

91685

T.C.
OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ANATOMİ ANABİLİM DALI

**PENİSİLİN İLE DENEYSEL EPİLEPSİ OLUŞTURULAN
SIÇANLARDA
HİPPOCAMPUS NÖRON SAYILARININ
OPTİK PARÇALAMA YÖNTEMİYLE HESAPLANMASI**

**TC. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**

DOKTORA TEZİ

Dr.İlgaz AKDOĞAN

**Tez Yöneticisi:
Doç.Dr.Nedim ÜNAL**

**Eskişehir
Temmuz - 2000**

KABUL VE ONAY SAYFASI

İlgaz AKDOĞAN'ın doktora tezi olarak hazırladığı "Penisilin ile Deneysel Epilepsi Oluşturulan Sıçanlarda Hippocampus Nöron Sayılarının Optik Parçalama Yöntemiyle Hesaplanması" başlıklı çalışma, jürimizce Lisansüstü Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

07,09,2000

ÜYE:

Prof.Dr. Fahri DERE



ÜYE:

Prof.Dr.Dr. Gürsel ORTUĞ



ÜYE:

Prof.Dr. Süleyman KAPLAN




ÜYE:

Doç.Dr. Nedim ÜNAL



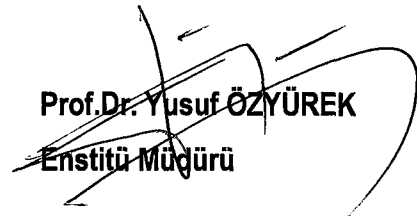
ÜYE:

Doç.Dr. Ferruh YÜCEL



Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 08.10.2000 tarih ve 488.../1260 sayılı kararıyla

Prof.Dr. Yusuf ÖZYÜREK
Enstitü Müdürü



İÇİNDEKİLER

ÖZET	iii
SUMMARY	v
ANAHTAR SÖZCÜKLER	vi
ŞEKİL VE RESİM DİZİNİ	vii
TABLO DİZİNİ	viii
SİMGE VE KISALTMALAR	ix
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER	4
2.1.EPİLEPSİ	4
2.1.1.Epilepsi İnsidensi	6
2.1.2.Epilepsi Etiyolojisi	6
2.1.3.Epilepsi Nöbetlerinin Sınıflandırması	7
2.1.4.Epilepsinin Tanısı	7
2.2.DENEYSEL EPİLEPSİ MODELLERİ	10
2.3.PENİSİLİN	14
2.4.PENİSİLİN İLE OLUŞTURULAN DENEYSEL EPİLEPSİ MODELİ	15
2.5.FORMATİO HIPPOCAMPALİS	17
2.5.1.Hippocampus	17
2.5.2.Hippocampus Anatomisi	17
2.5.3.Gyrus dentatus	19
2.5.4.Subiculum	19
2.5.5.Alveus	19
2.5.6.Sıçanlarda Hippocampus	20

2.5.7.Hippocampus Histolojisi	23
2.5.8.Hippokampal Yollar	24
2.5.9.Hippocampus'un Fonksiyonları	26
2.6.STEREOLOJİ	28
2.6.1.Sistemik Rastgele Örnekleme Stratejisi	33
2.6.2.Tarafsız Sayım Çerçevesi	33
2.6.3.Optik Disektör	34
2.6.4.Parçalama (Fractionator)	35
2.6.5.Optik Parçalama (Optical Fractionator)	36
3.GEREÇ VE YÖNTEM	39
3.1.Stereolojik sayımlar ve Optik Parçalama	42
3.2.Parçalayıcı örnekleme stratejisine uygun kesit alma ve kesit örnekleme oranı(KeÖO)	42
3.3.Alan Örnekleme Oranı(AÖO)	43
3.4.Nükleus (Hücre) sayımı	44
3.5.Kalınlık Örnekleme Oranı(KaÖO)	45
4.BULGULAR	51
4.1.Korteks içine verilen maddelerin etkileri	51
4.2.Operasyon sonrası genel gözlemler	52
4.3.Optik Parçalama ile toplam nöron sayısı hesaplamaları	52
5.TARTIŞMA	64
6.SONUÇ	73
7.KAYNAKLAR	74
8.ÖZGEÇMİŞ	84

ÖZET

Epilepsi, merkezi sinir sistemindeki bir nöron grubunda kontrol edilemeyen ve güçlü elektrik deşarjlarının oluşturduğu nörolojik hastalıklardandır. Epileptik nöbetlerin fizyopatolojisinin daha iyi anlaşılması için deneysel epilepsi modelleri geliştirilmiştir. Bu yöntemlerden biri kimyasal uyarılardan penisilin ile oluşturulan deneysel epilepsi modelidir. Sıçanlarda Penisilin-G ile oluşturulan deneysel epilepsi modelinde hippocampus'taki nöron sayısı değişikliklerini konu alan bir çalışmaya rastlanmamıştır. Epilepside ve diğer deneysel epilepsi modellerinde hippocampus nöron sayısındaki azalmayı gösteren çalışmalarda ise stereolojik olmayan metotlar kullanılmıştır.

Bu çalışmada, sıçanlarda Penisilin-G ile oluşturduğumuz deneysel epilepsi modelinde, hippocampus'taki nöron sayılarının, yeni bir stereolojik metot olan optik parçalama (optical fractionator) yöntemi ile hesaplanması amaçlanmıştır. Çalışmamızda, deney grubu sıçanlara intrakortikal (korteks içine) 500 IU Penisilin-G, kontrol grubu sıçanlara intrakortikal aynı miktar serum fizyolojik (% 0.9 NaCl) verilmiş ve her iki hayvan grubu bir hafta yaşatılmıştır. Bir hafta sonunda dekapitasyon işlemini takiben craniotomi ile çıkarılan beyinler, Cryostat aletinde dondurulmuştur (freezing). Cryostat aletinin içinde Sistemik Rastgele Örnekleme Stratejisine göre, 150 µm kalınlıkta alınan histolojik kesitler Hematoxylen-eosin ile boyanmıştır. Elde edilen kesitlerin mikroskop görüntüsü (X 100 büyütme) monitöre

aktarılmıştır. Bu kesitlerde, hippocampus CA1,CA2,CA3 alt bölgeleri stratum piramidale tabakasının optik parçalama yöntemine uygun örnekleme alanlarında, optik disektör hücre (partikül) sayım kurallarına göre hücre (piramidal nöron) sayımları yapılmıştır. Hücre (nöron) sayımı sonucu, hippocampus CA1,CA2,CA3 alt bölgeleri stratum piramidale tabakasının toplam piramidal nöron sayıları optik parçalama yöntemine göre hesaplanmıştır. Çalışma sonucunda, deney grubu sıçanların hippocampus toplam piramidal nöron sayıları (Ortalama = 142 888 ± 11 745), kontrol grubu sıçanlara göre (Ortalama = 177 953 ± 10 907) istatistiksel olarak düşük bulunmuştur ($p < 0.05$).

Bu sonuçlar; penisilin epilepsi modelinde hippocampus nöron sayısındaki azalmanın tespitinde, optik parçalama metodunun objektif ve etkin bir yöntem olarak kullanılabileceğini göstermektedir.

SUMMARY

Epilepsy is a neurological disease arising from strong and uncontrollable electrical firings of a group of neurons in the central nervous system. In order to understand the pathophysiology of the epileptic seizures, experimental epilepsy models have been developed. Penicillin model of experimental epilepsy is one of them in which no information has been known about changes in the neuronal numbers of hippocampus in the rats. There are other experimental models showing a decrease in the neuronal numbers in the hippocampus, but none of them have been used stereological methods.

The aim of this study was to estimate the numbers of neurons in the hippocampus of the penicillin induced epileptic rats, via a new stereological method; the optical fractionator. In experimental group, 500 IU penicillin-G was injected intracortically, and in control group, same amount of saline was administered. After one week, animals were decapitated and their brains were removed by craniotomy. Frozen brains were cut at a thickness of 150 μm in a cryostat. Sections collected via systematic random sampling were stained with hematoxylin-eosin stain. Microscopic images of pyramidal cell layers from CA1, CA2, CA3 subdivisions of the hippocampus were then transferred to a monitor, using X 100 objective. Neuronal counts were done by using the optical disector method in the frames determined with fractionator sampling scheme. Total pyramidal neuron numbers were estimated using the optical fractionator method. Total pyramidal neuron numbers were statistically less in the experimental group (mean = 142 888 \pm 11745) than the ones in the control group (mean = 177 953 \pm 10 907) ($p < 0.05$).

These results suggest that, decrease in the hippocampal neuronal numbers in penicillin model of epilepsy can be determined objectively and efficiently by using the optical fractionator method.

ANAHTAR SÖZCÜKLER

Sıçan,
Penisilin,
Deneysel epilepsi,
Hippocampus,
Toplam nöron sayısı,
Optik parçalama.

KEY WORDS

Rat,
Penicillin,
Experimental epilepsy,
Hippocampus,
Total neuron number,
Optical fractionator.

ŞEKİL VE RESİM DİZİNİ

Şekil-1.....	18
Şekil-2.....	22
Şekil-3-a.....	31
Şekil-3-b.....	32
Şekil-4-I.....	54
Şekil-4-II.....	55
Şekil-5.....	56
Resim-1.....	48
Resim-2-a.b.....	49
Resim-3-a.b.....	50
Resim-4.....	62
Resim-5.....	63

TABLO DİZİNİ

Tablo-1.....	30
Tablo-2.....	47
Tablo-3.....	57
Tablo-4.....	58
Tablo-5.....	59
Tablo-6.....	59
Tablo-7.....	60
Tablo-8.....	60
Tablo-9.....	61
Tablo-10.....	61

SİMGE VE KISALTMALAR

GABA	: Gama amino butirik asit
EEG	: Elektroensefalografi
EPSP	: Eksitatör postsinaptik potansiyel
İPSP	: İnhibitör postsinaptik potansiyel
IU	: İnternational Unit
gr.	: gram (0.001 kilogram)
cc.	: 0.001 litre
mm.	: milimetre (0.001 metre)
konvülsion	: epileptik nöbet
CA	: Cornu Ammonis
μm	: mikron (0.001 milimetre)
cm.	: santimetre (0.01 metre)
mM	: milimol
HK	: Hata Katsayısı
et al.	: ve arkadaşları

GİRİŞ VE AMAÇ

Epilepsi, beyinde bir nöron grubunun anormal elektriksel deşarjı sonucu ortaya çıkan, kısa süren krizler şeklinde tekrarlayan yaygın bir nörolojik hastalıktır (46,53). Epilepsi genel popülasyonun % 2-5'inde görülür ve toplum sağlığı açısından önemli bir hastalıktır (6,7,46,78).

