, Borhegyi Z, Freund TF. Postsynaptic targets of GABAergic hippocampal neurons in the medial septum-diagonal band of Broca complex. *J Neurosci.* 1993;13(9):3712-24.
21. Allen CN, Crawford IL. GABAergic agents in the medial septal nucleus affect hippocampal theta rhythm and acetylcholine utilization. *Brain Res.* 1984;322(2):261-7.
22. Risold PY, Swanson LW. Chemoarchitecture of the rat lateral septal nucleus. *Brain Res Brain Res Rev.* 1997;24(2-3):91-113.
23. Colom LV, Castaneda MT, Reyna T, Hernandez S, Garrido-Sanabria E. Characterization of medial septal glutamatergic neurons and their projection to the hippocampus. *Synapse.* 2005;58(3):151-64.
24. Zhao C, Eisinger B, Gammie SC. Characterization of GABAergic neurons in the mouse lateral septum: a double fluorescence in situ hybridization and immunohistochemical study using tyramide signal amplification. *PLoS One.* 2013;8(8)

25. McDonald MM, Markham CM, Norvelle A, Albers HE, Huhman KL. GABAA receptor activation in the lateral septum reduces the expression of conditioned defeat and increases aggression in Syrian hamsters. *Brain Res.* 2012;1439:27-33
26. Chozick BS. The behavioral effects of lesions of the septum: a review. *Int J Neurosci.* 1985;26(3-4):197-217.
27. Jacques S. Brain stimulation and reward: "pleasure centers" after twenty-five years. *Neurosurgery.* 1979;5(2):277-83.
28. Chebib M, Johnston GA. The 'ABC' of GABA receptors: a brief review. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1999;26(11):937-40.
29. Soghomonian JJ, Martin DL. Two isoforms of glutamate decarboxylase: why?. *Trends Pharmacol Sci.* 1998;19(12):500-5.
30. Erlander MG, Tobin AJ. The structural and functional heterogeneity of glutamic acid decarboxylase: a review. *Neurochem Res.* 1991;16(3):215-26.
31. Denner LA, Wu JY. Two forms of rat brain glutamic acid decarboxylase differ in their dependence on free pyridoxal phosphate. *J Neurochem.* 1985;44(3):957-65.
32. Martin DL, Rinvall K. Regulation of gamma-aminobutyric acid synthesis in the brain. *J Neurochem.* 1993;60(2):395-407.
33. Popp A, Urbach A, Witte OW, Frahm C. Adult and embryonic GAD transcripts are spatiotemporally regulated during postnatal development in the rat brain. *PLoS One.* 2009;4(2):e4371.
34. Zhao C, Driessen T, Gammie SC. Glutamic acid decarboxylase 65 and 67 expression in the lateral septum is up-regulated in association with the postpartum period in mice. *Brain Res.* 2012;1470:35-44.
35. Jelitai M, Madarasz E. The role of GABA in the early neuronal development. *Int Rev Neurobiol.* 2005;71:27-62.
36. Stewart RR, Hoge GJ, Zigova T, Luskin MB. Neural progenitor cells of the neonatal rat anterior subventricular zone express functional GABA(A) receptors. *J Neurobiol.* 2002;50(4):305-22.
37. Möhler H. The rise of a new GABA pharmacology. *Neuropharmacology.* 2011;60(7-8):1042-9
38. Bowery NG, Hudson AL, Price GW. GABAA and GABAB receptor site distribution in the rat central nervous system. *Neuroscience.* 1987;20(2):365-83.

39. Feldblum S, Erlander MG, Tobin AJ. Different distributions of GAD65 and GAD67 mRNAs suggest that the two glutamate decarboxylases play distinctive functional roles. *J Neurosci Res.* 1993;34(6):689-706.
40. Whiting PJ. GABA-A receptor subtypes in the brain: a paradigm for CNS drug discovery?. *Drug Discov Today.* 2003;8(10):445-50.
41. Katzung B, Masters S, Trevor A. *Basic and Clinical Pharmacology.* 12. Baskı, Lange Basım Evi, USA, 2011.
42. Harvey R , Clark M, Finkel R, Rey AJ. *Pharmacology (Lippincott's Illustrated Reviews Series),* 5. Baskı, Lippincott Williams and Wilkins Basım Evi, USA, 2012.
43. Brunton L, Chabner B, Knollman B. *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics,* 12. Baskı, McGraw Hill Basım Evi, USA, 2011.