Günümüzde epilepsinin ve epileptik nöbetlerin fizyopatolojisinin daha iyi anlaşılması ve tedavi edici ilaçların geliştirilebilmesi için deneysel epilepsi modelleri geliştirilmiştir (8,18,49,60). Deneysel epilepsi bir çok yöntemle oluşturulabilir. Bu yöntemlerden biri kimyasal uyarılar verilerek oluşturulan deneysel epilepsi modelidir (8). Kimyasal uyarılardan penisilin kolay bulunabilen ve maliyeti düşük bir ajandır. Deneysel hayvanlarında intrakortikal (korteks içine) yolla uygulandığında epileptik aktiviteye neden olmaktadır (30,49).

Deneysel hayvanlarından sıçanlar, deneysel epilepsi modellerinde sık olarak kullanılmaktadırlar. Penisilin ile oluşturulan deneysel epilepsi modelinde sıçanlar, EEG'lerinin insanlara benzer özellikler göstermesi ve dayanıklı olmaları nedeniyle tercih edilirler (30). Sıçan beyninin anatomik yapısı genel özellikleriyle insan beynine benzerlik gösterir. Ayrıca sıçanlar kolaylıkla bulunabilmeleri, bakımlarının kolay olması, memeli olmaları ve sıçanlarla ilgili temel kaynak ve atlasların çok sayıda olması nedeniyle deneysel çalışmalar için ideal hayvanlardır.

Hippocampus uyarılara karşı son derece düşük eşik şiddetine sahiptir. Hippocampus'un bir noktasına verilen uyarı aynı anda tüm hippocampus alt bölgelerine ve karşı taraf hippocampus'a yayılır (10,21,39). Bu yüzden epilepside ve deneysel epilepsi modellerinde hippocampus'la ilgili bir çok çalışma vardır. Hippocampus'un hipereksitebilitesi sonucu epileptik nöbetlerde kolaylıkla uyarılabilmesi, irreversibl

hipokampal nöron kaybına ve hipokampal skleroza neden olmaktadır (17,28,39,65). Epilepsi hastalarındaki otopsi çalışmaları 19. yüzyıla dayanmaktadır. İlk kez, 1825'de Bouchet ve Cazauviel, epilepsi hastalarında hippocampus'taki makroskobik büzüşmeyi "skleroz" olarak tanımlamışlardır. 1880 yılında Sommer, postmortem beyinleri makroskobik yönden değerlendirdiğinde 90 epilepsi vakasından 76'sının hippocampus'unda değişiklik olduğunu görmüştür. Temporal lobdan kaynaklanan nöbetlerin önemli klinik ve patolojik özelliklerinin aydınlatılmasını, Sommer'in hipokampal sklerozu tanımladığı ilk mikroskobik çalışmaları sağlamıştır. Sommer, 25 yaşındaki bir epilepsi hastasının beynini mikroskopla incelediğinde, hippocampus'ta spesifik bir nöron kaybı olduğunu tespit etmiştir. Hippocampus'un (Cornu ammonis'in) piramidal nöronlarında yaygın hasar, özellikle CA1 ve prosubiculum bölgelerinde daha fazla şekilde gözlenmiştir. (18,52). Önce Spielmeyer (1927) ve daha sonra Scholz (1951), hippocampus'taki nöron kaybının, jeneralize nöbetlerdeki serebral vazospazma (damar daralmasına) bağlı iskemiden dolayı oluştuğunu ileri sürmüşlerdir (16). 1959'da Scholz epileptik nöbetlerin etkisi için "iktal hasar" terimini kullanmıştır (4). 1966'da Margerison ve Corsellis, hipokampal nöron kaybı ve epilepsi arasındaki ilişkiyi araştırmış ve epilepsi nöropatolojisinin ortaya konmasına yardımcı olmuştur. Yapılan araştırmalarda, epileptik dokularda çeşitli değişiklikler gözlenmiştir. Bu değişiklikler; nöron kaybı, nöronal yapılarda dejenerasyon ve glia hücrelerinde artıştır (4,16).

Penisilinle oluşturulan deneysel epilepside hippocampus'ta nöron kaybı olup olmadığı daha önce tespit edilmemiştir. Ayrıca, epilepside ve diğer deneysel epilepsi modellerinde (elektrik uyarıları vb.) hippocampus'ta nöron kaybını ortaya koyan çalışmalarda stereolojik olmayan yöntemler kullanılmıştır.

Stereoloji, iki boyutlu olarak gözlenen yapı veya cisimlerin üç boyutlu özelliklerini anlamaya yardımcı olan yeni bir bilim dalıdır. Stereolojik metotlar kullanılmadan yapılan çalışmalar, çalışılan yapı ile ilgili bazı ön kabullerin yapılması ve iki boyutlu kesitlerden elde edilen verilerin, gerçek üç boyutlu yapı ile ilişkisinin tam olarak kurulamaması gibi hata kaynakları nedeniyle gerçek değerden sistematik bir sapmaya

neden olabilir (3,12,13). Halbuki Stereolojik metotlar, etkinlik (en düşük miktarda zaman harcanmasıyla, en düşük seviyeli değişkenlik gösteren verilerin elde edilmesi) ve tarafsızlık (gerçek değerden sistematik sapma göstermeyen) ilkeleri ile objektif ve kantitatif (sayısal) olarak daha kesin sonuçlara ulaşılmasını sağlar (37).

Stereolojik metotlardan optik parçalama (optical fractionator); hücre (partikül) sayımı yapılacak bölgenin sistematik rastgele örnekleme stratejisiyle elde edilen belli bir bölümünde, üç boyutlu sayım yöntemi olan optik disektörle hücre (partikül) sayımıdır (35,75). Sinir sisteminde yer alan yapılarda, nöron sayımı için tarafsız ve etkin kullanımıyla en uygun yöntem optik parçalamadır (13,70,75).

Bu çalışmanın amacı; sıçanlarda penisilin-G ile oluşturulan deneysel epilepsi modelinde, hippocampus'taki nöron sayılarının, yeni bir stereolojik metot olan optik parçalama (optical fractionator) yöntemi ile hesaplanmasıdır.

GENEL BİLGİLER

2.1. EPİLEPSİ

Epilepsi kelimesi, Yunanca “nöbet geçirmek, tutulmak” gibi anlamları olan bir fiilden türetilmiştir (26). Önceleri dinsel bir anlam ifade ederek, bir çeşit cezalandırma yöntemi gibi algılanmıştır. M.S. 5. yüzyılda kelime günümüzdekine yakın bir anlam kazanmıştır. Çok eski çağlardan beri bilinen epilepsi hastalığını 19. yüzyıl nörologlarından Jhon Hughlings Jackson şöyle tanımlamıştır; epilepsi, sinir dokusunun anormal, ani, aşırı ve zaman zaman görülen deşarjıdır (30,46,53). Gerçekten, günümüzde ulaşılan yeni bilgilerle, ister konvülsif bozukluk, ister nöbet bozukluğu, ister serebral nöbetler terimi kullanılsın, epilepsi, merkezi sinir sistemindeki bir nöron gurubunda kontrol edilemeyen, zaman zaman görülen, anormal ve güçlü elektrik deşarjların oluşturduğu klinik belirtilerin tamamı şeklinde tanımlanır (46,53). Bu tanımlama, esas olarak “epileptik nöbet”in tanımıdır. Çünkü epilepsi nöbeti, bir grup nöronun aşırı deşarjına bağlı olarak ortaya çıkar ve klinikte gelip geçici motor, duyuşal, duyuşal ve otonom değişikliklerle şekillenen durumu belirtir. Epilepsi hastalığı ya da kısaca epilepsi ise; epileptik nöbetlerin tekrarlama eğiliminin (yatkınlığının) bulunduğu klinik bir durum veya sendromdur (27,29,49,78). Epilepsi bir çok bozukluğun biraraya geldiği, semptomlar topluluğu olarak da tanımlanabilir (46).

Normalden fazla aktiviteye sahip olan hücre topluluğuna “epileptojenik odak” denir (7,53). Epileptojenik odakta bulunan hücreler skatris, atrofi, skleroz gibi lokal yada hipoksi, hipoglisemi, pH değişimi, enzim eksikliği, elektrolit denge bozukluğu gibi genel patolojik değişimler veya konvülsan ilaçlar nedeniyle normalden fazla elektriksel aktivite gösterirler (6,53).

Epileptojenik odakta bulunan hücrelerin iki önemli özelliği mevcuttur;

- 1- Her bir hücre normalden daha yüksek elektrik potansiyeli doğurur.
- 2- Aynı anda potansiyel değişikliği gösteren hücrelerin sayısı normalden çok fazladır. Bu duruma “hipersenkronizasyon” denir (49,53).

Epileptojenik odaklarda zaman zaman oluşan güçlü elektrik deşarjlarına, “epileptik deşarj” adı verilir. Normalde, sinir dokusunda deşarjların komşu hücre gruplarına yayılmasını engelleyen kimyasal ve nöronal inhibitör mekanizmalar vardır. Örneğin, bir nörotransmitter olan Gama Amino Bütirik Asit (GABA), bu şekilde inhibitör etkiye sahiptir. Ancak, anormal derecede güçlü olan epileptik deşarj karşısında, bu mekanizmalar etkisiz kalır (46,53).

Epileptik deşarjın doğduğu odak ve ulaşabildiği yerdeki hücrelere iki etkisi vardır;

- 1- Buralardaki hücreleri uyarır (aktive eder).
- 2- Normal görevlerini yapmalarını engeller. Hangi bölgede bu türlü bir etki varsa, o bölgenin fonksiyonuyla ilgili bir klinik durum ortaya çıkar (53).

Epileptik deşarj potansiyeli yüksek veya beyin dokusunun eksitabilitesi (hücrelerin uyarılabilme yeteneği) düşük ise deşarj yayılır. Epileptik deşarjın yayılması iki yol ile olur;

1- Nöronal yol (transsinaptik yayılma) : Deşarj, korteksi subkortikal yapılara bağlayan nöronlarla, uzak kortikal alanları veya iki beyin hemisferini birbirine bağlayan assosiasyon yollarından yararlanır.

2- Komşuluk yolu : Hipersenkronizasyon ile epileptik deşarj komşu bölgelere yayılabilir (53).

2.1.1.Epilepsi İnsidensi

Epilepsi çok yaygın nörolojik hastalıklardan birisidir. 1994 yılındaki tahminlere göre dünyada yaklaşık 50 milyon epilepsi hastası bulunmakta ve bunların % 20-30'u epileptik ilaçlarla kontrol altına alınamamaktadır (49). Genel popülasyonun yaklaşık % 2-5 kadarı hayatları boyunca en az bir epileptik nöbet geçirmektedirler (6,7,46,78). Her 1000 kişiden 4-12'sinin kronik veya aktif epilepsisi olduğu ileri sürülmüştür (78). Devamlı nöbet geçirenler toplumun ortalama % 0.5'ini oluştururlar (46). Devamlı nöbet geçirenlerin % 70 kadarı birkaç nöbetten sonra kontrol altına alınırken, yaklaşık % 30'u ilaç tedavisine cevap vermemektedirler (46,49).

Gelişmiş ülkelerde, yaş bağımlı çalışmalarda 24 / 100 000 ve 53 / 100 000 oranlarına ulaşılırken, gelişmekte olan ülkelerde oran artmakta ve 77-114 / 100 000, hatta 190 / 100 000'e ulaşmaktadır (40). Yaşamın ilk yılı ile yaşlılıkta görülme oranı artmaktadır (58). Erkeklerde kadınlardan daha fazladır (27,58). Görüldüğü gibi, epilepsi toplumda çok sık rastlanan ve hem tıbbi hem de psikolojik ve sosyolojik boyutu olan bir hastalıktır.

2.1.2.Epilepsi Etyolojisi

Epilepsi etyolojisi üç ana grupta toplanabilir; (6,7,26,30,49,78)

1- İdiopatik

2-Kalıtsal faktörler

3-Beyin patolojileri : Merkezi sinir sistemi enfeksiyonları, kafa travmaları, konjenital beyin hastalıkları, serebro vasküler hastalıklar, intrakranial kanamalar vb. Bu patolojilere ek olarak daha pek çok patoloji etyolojik sebepler arasında sayılabilir.

4-Sistemik patolojik durumlar : Kalp aritmileri, hipoglisemi, çeşitli konvülsif ilaçlar (aminofillin, penisilin vb.), hipertermi, şiddetli hipotansiyon vb. Bu gibi sistemik durumlara ilave sebepler eklenebilir.

2.1.3. Epilepsi Nöbetlerinin Sınıflandırması (24,29,30,46,49) :

1) Parsiyel Nöbetler

- A- Basit parsiyel nöbetler
- B- Kompleks parsiyel nöbetler
- C- Sekonder jeneralize nöbetler

2) Jeneralize Nöbetler

- A- Absans nöbetler (Petit mal)
- B- Miyoklonik nöbetler
- C- Klonik nöbetler
- D- Tonik nöbetler
- E- Tonik klonik nöbetler (Grand mal)
- F- Atonik nöbetler

3) Sınıflandırılmayan nöbetler.

Epileptik deşarjlar beyinin sadece bir bölgesinde sınırlı kalıyorsa parsiyel (fokal) nöbet oluşur. Eğer deşarj beyinin bir merkezinden başlıyor ve daha sonra tüm vücuda yayılıyorsa sekonder jeneralize nöbetlerden söz edilebilir. Epileptik deşarjlar beyinin her tarafında aynı anda başlıyor ve iki hemisferi aynı anda etkiliyorsa, jeneralize nöbetler söz konusudur (27,29,49,53).

2.1.4. Epilepsi'nin Tanısı

Epilepsi'ye tanısıl yaklaşımda, "Epilepsi ve Epilepsi Sendromları" sınıflandırmasından yararlanır (29,77) :

- 1- Parsiyel Epilepsiler
- 2- Jeneralize epilepsiler
- 3- Fokal yada jeneralize olduğu anlaşılamayanlar
- 4- Özel sendromlar
 - Febril konvülsionlar
 - Status epileptikus
 - Akut bir nedene bağlı nöbetler (eklampsi, hipoglisemi vb.)

Epilepsi'de tanı, nöbet özellikleri, klinik belirtiler ve Elektroensefalografi (EEG) bulgularıyla konulur (29).

2.1.4.1. Elektroensefalografi (EEG)

Hans Berger 1929'da, insan kafatası derisinden (scalp) spontan beyin elektriksel aktivitelerini kaydetmiş, 1931'de epilepside interiktal EEG değişikliklerini ve aynı yıl diken-dalga aktivitelerini rapor etmiştir (58). 1935'de Lennox ve arkadaşları, epileptik nöbet boyunca (iktal) kayıt yapmış ve diken-dalga komplekslerini göstermiştir (58).

Beyin elektriksel dalgaları eksitatör ve inhibitör postsinaptik potansiyellerin (EPSP ve İPSP) matematiksel toplamı sonucu arta kalan sinaptik aktivitenin senkronizasyonu yoluyla oluşur ve yüzeydeki kaydedici elektrot yardımıyla yazdırılır. Korteks yüzeyine yakın nöronal yapıların EPSP'leri EEG dalgalarının negatif kısımlarını, derin kortikal yapıların İPSP'leri de EEG dalgalarının pozitif kısımlarını oluşturur. Ayrıca yüzeyel İPSP'ler EEG dalgalarının pozitif kısımlarının, derindekiler ise negatif kısımlarının oluşumuna katkıda bulunur (49).

Epileptik deşarjlar EEG'nin aşırı senkronizasyonunu ifade eder (49). EEG'de, epilepsi için karakteristik olan aktiviteler (dalgalar) şunlardır; diken (spike), keskin dalga (sharp), diken-yavaş dalga (spike and wave), keskin-yavaş dalga (sharp and wave), çoklu diken-yavaş dalga (poly spike and wave) (29).

Uzun yıllardan beri, Elektroensefalografi adı verilen bu basit tanı yöntemiyle, beyin biyoelektriksel aktiviteleri elde edilmekte ve epilepsi tanısında yararlanılmaktadır. Ayrıca, günümüzde radyolojik görüntüleme yöntemleri, nöbetleri izlemek için video monitörizasyon yöntemleri, telemetrik kayıtlar, uyku EEG tetkikleri ve kafa içi elektrot uygulama çalışmaları tanıda yardımcı olan diğer gelişmelerdir (29).



2.2. DENEYSEL EPİLEPSİ MODELLERİ

Epilepsi fizyolojisi ve patolojisinin anlaşılması, tedavi yöntemlerinin belirlenmesi, daha etkili ve yeni antiepileptik ilaçların kullanılabilmesi için deneysel epilepsi modelleri geliştirilmiştir (8,18,49,60).

İntakt insan beyinde, hücre içi kayıtlar ve mikrokimyasal analizler yapmak, anatomik tanımlamalarla ilgili teknikleri uygulamak etik kurallar gözönüne alındığında mümkün değildir (30). Epilepsi ile ilgili deneysel çalışmalarda seçilmesi gereken modelin tipini, araştırmanın amacı ortaya koyar.

Bu tip çalışmalarda amaç;

- 1- Yeni ilaç geliştirme
- 2- Mekanizmaları ayrıntılı olarak aydınlatma
- 3- Temel olaylar arasındaki ilişkiler ve olayların gelişimini belirlemedir (49).

Bu genel amaçlara; epilepsinin çeşitli dokulara, özellikle beyinle ilgili yapılara olan etkiler, oluşan epileptik nöbetler sonrası dokuların makroskobik (hacimsel) ve mikroskobik incelenmesi ve bu sonuçların kantitatif (sayısal) olarak değerlendirilmesi gibi bir çok özel amaç ilave edilebilir.

Deneysel epilepsi modeli oluşturulacak klinik nöbet çeşitlerinin çokluğu ve geliştirilen yeni yöntemler nedeniyle epilepsi çalışmalarında kullanılan deneysel modeller oldukça fazla sayıdadır (49).

İdeal bir epilepsi modeli aşağıdaki özelliklere sahip olmalıdır;

- 1- Spontan olarak tekrarlayan nöbetleri olmalıdır.
- 2- Nöbetler insan epilepsi nöbetlerine benzemelidir.
- 3- Modeldeki EEG'nin biçimi, ilgili epilepsi çeşidindeki EEG'ye benzemelidir.
- 4- Nöbetlerin frekansı, antiepileptik ilaçların etkisini akut veya kronik olarak test etmeye yetecek ölçüde olmalıdır (47).

Bu özelliklerin tümünü karşılayan tek bir model şimdiye kadar ortaya konamamıştır. Çünkü, deneysel modellerin hiçbirisi insandaki klinik epilepsiyle tamamen aynı değildir (49). Deneysel modeller değişik sınıflandırmalarla incelenebilirler. Bazı araştırmacılar deneysel modelleri üç gruba ayırırlar (8);

- 1- Konvülsan kimyasal maddeler veya elektrik uyaralarıyla oluşturulan modeller.
- 2- Refleks epilepsi modelleri : Ses ve ışık gibi uyarılarla başlatılan modeller.
- 3- İdiopatik modeller : Genetik olarak epilepsiye meyilli olan hayvanlarda, hem davranış hem de EEG bulguları açısından insandaki idiyopatik epilepsiye benzer bir tablo oluşturabilir.

Bu deneysel modeller, epilepsi nöbet sınıflandırmasına göre aşağıda gösterilmiştir; (30,49)

1- Basit parsiyel (akut)

a) Topikal konvülsanlar

Penisilin

Bikukulin

Pikrotoksin

Kolinerjikler

Antikolinerjikler

b) Akut elektrikselsel uyarı

- c) GABA kesilmesi
- d) Neokortikal dilimler

2- Basit parsiyel (kronik)

- a) Kortekse metal verilmesi

Aluminyum hidroksit

Kobalt

Çinko

Demir

- b) Kriyojenik hasar
- c) Gangliosit antikor verilmesi
- d) Sistemik fokal epileptogenezis

3- Jeneralize tonik-klonik

- a) Genetik

Işığa duyarlı babunlar

Farede sesle oluşan nöbetler

- b) Maksimal elektrik şoku
- c) Kimyasal konvülsanlar

Penisilin

Bikukulin

Pentilen tetrazol

Pikrotoksin

- . Metionin sulfoksimid

- d) Metabolik düzensizlik

Hipoksi

Hipoglisemi

Hiperbarik oksijen

Üremi

Hipertermi

4- Kompleks parsiyel

- a) Kainik asit
- b) Tetanoz toksini
- c) Beyin dilimleri
- d) Tutuřma (Kindling)

5- Jeneralize absans

- a) Thalamus'un uyarılması
- b) Bilateral kortikal odak
- c) Sistemik penisilin
- d) İntraventriküler opiatlar

6- Status epileptikus

- a) Lityum-pilokarpin
- b) Kobalt-homosistein

2.3. PENİSİLİN

Penisilin güçlü bakterisid (bakteri öldürücü) etkileri olan antibiyotiklerden biridir. Molekül yapısında beta laktam halkası içerir (32,43,44). Penisilinler, *Penicillium notatum* ve *Penicillium chrysogenum* gibi bir çok *Penicillium* (yeşil renkli küf mantarları) türlerinden ekstraksiyon ve saflaştırma suretiyle elde edilirler (43,44). 1929’da Alexander Fleming, *Penicillium* türlerinin antibakteriyel etkisini ilk kez göstermiş ve Penisilin ismini kullanmıştır. İlk penisilin kullanılışından bu güne, çok sayıda antimikrobiyal ajan üretilmişse de, penisilin hala bir çok enfeksiyonda etkin olarak kullanılmaktadır (32,43,44).

Penicillium mantarlarının besleyici özel sıvı ortamlardaki kültürlerinden çeşitli doğal penisilin türleri elde edilebilmiştir. Kültür ortamına, özel substratlar (prekürsörler) katılarak doğal olarak üretilen bu penisilinlerden Penisilin-G klinikte kullanılan en önemli doğal penisilindir. Penisilin-G’nin ilaç olarak kullanılmış şekli potasyum veya sodyum tuzlarıdır. Bunlar kristal şeklinde olduklarından “kristalize Penisilin-G” adını alırlar. Penisilin-G, benzil-penisilin diye de isimlendirilmektedir (32,43,44).