MARMARA ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
PROJE ONAY FORMU

BAŞVURU BİLGİLERİ	PROTOKOL KODU	115.2013.mar	Çalışma:
	PROJE ADI	GAD65 ve GAD67 transjenik farelerde Nucleus Septalis Medialis ve Lateralis GABAerjik nöronlarının özellikleri	
	SORUMLU ARAŞTIRICI ÜNVANI/ADI	Prof.Dr. Ümit S. ŞEHİRLİ	
	ARAŞTIRMA MERKEZİ	M.Ü Tıp Fak. Anatomi ABD	
	DESTEKLEYİCİ		

KARAR BİLGİLERİ	Tarih <u>21.11.2013</u> Yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve gerçekleştirilmesinde sakınca bulunmadığı için Kurulumuzca onaylanmasına oy birliği ile karar verilmiştir. Onay sonrasında yapılacak her türlü proje değişiklikleri (katılımcılar, başlık vb.) veya protokol değişikliklerinin Etik Kurula bildirilerek proje onayının yenilenmesi gerekmektedir.
-----------------	--

ETİK KURUL BİLGİLERİ

ÇALIŞMA ESASI

Deney hayvanları ile yapılacak olan bilimsel araştırma, test, sağlık hizmetleri uygulamaları ve eğitim-öğretim gibi temel etkinliklerde kullanılan yöntem ve materyaller ile ilgili etik standartları gözetmek, etik ilkeler doğrultusunda görüş bildirmek, araştırma önerilerini incelemek ve sertifikası olmayanların deney hayvanı kullanmalarını engellemektir.

ÜYELER

Unvanı / Adı / Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu / EK Üyeliği	Onaylanan Proje ile İlişkisi		Toplantıya katılım		İmza
Prof. Dr. Göksel ŞENER	Farmakoloji	M.Ü Tıp Fakültesi ve Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi Müdürü	<input type="checkbox"/> Var	<input type="checkbox"/> Yok	<input type="checkbox"/> Evet	<input type="checkbox"/> Hayır	
Prof.Dr. İnci ALİCAN	Fizyoloji	Yürütücü Sekreteri	<input type="checkbox"/> Var	<input type="checkbox"/> Yok	<input type="checkbox"/> Evet	<input type="checkbox"/> Hayır	
Prof. Dr. Ayşen YARAT	Biyokimya	M.Ü Diş Hekimliği Fakültesi	<input type="checkbox"/> Var	<input type="checkbox"/> Yok	<input type="checkbox"/> Evet	<input type="checkbox"/> Hayır	
Doç.Dr. Serap ŞİRVANCI	Histoloji ABD Embriyoloji	M.Ü Tıp Fakültesi	<input type="checkbox"/> Var	<input type="checkbox"/> Yok	<input type="checkbox"/> Evet	<input type="checkbox"/> Hayır	
Doç.Dr. Hasan Raci YANANLI	Farmakoloji	M.Ü Tıp Fakültesi	<input type="checkbox"/> Var	<input type="checkbox"/> Yok	<input type="checkbox"/> EVET	<input type="checkbox"/> HAYIR	
Vet. Hek. Dilek ÖZBEYLİ	Veteriner Hekim	M.Ü Tıp Fakültesi ve Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi Sorumlu Veterineri	<input type="checkbox"/> Var	<input type="checkbox"/> Yok	<input type="checkbox"/> Evet	<input type="checkbox"/> Hayır	
Öğr. Gör.Dr. Gürkan SERT	Tıp Tarihi ve Etik	M.Ü Tıp Fakültesi	<input type="checkbox"/> Var	<input type="checkbox"/> Yok	<input type="checkbox"/> Evet	<input type="checkbox"/> Hayır	
Bio. Arif GÜMÜŞ	Biyoloji	İstanbul Hıfzıssıhha Enstitüsü Müdürlüğü, Kurumla ilişkisi olmayan TC vatandaşı üye	<input type="checkbox"/> Var	<input type="checkbox"/> Yok	<input type="checkbox"/> Evet	<input type="checkbox"/> Hayır	
Billur AYGÖR	Emekli Memur	Kurumla ilişkisi olmayan TC vatandaşı üye	<input type="checkbox"/> Var	<input type="checkbox"/> Yok	<input type="checkbox"/> Evet	<input type="checkbox"/> Hayır	