Penisilin’in asıl kimyasal yapısı, 6-aminopenisilanik asit (6-APA) tarafından oluşturulur. 6-APA; bir tiazolidin halkası ve buna bağlı dörtlü bir beta-laktam halkasından oluşur. Tiazolidin halkasına bağlı karboksil (- COOH) grubunun serbest olması, penisilin’in türevlerinin oluşturulmasına elverişli bir durum yaratmıştır (32,43,44,68). Penisilinler, direkt veya yalın toksik etkileri en düşük olan ilaçlardır. Ancak, alerjik nitelikteki yan etkileri fazladır. Penisilin alerjisi genel popülasyonda % 3-5, penisilinle önceden tedavi görmüşlerde % 10 kadardır (44). Penisilinler beyin korteksi üzerine doğrudan doğruya uygulanırlarsa, nöronal etki sonucu eksitasyon yaparlar. Parenteral yolla ise, Penisilin-G günde 50 gram gibi çok yüksek dozda verildiğinde, merkezi sinir sistemi eksitasyonuna bağlı konvülsion veya fatal (öldürücü) ensefalopati ortaya çıkarabilir (44).

2.4. PENİSİLİN İLE OLUŞTURULAN DENEYSEL EPİLEPSİ MODELİ

Konvülsan kimyasal uyarılardan, maliyeti düşük ve kolaylıkla uygulanabilen penisilin ile deneysel epilepsi modeli oluşturabilir (30,49).

Penisilin epilepsi modeli, epilepsinin nöronal temeli hakkındaki soruları cevaplamaya yardımcı olan en önemli modellerden biridir. Bu model ayrıca, epileptojenik nöbet aktivitesinin yayılmasının analizi için uygun bir modeldir (30).

Penisilin konvülsif etkisi ilk olarak 1945'de Walker ve Johnson tarafından gözlenmiştir (49). Parsiyel nöbetlerin oluşturulmasında, topikal olarak kullanılan penisilinden yararlanılabilir. Kortikal yüzeye uygulanan penisilin ile akut parsiyel (akut fokal) epilepsideki benzer EEG'ler kaydedilir (30,49,60,64,68).

Merkezi Sinir Sistemi'nde GABA inhibitör, glutamat eksitatör özellikle nörotransmitterlerdir. GABA aracılı inhibisyonun zayıflaması epileptik nöbetin yayılmasında önemli bir etkidir (5). Fokal epilepsi, beyin korteksindeki azalmış GABA aracılı inhibisyon ve glutamata bağlı eksitasyon etkisiyle oluşur (5).

Uyarılan epileptik odaklarda spontan interiktal deşarjlar karakteristiktir. Bu sırada deşarj yapan odak nöronlarının dendritlerinde kalsiyumun (Ca^{++}) aracılık ettiği paroksizmal depolarizan kaymalar olur. Bunları uzamış ardhiperpolarizasyonlar izler. Bu ardhiperpolarizasyonun nedeni kalsiyuma bağımlı potasyum kanallarının aktive olmasıdır (23,49,68). Bu olay, sinaptik girişlerle başlatılır, daha sonra senkron hale gelir. Paroksizmal depolarizan kaymalar, penisilin odağında ortaya çıkar ve yüzeyden kaydedilen interiktal EEG diken (spike) dalgalarını oluştururlar (68). Özetle, penisiline bağılı epileptik nöbet, korteksteki GABA inhibisyonunun azalması ve glutamat salgısının artmasıyla oluşur. Ayrıca, penisilin, kalsiyum ile ilgili olan bazı diken-dalga üreten mekanizmaları serbestleştirdiği kabul edilmektedir (5,23,30,49,59,64).

Penisilinin oluşturduğu epileptik aktivite fokal başlayıp, jeneralize nöbetlerle devam eder. Penisilinin nonspesifik bir GABA antagonisti olabileceği ve GABAerjik etkiyi zayıflatarak konvülsif etki oluşturabileceği düşünülmektedir (25,51,68). Penisilinin epilepsi oluşturan odağından, nöbetin fokal başlayıp yayılarak jeneralize olması şekliyle, klinikteki Grand mal epilepsiye benzerlik gösterdiği bildirilmektedir(68).

Klinik deneyler, insanlarda penisilinin yüksek sistemik dozlarının myoklonus, jeneralize tonik - klonik nöbetler ve ensefalopati oluşturabileceğini göstermiştir (30). Hastane şartlarında, ensefalopati, penisilinin günde 20 milyon ünite (intravenöz yolla) dozunda, özellikle böbrek yetmezlikli olgularda daha kolay oluşabilmektedir. Prince ve Farrell parenteral penisilinin kedilerde jeneralize nöbet oluşturduğunu göstermişlerdir (30). Sıçanlarda da parenteral penisilin jeneralize epilepsi oluşturur (49). Kedilerde sistemik olarak verilen yüksek doz penisilin (200 000 - 400 000 IU/kg) intramuskuler uygulamadan 30-60 dakika sonra jeneralize, bilateral, senkron diken-dalga modelinin belirmesine yol açar ve bu epileptiform aktivite 3-5 saat devam eder. Kaydedilen EEG bulguları, insandaki Petit mal epilepsi ile benzer yapıdadır (49).

Değişik yollarla uygulanabilen kristalize penisilin; basit parsiyel epilepsi, jeneralize myoklonik, jeneralize tonik-klonik ve jeneralize absans epilepsi modellerini meydana getirebilir. Deneysel çalışmalarda penisilinin hangi tip modeli oluşturduğu, EEG ve davranış analizleri yapılarak belirlenebilir (30).

2.5. FORMATİO HIPPOCAMPALİS

Formatio hippocampalis; Hippocampus (Cornu Ammonis), gyrus dentatus, subiculum, alveus ve fimbria hippocampi'den oluşur (2,11,66).

2.5.1. Hippocampus

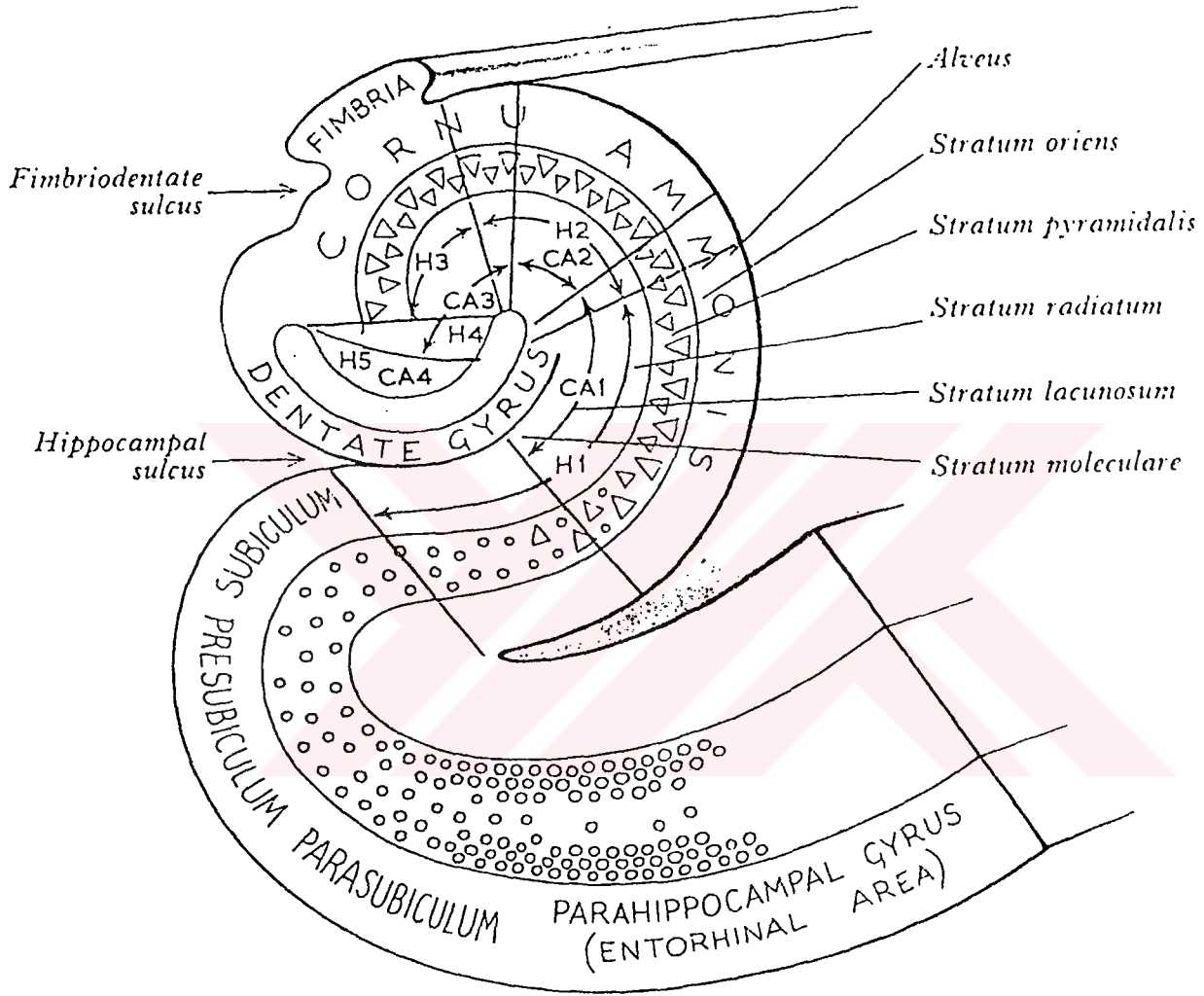
Hippocampus terimi, ilk diseksiyonunu yapan Arantius tarafından 1587'de kullanılmıştır. Arantius, vertikal düzlemdeki profili deniz atına benzediği için bu bölgeye "Hippocampus" ismini vermiştir (76). Hippocampus'un anatomik yapısına ait bilgiler 1911'de Cajal tarafından ortaya konmuştur. Daha sonra Lorente de No (1934) ileri çalışmalar yaparak yeni bilgiler elde etmiştir (18,76). Hippocampus'a, koç boynuzuna benzediği için "Cornu Ammonis (CA)"de denir. Bu yüzden alt bölgelere ayrıldığında CA1,CA2,CA3,CA4 şeklinde kısaltmalar yapılır (63). Hippocampus sürüngenlerden itibaren bütün omurgalılarda filogenetik olarak "eski korteks" anlamına gelen "archiocortex"ın esas kısmını oluşturur (2,10,76). Son yıllardaki deneysel anatomik, elektron mikroskopik, immunohistokimyasal, elektrofizyolojik çalışmalarla ve Pozitron Emisyon Tomografi (PET) ve Magnetik Rezonans (MR) gibi radyolojik görüntüleme yöntemleriyle Hippocampus'un yapısı ve bağlantıları ayrıntılı olarak incelenebilmiştir (1,18,33,76).

2.5.2. Hippocampus Anatomisi

Hippocampus, çift taraflı, ventriculus lateralis'in cornu inferior'unun taban kısmında uzanan, konveks bir "C" harfi şeklinde, anterior - posterior yönde yerleşmiş gri cevher kitesidir (1,2,33,76).

"C" harfinin konveks yüzü ventrikül boşluğuna, konkav yüzü ise hemisferin alt yüzüne doğru yönelmiştir (2). Alt yüzde bulunan bu açıklık, fissur (yarık) şeklindedir ve sulcus hippocampi olarak isimlendirilir. Hippocampus, bu fissurun derinleşerek cornu

inferior'a invagine olması ile meydana gelmiştir. Fissur'un dudakları ise gyrus dentatus ve gyrus parahippocampalis'i oluşturur (2,18,33,76) (Şekil-1).



Şekil-1: Hippocampus formasyonu ve Hippocampus'un şematik görünümü (Hippocampus'un histolojik tabakaları şematize edilmiştir) (76).

2.5.3. Gyrus dentatus

Hippocampus formasyonunu oluşturan yapılardan gyrus dentatus, üzerinde fimbria hippocampi, aşağısında sulcus hippocampalis bulunan, kesitlerde “C” harfi şeklinde görülen bir gri cevher bölümüdür. Gyrus dentatus’taki esas hücre tipi olan granül hücreler, unipolar dendritleri afferent projeksiyonlar şeklinde stratum molekulare’ye uzanmış hücrelerdir. Gyrus dentatus’un hilusu, granüler hücre tabakasının kolları arasında, polimorfik hücrelerden oluşan bölgedir. Cornu ammonis’in piramidal hücre tabakasına komşu olan bu bölgeyi Lorente de No (1934) hippocampus’un CA4 bölgesi olarak tanımlamıştır (10,18,33,75,76).

2.5.4. Subiculum

Subiculum, sulcus hipokampalis’e komşu olan gyrus parahippocampalis’in superior parçasını oluşturur. Subiculum’un, prosubiculum, subiculum, presubiculum ve parasubiculum gibi bölümleri vardır. Subiculum’un bir ucu hippocampus ile diğer ucu ise gyrus parahippocampalis’in korteksiyle devam eder. Subiculum’un ön tarafında area entorhinalis bulunur (10,18,33,75,76).

2.5.5. Alveus

Hippocampus’un ventrikül boşluğuna bakan konveks yüzüne alveus denir. Alveus’u oluşturan myelinli lifler, hippocampus’da bulunan nöronların aksonlarıdır. Bu lifler, hippocampus’un medial kenarına doğru uzanarak fimbria hippocampi’yi oluştururlar. Fimbria hippocampi arkada crus fornicis (fornix) olarak devam eder (2,10,33,76).

2.5.6.Sıçanlarda Hippocampus

Bütün memelilerde hippocampusun yapısal organizasyonu (genel anatomik yapısı) birbirinin benzeridir (10). Sıçanlarda hipokampal formasyon dört basit kortikal bölgeyi kapsar. Bunlar; gyrus dentatus, hippocampus, subicular kompleks (subiculum, presubiculum, parasubiculum) ve entorhinal korteks'dir (1).

Hippocampus; uzun eksen boyunca kıvrılmış "C" harfi şeklindedir ve temporal lobun cauda-ventralinde uzanır (1) (Şekil-2). Hippocampus dört alt bölüme ayrılmıştır; CA1, CA2, CA3 ve CA4 (Resim-1).

CA4, polimorfik hücrelerden oluşan ve gyrus dentatus'un (fascia dentata'nın) hilusuna uyan bölgedir (76). Hilusun dış sınırı granül hücre tabakasının iç sınırı tarafından tanımlanır. İç kenarın orta noktası CA3 bölgesinin piramidal hücre tabakasının medial sonlanması tarafından belirlenir (75).

Yoğun olarak paketlenmiş ince piramidal hücre tabakası, hacim olarak birbirine yakın büyüklükte iki temel elemana bölünmüştür; CA3 (Regio inferior, alt bölge) ve CA1 (Regio superior, üst bölge) (56,75). Bu iki bölgenin arasındaki geçiş (transition) bölgesine CA2 denir. Gyrus dentatus'a ve hilusa yakın olarak uzanan bölge, piramidal nöronların hücre gövdelerini içerir. Hilusa komşu tabakanın sonu, nöronal hücre gövdelerinin organizasyonundaki ani değişiklik tarafından sınırlanır (75).

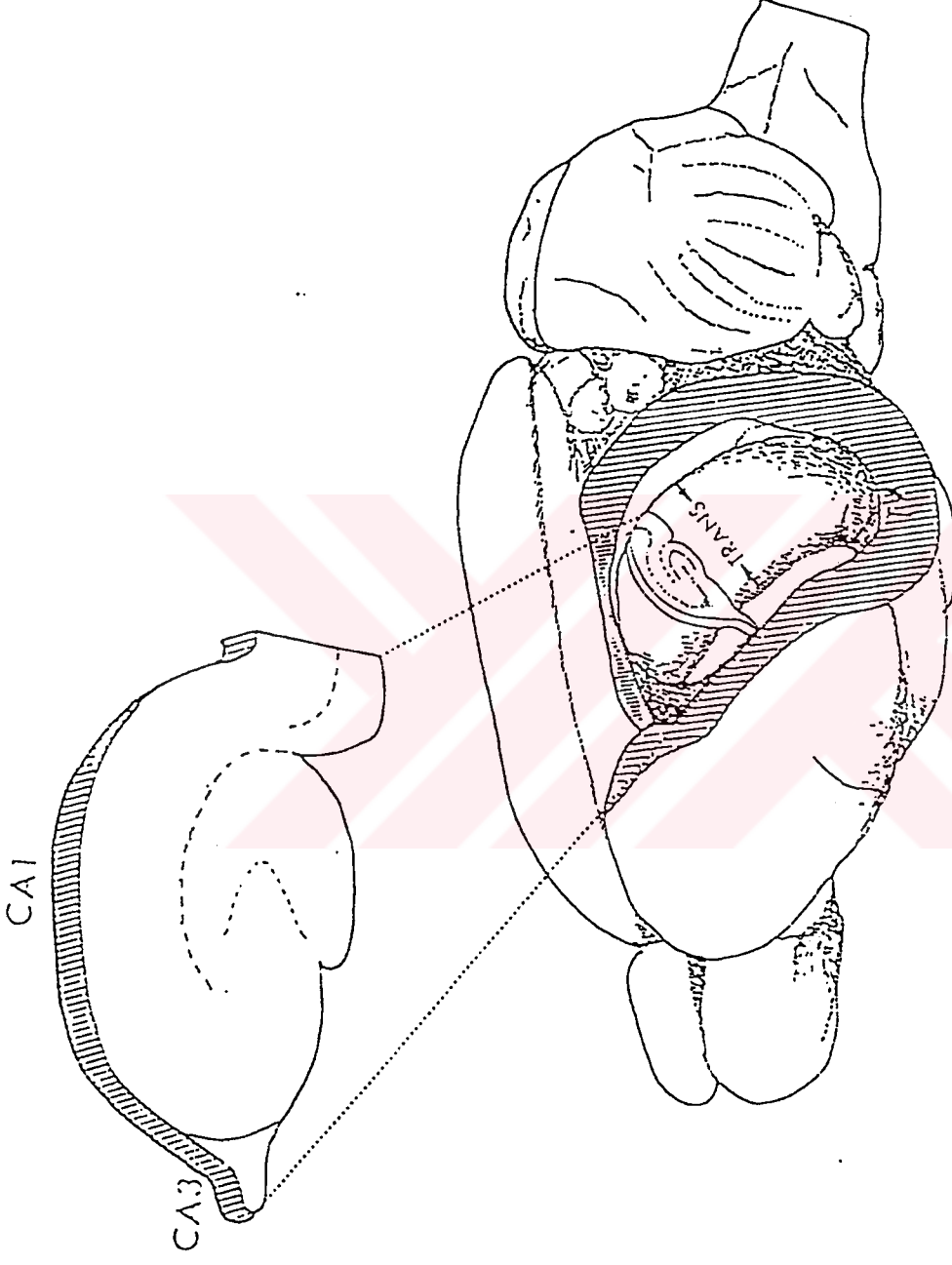
Değişici (transition) bölge (CA2), CA3'e benzer. Fakat daha gevşek organize olmuş şekilde geniş piramidal nöronlar içerir. CA2'nin CA3 ve CA1 ile keskin bir sınırı yoktur (75,76).

CA1'in piramidal hücrelerinin stoplazma ve nükleusları CA3'ünkülerden daha küçüktür. 4-5 hücreli tabaka şeklinde paketlenmiş bir yapı gösterirler. Subiculum'a doğru derin hücre tabakası daha gevşek paketlenir. Subiculum sınırı, bir nokta gibi CA1'in

piramidal hücre tabakasının sona erdiği noktada belli olur (75).

Subiculum, kendine komşu Cornu ammonis'den (hippocampus'dan) daha az yoğunlaşmış piramidal hücreler içerir. Subiculum ile CA1 arasındaki sınır, CA1'in piramidal hücrelerinin hücre gövdelerinin kesildiği yerden devam eder. Subiculum'un medial sınırı presubiculum'un daha küçük hücrelerinin belirgin değişimi ile tespit edilir (75).





Şekil-2 : Sıçanlarda hippocampus'un yerleşimi ve büyütülmüş şeklinin şematize görünümü (1).

2.5.7. Hippocampus Histolojisi

Hippocampus'un tabakalar halinde histolojik bir yapısı vardır. Ventrikülün yüzeyini döşeyen ependim hücrelerinden itibaren aşağıdaki tabakalar bulunur: (10,11,76)

- 1- Ependim hücreleri
- 2- Alveus
- 3- Stratum oriens
- 4- Stratum piramidale
- 5- Stratum radiatum
- 6- Stratum lacunosum
- 7- Stratum molekulare

Hippocampus esas olarak üç tabakadan meydana gelir (Şekil-1).

- 1- Stratum oriens
- 2- Stratum piramidale
- 3- Stratum molekulare

Stratum oriens: Alveus'la stratum piramidale arasında bulunan hippocampus'un en dış tabakasıdır. Stratum oriens nonpiramidal hücrelerden zengindir (10).

Stratum piramidale: Hippocampus'un en geniş tabakasıdır. Bu tabakada piramidal hücreler bulunur (56) (Resim-2 ve Resim-3). Piramidal hücrelerin tabanları alveus'a doğrudur. Düzenli olarak sıralanan hücreler, hippocampus'un şeklini belirler. Bu tabakada ayrıca, hippocampus'un iç aktivitesini düzenleyen ve piramidal hücreler arasında bulunan aksonları veren sepet (basket) hücreleri de vardır. Ancak, bu hücrelerin sayısı % 1'i geçmez (10,11,75).

Stratum molekulare: Az sayıda nöron içeren bu tabaka, stratum radiatum ve

stratum lacunosum- molekular e şekilde gruplandırılarak incelenmektedir (10,11).

Stratum radiatum ve stratum oriens, CA3 ve CA2 hücrelerinin subkortikal yapılardan gelen afferent bağlantıların sağlandığı tabakalardır. CA3'den CA2 ve CA1 bölgelerindeki piramidal hücrelere, Schaffer kollateralleri adı verilen bağlantılar, stratum radiatum ve stratum oriens'te sonlanır. Entorhinal korteks (Brodman'ın 28. alanı) ile gyrus dentatus arasındaki bağlantı (perforant pathway, perforan yol), stratum lacunosum-molekular e tabakasında yapılır. Bu lifler, hippocampus'un piramidal hücrelerinin distal apikal dendritleri ile sinaptik bağlantı kurarlar (56,63,76).

2.5.8.Hippokampal Yollar

Andersen 1971'de, hippocampus organizasyonu hakkında "lamellar yapı" hipotezini ortaya koymuştur. Buna göre, entorhinal bölgeye verilen bir uyarı dört ayrı yolla hippocampus'a yayılır;

- 1- Perforan yollar (Entorhinal korteks'den gyrus dentatus'a)
- 2- Yosunsu (mossy) lifler (Gyrus dentatus'dan CA3'e)
- 3- Schaffer kollateralleri
- 4- CA1'in alvear lifleri

Ayrıca, uyarı hippocampus'un longitudinal eksenini boyunca transvers lameller boyunca yayılmaktadır. Bir lamellar bölgenin komşu lamellaların aktivitelerini eksite edici veya inhibe edici transvers bağlantıları vardır (1).

Son yıllardaki geniş çalışmalarla hippocampus'un bağlantıları büyük ölçüde ortaya konmuştur. Hippokampal efferent liflerin büyük bölümünü piramidal hücrelerin aksonları oluşturur (10,76).

Hippocampus'un afferentleri ise daha çok entorhinal alandan gelmektedir.

Afferent lifler perforan veya alveolar yollarla hippocampus'a ulaşmaktadır.

2.5.8.1.Hippocampus'un iç bağlantıları

Gyrus dentatus'un granüler hücrelerinin yosunsu lifleri, gyrus dentatus'un polimorfik tabakasıyla ve CA3 bölgesi piramidal hücrelerinin proksimal dendritleriyle sinaps yaparlar (76). Entorhinal kortex'den çıkan hücrelerin aksonları da perforan yol ile gyrus dentatus'un stratum molekulare'sinde yayılırlar (76). CA3'ün piramidal hücreleri Schaffer kollateralleri ile CA1'e lifler gönderir. CA1 ise ağırlıklı olarak subicular kompleks ve entorhinal kortex ile bağlantılıdır (63,76).

2.5.8.2.Hippocampus'un dış bağlantıları

Forniks; subiculum ve hippocampus'un büyük piramidal hücrelerinin aksonlarından oluşmuştur. Hippocampus'un esas efferent yolunu bant şeklindeki bu yapı oluşturur. Buradan çıkan lifler, subiculum, entorhinal alan, perirhinal kortex, parahipokampal alan gibi bölgelere ulaşırlar. Hippocampus ayrıca, gyrus cinguli, olfaktor bölgeler, nucleus amygdaloideus, nucleus caudatus, putamen, hypothalamus, insula, thalamus'un anterior bölgesi ve corpus mamillare ile bağlantılıdır (2,11,63,66,76).

Ayrıca, forniks'deki komissural lifler aracılığıyla bir tarafın hippocampus'u, diğer taraftaki hippocampus ile bağlantıdadır. Sıçanlarda da, sağ va sol hippocampus birbiriyle bağlantı halindedir (33,66).

Formatio hippocampalis'de, üç ana yolda, eksitator transmitterlerden glutamat ve/ veya aspartat rol oynar:

- 1- Entorhinal kortex'den başlayıp, gyrus dentatus'da sona eren perforan yol.
- 2- Gyrus dentatus'un granüler hücrelerinden CA3'ün piramidal hücrelerine uzanan yosunsu lifler.

3- CA3'ün piramidal hücrelerinden başlayıp, CA1'in piramidal hücrelerinde sonlanan Schaffer kollateralleri.

Hippocampus'da, GABAerjik nöronlar ise stratum oriens, stratum pyramidale ve stratum radiatumda bulunur (63,76).

2.5.9.Hippocampus'un Fonksiyonları

Hippocampus, içgüdülerimizi ve emosyonel davranışlarımızı yöneten Limbik sistemi oluşturan Limbik loba dahil bir yapıdır (21,63,76). Hippocampus'un beyindeki bir çok bölge ile olan bağlantıları nedeniyle fonksiyonunu tanımlamak zorlaşmaktadır. Hippocampus'un genel görevleri yerine, katıldığı fonksiyonları belirlemek daha iyi bir yaklaşımdır.

Hippocampus kendine özgü yapısı nedeniyle senkronize çalışmaya yatkındır. Hippocampus'un EEG kayıtları her 4-7 saniyede görülen ritmik sinüzoidal tipte "teta" dalgalarıdır. Teta dalgaları senkron nöronal deşarjin belirtisidir. Ancak, korteksin senkronize olduğu durumlarda, hippocampus desenkronizasyon göstermekte, korteksin desenkron olduğu durumlarda da hippocampus senkron hale geçmektedir. Bu paradoksun fonksiyonel rolü anlaşılammıştır (10,33).

Hippocampus'un uyarılmasıyla bir çok endokrin ve davranışsal değişiklikler gözlenmiştir. Aşırı kızgınlık, öfke veya sakinlik, hallüsinasyonlar, defansif davranışlar ve hiperseksüalite görülebilir. Ayrıca, hipofizin lobus anterior'undan hormon salgılanması cevap olarak gelişir (10,21,39).

Epilepsi tedavisi için, bilateral hippocampus'u çıkarılan kişilerde, yeni bilgilerin öğrenilmesi mümkün olmamaktadır. Özellikle sözlü (verbal) öğrenim durur. Çünkü hippocampus yeni edinilen bilgilerin depolandığı yerdir. Bu kişiler her gün gördüğü kişilerin isimlerini ve yüzlerini hatırlayamaz. Ancak, başka bir faaliyet sırasında anlık bir

hatırlama olabilir. Ayrıca, bu kişilerde kısa süreli (yakın) hafıza kaybı oluşur. Anterograd amnezi de denilen bu durumda, kısa bir periyotta kazanılan bilgiler hatırlanamaz. Buna karşılık, uzun süreli hafıza ve önceden öğrenilen bilgiler etkilenmez. Aslında, öğrenme fonksiyonu da yeni bilgilerin basit şekilde edinilmesidir. Bu açıdan, bu iki fonksiyon kaybı birbiriyle ilişkilidir. Uzun süreli hafızanın etkilenmemesinin nedeni, uzun süreli hafızanın tüm serebral kortekste yerleşik olmasındandır (10,11,21,39).

Hippocampus, yeni ezberlenen bilgilerin pekiştirilmesi ve bunları ifade etme fonksiyonlarını görür (10). Hippocampus'un piramidal hücreleri kortikosteroid seviyesindeki değişiklikleri algılar (11). Bundan başka, hippocampus işitme, görme, dokunma, iç organ duyularını çok az olarak da koku duyusunu alır. Bu duyuları, direk efektör organa etki etmeden, limbik sistemin diğer bölümlerine iletir ve toplu bir davranış oluşturulmasını sağlar (10,21). Hippocampus, limbik sistemle otonom sinir sistemi arasında bağlantı kurarak, heyecanın kontrolünde ve iç organlara ait aktivitenin düzenlenmesinde rol oynar (11).

2.6. STEREOLOJİ

Histolojik preparatlardan (kesitlerden) sağlanan mikroskop görüntüleri (oküler görüntüsü, mikrofotograf, monitör veya elektron mikroskop görüntüsü vb.) daima iki boyutludur. Gerçekte üç boyutlu olan biyolojik yapılar mikroskopta iki boyutlu kesit görüntüleri verirler. İşte Stereoloji bu handikap noktasından hareketle, iki boyutlu olarak gözlenen yapı veya cisimlerin üç boyutlu özelliklerini anlamayla ilgili olan bilim dalıdır. Stereoloji, doku ve yapıların geometrik analizini ifade eden ve geometrik ve istatistiksel yorumları ile, iki boyutlu kesitlerden yapıların metrik özelliklerini (sayı, hacim, yoğunluk, uzunluk vb.) bulmayı sağlayan metotların tümünü içermektedir (42). Morfometri ise; yapısal özelliklerin tanımlanmasında sayısal verilerin kullanılmasıdır. Morfometrik veriler, bir yapıya uygulanan ölçme işlemlerinin herhangi bir tipinden elde edilebildiği gibi, doku kesitlerinin stereolojik analizlerinden de sağlanabilir. Bu açıdan, Stereoloji, Morfometri'nin bir dalıdır ve bu iki terim birbiriyle yakın ilişkili, fakat eş anlamlı olmayan terimlerdir (42,79).

Stereoloji, bir yandan iki boyutlu kesit görüntülerinden üç boyutlu sonuçlar elde ederken, öte yandan çağımızın gerektirdiği etkinlik (verimlilik), çabukluk (hızlılık), objektiflik (tarafsızlık) gibi modern kavramları uygulama alanına sokmuştur. Yine, yapılan deneysel çalışmaların matematiksel olarak kontrol edilmesi hataların minimize edilmesini ve standardizasyonunu sağlamıştır. Yapılan analizler, matematiksel ispatlarla desteklendiği için hiçbir itiraza yer bırakmamaktadır.

Stereoloji terimi ilk kez 1961'de Elias tarafından kullanılmış, 1984 yılında Sterio tarafından "yeni ve tarafsız" metodların tarif edilmesi ile yeni bir anlayışa kavuşmuş ve son yıllarda çok hızlı bir gelişme göstermiştir (13).

Stereoloji'de kullanılan metotlarla, beyindeki toplam nöron sayısı, sinaps yoğunluğu veya toplam beyin hacmi hesaplanabildiği gibi, örneğin böbrekte korteks-

medulla oranı, toplam glomerul sayısı; vücuttaki damarların toplam uzunlukları; ince barsakların toplam yüzey alanları; bir hücredeki toplam mitokondri sayısı vb. bir çok biyolojik yapının sayı, uzunluk, alan ve hacim gibi parametreleri kantitatif (sayısal) olarak ortaya konulmakta ve bunlara bağlı olarak objektif yorumlar yapılabilmektedir (37,69).

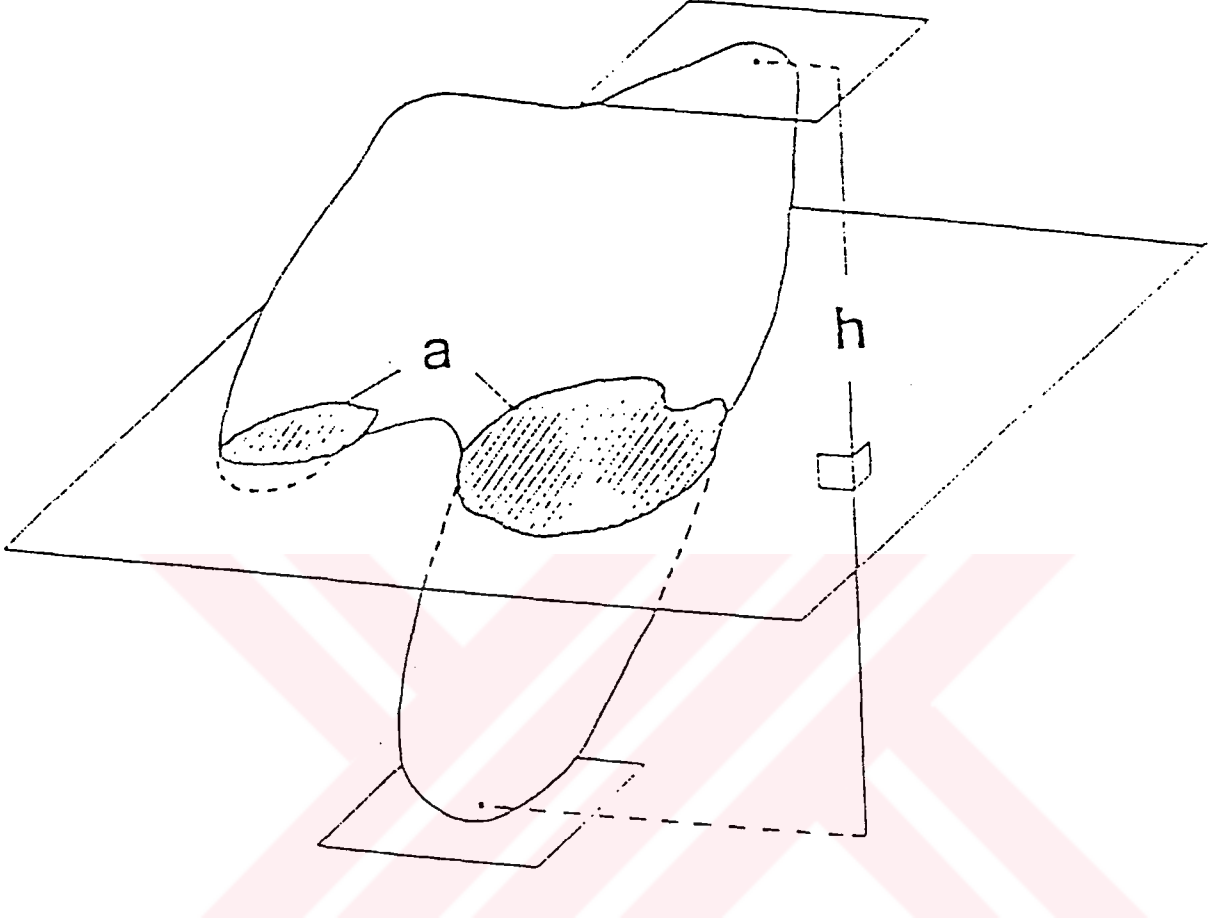
Tıp araştırmalarında kullanılan gerek klasik ışık mikroskopları, gerekse elektron mikroskopları için hazırlanan preparatlar önceden belirtildiği gibi, bir kesit görüntüsünü görmemizi sağlarlar. Kesitler herhangi bir yapının içinden geçen ve yapının elemanları ile kesişen düzlemlerdir (Şekil-3-a,b). Yapının elemanları; sayısı, büyüklüğü, yönelimi, alanı veya hacmiyle orantılı olarak histolojik kesitlerde izdüşümler (profiller) oluştururlar. Sayısı çok olanlar daha az sayıda olanlara, uzun olanlar kısa olanlara, geniş alana sahip olanlar dar alana sahip olanlara, büyük hacimli olanlar küçük hacimlilere göre daha fazla kesilme şansına sahip olduklarından, kesitlerde daha çok izdüşüm verirler. Ayrıca, bir kural olarak üç boyutlu bir yapının içindeki elemanlar, iki boyutlu olan kesit düzlemleri ile kesiştiğinde, kesit düzleminde boyut kaybederek izdüşümler verirler. Yani, bir hacme sahip olan(üç boyutlu) yapı, iki boyutlu bir düzlemlerle kesildiğinde, boyut kaybederek iki boyutlu bir yüzey şeklinde izdüşüm verir. Yine, iki boyuta sahip bir yüzey, bir boyutlu çizgi; tek boyutlu çizgi ise sıfır boyutlu nokta olarak izdüşüm gösterir. Bu genel prensibe “Boyut azalması prensibi” adı verilir (36) (Tablo-1). Dolayısıyla, kesitlerde gözlenen izdüşümler yardımıyla yorumlar yapmak, bu izdüşümlerin ait oldukları bileşenlerin üç boyutlu özellikleriyle ilgili gerçek veriler dikkate alınmadığından yanlış olabilmektedir. Örneğin, bir yapı içerisinde bulunan “x” partiküllerinin (beyinde bulunan nöronlar vb.) sayısını hesaplamak istediğimizde, bunu doğrudan “x” partikülünün izdüşümlerinin bulunduğu iki boyutlu bir kesit üzerinde yapamayız. Çünkü, partiküllerin kesitlerde ortaya çıkan izdüşümleri, partiküllerin büyüklükleri, hacimleri, uzun eksenlerinin kesit alma yönüne dik ya da paralel olması gibi bir çok faktörle ilişkili olarak değişkenlik gösterir.

Tablo-1 : Yapılarda boyut azalması prensibi.

Yapı / Boyut	Dilim izdüşüm boyutu	Kesit izdüşüm boyutu	Çizgi izdüşüm boyutu
Hacim (3)	3	2	1
Yüzey (2)	2	1	0
Uzunluk (1)	1	0	-
Sayı (0)	0	-	-

Bütün bunlar, kesitlerden yararlanılarak yapılan morfolojik çalışmaların, uygun metotlar kullanılmadığı takdirde, hatalı sonuçlar verebileceğini göstermektedir. İşte, Stereoloji bu tür sorunları ortadan kaldırmak için geliştirilmiş bir bilim dalıdır.

Stereoloji'de önemli olan nokta metotların etkin ve tarafsız olmasıdır. Etkinlik (efficiency); en düşük miktarda zaman harcanmasıyla, en düşük seviyeli değişkenlik gösteren verilerin elde edilmesidir. Tarafsızlık (unbiased) ise; gerçek değerden sistematik sapma göstermeyen anlamındadır (37).



Şekil-3-a : Üç boyutlu partiküllerin iki boyutlu kesit düzlemlerindeki şematik görünümü (38).



Şekil-3-b : Üç boyutlu partiküllerin iki boyutlu kesit düzlemlerindeki şematik görünümü (67).

2.6.1.Sistematik Rastgele Örnekleme Stratejisi

Stereolojik metotların temel ilkelerinden birisi Sistematik Rastgele Örnekleme Stratejisi'dir. Histolojik çalışmalarda incelenen yapı yada organlardan çok sayıda kesitler elde edilmektedir. Bu kesitlerin hepsini tek tek incelemek zaman ve enerji kaybına neden olur. Hem bu olumsuz durumu ortadan kaldırmak, hem de Stereoloji'deki etkinlik ilkesini gerçekleştirmek amacıyla, elde edilen kesitlerin arasından, tüm kesitleri temsil edebilecek bir seçim yapmak gerekir. Bu seçim yapılırken yapının her noktasının eşit örnekleme şansına sahip olması istatistiksel açıdan şarttır. İşte bu amaçla istatistik örnekleme yöntemlerinden Sistematik Rastgele Örnekleme kullanılır (62). Sistematik Rastgele Örnekleme, önceden belirlenmiş sabit bir örnekleme aralığı boyunca, ilk örnekleme aralığı içinde rastgele bir noktadan başlamak şartıyla, çalışılan yapının tamamının örnekleme sağlar. Önceden belirlenen ve sabit olan örnekleme aralığı, örnekleme sistematik olmasını; ilk aralık içinde rastgele bir noktadan (kesitten) başlanması ise örnekleme rastgele olmasını sağlar (14,35,36,55,70).

Stereolojik metotlarda kullanılan yöntem ve prensiplerin büyük bir kısmı, Sistematik Rastgele Örnekleme stratejilerinin varyasyonları olarak düşünülebilir (12). Yapılan bütün partikül sayımı, alan hesaplamaları, hacim hesaplamaları gibi çalışmalarda, ilk şart, çalışılan yapının her aşamada (parçaların seçimi, kesitlerin örnekleme, sayım alanlarının belirlenmesi vb.) sistematik ve rastgele olarak örnekleme olmasıdır.

2.6.2.Tarafsız Sayım Çerçevesi

Bütün partikül sayımı yapılacak metotlarda, partikül izdüşümlerinin belirli bir alanla sınırlandırılması gerekir. Klasik olarak uygulanan eski metotlarda örnekleme çerçevesi kare veya dikdörtgen şeklinde kullanılmıştır. Ancak, daha sonra bu çerçevelerin partikül sayısını fazla hesap etmeye neden olduğu anlaşılmıştır. Bu etkiye, "fazla sayım etkisi" (over estimation) denir (36,37). Partikül sayısının sayım çerçevelerinden kaynaklanan hatalar nedeniyle farklı çıkmasına ise "kenar etkisi" adı verilir. 1977'de

Gundersen tarafından tanımlanan sayım çerçevesi, stereolojik metotların tarafsızlık (objektiflik) ve doğruluk ilkelerine uygundur (75). Bu yüzden tarafsız sayım çerçevesi olarak stereoloji literatüründe (terminolojisinde) yer almıştır. Tarafsız sayım çerçevesi; birbiriyle kesişen iki kenarı kalın ve düz, diğer iki kenarı ince ve kesikli çizgi ile çerçevelenmiş kare veya dikdörtgen şeklindedir. İnce ve kesikli çizgiler serbest kenarlar, kalın ve düz çizgiler yasak kenarlardır. Yasak kenarların uzantıları vardır ve bunlar görüntü alanının tamamını kaplayacak şekilde uzatılırlar. Kesikli çizgilere rastlayan izdüşümler sayıma dahil edilirken, kalın çizgilere rastlayan izdüşümler sayım dışı bırakılırlar.

2.6.3. Optik Disektör

Optik disektör 1986'da Gundersen tarafından ortaya konulmuş stereolojik bir metoddur (35). Optik disektörün temel mantığı kalın histolojik kesitlerden sanal olarak optik kesitler elde etmek ve bu kesitlerde partikül sayımı yapmaktır. Kesit kalınlığı, sayım yapılacak partiküllerin en uzunundan daha fazla olmalıdır. Bu değer yaklaşık 25 μm 'dir (13,36).

Sayısal açıklığı büyük bir objektif (1.35-1.40 gibi) kullanılarak, optik kesitler yani odak düzlemleri elde edilebilir (36). Kesit üst yüzeyinden alt yüzeyine veya alt yüzeyden üst yüzeye doğru birbirini takip eden optik kesitler mevcuttur. Bu optik kesitlerde, disektör sayım kurallarının uygulanması, yani iki boyutlu sayım çerçevesinin üç boyuta sanal olarak aktarılması ile partikül sayımı, mikroskop başında veya tek bir monitör görüntüsünde yapılabilir (70,75). Partikül sayımında öncelikle kesitin üst yüzeyinden odaklama yapılır. Görüntünün ilk netleştiği yüzey kesitin üst yüzeyi olarak belirlenir (75). Bundan sonra, mikroskobun mikrovidası hareket ettirilerek kesitin içinde optik olarak ilerlenir ve kesitin alt yüzeyine ulaşılır (70,74,75). Kesitin alt yüzeyine ulaşıldığı görüntü netliğinin kaybolmasıyla anlaşılır. Üst yüzeyden alt yüzeye ulaşınca kadar görüntü alanına giren veya görüntü alanından çıkan partiküller disektör partikülü olarak sayılırlar ve kaydedilirler. Alt ve üst yüzeyler arası, mikrokator adı verilen ve kesitin içinde

derinlik boyutu olarak ilerlemeyi sağlayan, böylece “z” eksenini uzunluğunu ölçen bir aletle tespit edilebilir(13,75). Kesitin kesilme yüzeyindeki fiziksel bozukluk (lost caps) (55,75) ve artefaktlardan etkilenmemek için, kesitin alt ve üst yüzeyinden belli bir mesafe belirlenerek buralarda partikül sayımı yapılmaz (70,75). Bu mesafelere “alt ve üst güvenlik kuşağı” denir. Bu mesafe her iki kuşak için de 3-5 µm'dir. Yani, üst ve alt güvenlik kuşağının arasında kalan mesafe partikül sayımının yapıldığı (optik disektör yüksekliği), üst ve alt güvenlik kuşağı ise sayımın yapılmadığı bölgelerdir (3,12).

Toplam disektör partikül sayısı, toplam disektör hacmine bölünürse, sayısal yoğunluk (Nv) elde edilir. Sayısal yoğunluk değeri, yapının toplam hacmiyle çarpılırsa, toplam partikül sayısına ulaşılır (13,14,36).

$$Nv = \Sigma Q / \Sigma V(\text{disektör}) \text{ ve } N(\text{partikül}) = (\Sigma Q / \Sigma V(\text{disektör})) \times V(\text{referans})$$

Nv: Sayısal yoğunluk

ΣQ : Sayılan toplam disektör partikül sayısı

$\Sigma V(\text{disektör})$: Toplam disektör hacmi

N(partikül): Toplam partikül sayısı

V (referans): Referans alınan yapının toplam hacmi

2.6.4. Parçalama (Fractionator)

Stereolojide en basit ve tarafsız örnekleme biçimi “parçalama”dır. Parçalama; örnekleme planı ile disektör sayım metodu kurallarının bir arada kullanıldığı toplam partikül sayısını bulmayı sağlayan bir yöntem olarak tanımlanabilir (13,35,36,75). Parçalama'nın en önemli özelliği, doku deformasyonlarından (şekil değişikliklerinden), fiksasyon, takip, gömme, kesit alma, boyama gibi histolojik işlemlerden dolayı oluşabilecek büzüşme veya şişme gibi etkilerden bağımsız olarak kullanılabilmesidir (13,36,55,70,75). Bu metotta, mikroskop büyütmesinin veya yapının toplam hacminin bilinmesine de ihtiyaç yoktur (55). Ayrıca, kesitten partikülün bir bütün olarak ayrılması

veya kesilmesi anlamına gelen “lost caps” etkisinden de bağımsızdır (13,75). Bu metot frozen (dondurma) yöntemi, parafin ve plastik gömme metotlarında kullanılabilir (70). Tüm bu nedenlerle, etkin bir yöntem olarak en çok kullanılan metotlardan birisidir. Parçalama yöntemi, partikül sayımında kullanılan disektör uygulamasının tipine göre optik ve fiziksel parçalama olarak ikiye ayrılmaktadır.

2.6.5. Optik Parçalama (Optical Fractionator)

Optik Parçalama, incelenecek bölge hacminin uniform (tek tip) sistematik rastgele örnekleme ile elde edilen belli bir bölümünde, üç boyutlu sayım yöntemi olan optik disektörle hücre sayımıdır. Optik Parçalama, optik disektörün özelliğinden dolayı yapıdaki partiküllerin şekli, büyüklüğü, yönelimi ve kesit alma yönünden etkilenmez (35,75).

Optik Parçalama, yapının tümünden geçen kesitlerden sistematik rastgele örnekleme ile elde edilen belli bir bölümünde, bu kez ilgilenilen partikül içerdiği düşünülen kesit alanlarının ve yine kesit kalınlığının belli bir oranının sistematik örneklenmesi ile uygulanır (35,36,55,75). Böylece, aslında sayım için tüm yapının küçük bir parçası örneklenmiştir. Önemli olan bu örneklenen bölgelerin, ilgilenilen yapının kaçta kaçına karşılık geldiğinin, yani ana yapıya olan oranının bilinmesidir. Örneklenen parçadan elde edilen partikül sayısı örneklenen parçanın ana yapıya oranları ile çarpılırsa, toplam partikül sayısına ulaşılmış olur.

Örnek olarak seçilen parça veya kesitlerin, örneğin alındığı yapının ne kadarlık bir oranına karşılık geldiği bilinmelidir. Bu değer parçalama katsayısı olarak isimlendirilir ve “f” olarak gösterilir (74). Öyleyse toplam partikül sayısı şu formülle gösterilebilir :

$$N(\text{toplam}) = (\Sigma Q) \times (1/f_1) \times (1/f_2) \times (1/f_3) \times \dots \dots \dots (13,55).$$

ΣQ : Optik disektör partikül sayısı

2.6.5.1. Kesit Örnekleme Oranı (Fraksiyonu) (KeÖÖ)

Partikül sayımı yapılacak yapının tümünden kesitler elde edilir. Bu kesitlerden sistematik rastgele örnekleme stratejisi ile en az on kesit elde kalacak şekilde, belli sayıda kesit seçilir. Örneğin her beş kesitten birisi alınacak olursa, kesit örnekleme oranı 1 / 5 olur. Böylece, başlangıçtaki formülde $f_1 = 1/5$ olacaktır (35,74,75).

2.6.5.2. Alan Örnekleme Oranı (Fraksiyonu) (AÖÖ)

Sistematik rastgele örnekleme ile seçilmiş olan kesitler mikroskoba konulur. İlgilenilen bölgenin izdüşüm alanı; önceden belirlenen aralıklarla x ve y eksenleri boyunca taranır. Buna x,y adımlama alanı denir. Her adımlama sonucu görüntüde görülen bu adım alanının, sadece yine ölçüleri önceden belirlenen bir alanında partikül sayımı yapılacaktır. Ölçüleri önceden bilinen alan, Gundersen'in tarafsız sayım çerçevesidir.

Böylece, partikül sayımı yapılacak, alan örnekleme oranı = a(tarafsız sayım çerçevesi) / a(x,y adımlama) şeklinde olur (3,74,75).

2.6.5.3. Kalınlık Örnekleme Oranı (Fraksiyonu) (KaÖÖ)

x, y adımlamaları ile belli bir örnekleme bölgesine geldikten sonra, bu mikroskop görüntüsünde optik disektör sayım kuralları uygulanacaktır. Bu metotta, önceden açıklandığı gibi, kesit kalınlığının tamamı boyunca değil, önceden belirlenmiş belli bir oranında sayım yapılmaktadır. Partikül sayımı, üst ve alt güvenlik kuşakları arasında kalan optik disektör yüksekliği boyunca yapılmaktadır (Bunun nedeni lost caps denilen partikül dökülmesi sorununu ortadan kaldırmaktır). İşte bu disektör yüksekliğinin, kesit kalınlığına oranına kalınlık örnekleme oranı (fraksiyonu) denir.

Böylece, kalınlık örnekleme oranı (fraksiyonu) = $h(\text{disektör}) / t$ şeklinde olur (3,74,75).

$h(\text{disektör})$: Disektör yüksekliği
 t : Ortalama kesit kalınlığı.

Başlangıçta, toplam partikül sayısı için verilen formül artık aşağıdaki biçimde ifade edilebilir;

$$N(\text{toplam}) = (\Sigma Q) \times (1/Ke\ddot{O}O) \times (1/A\ddot{O}O) \times (1/Ka\ddot{O}O) \quad (3,13,35,74,75).$$

$$N(\text{toplam}) = (\Sigma Q) \times (1/Ke\ddot{O}O) \times (1/a(\text{tarafsız sayım çerçevesi})/a(x,y \text{ adımlama})) \times (1/h(\text{disektör})/t)$$

$N(\text{toplam})$: Toplam partikül sayısı

ΣQ : Toplam disektör sayısı

$a(\text{Tarafsız sayım çerçevesi})$: Tarafsız sayım çerçevesi alanı

$a(x,y \text{ adım})$: x ve y eksenlerindeki adımlama alanı

$h(\text{disektör})$: Disektör yüksekliği

t : Ortalama kesit kalınlığı

Optik parçalayıcı için;

- 1- Mümkün olduğunca kalın kesitler alınmasına,
- 2- Mikroskop objektifinin yüksek sayısal açıklığa sahip olmasına özellikle dikkat edilmelidir(54).

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada; aynı yaş grubundan, 4-5 aylık, dişi, 220-350 gr. ağırlığa sahip, 12 adet (6 adet deney grubu, 6 adet kontrol grubu) erişkin Sprague-Dawley cinsi sıçanlar kullanıldı. Sıçanlar, altları plastik, üstleri tel kafeslere kondu. Kafes içine talaş serpildi ve kafesler belli periyotlarda temizlendi. Hayvanlara süt-pelet adı verilen sıçan yemi verildi. Yem ve su kapları sürekli kontrol edilerek, hayvanların yeterli miktarda su ve yem almaları sağlandı. Hayvanların bulunduğu ortam, 12 saatlik aydınlık-karanlık siklusu bulunan ve standart oda ısı (22 ± 2 °C) sağlanan bir ortamdı. Hayvanlara yapılan tüm işlemler hijyenik kurallara uygun olarak, semisteril şartlarda gerçekleştirildi.

Sıçanlar rastgele olarak iki gruba ayrıldı:

1- Deney grubu (n=6) : İntrakortikal penisilin verilerek, deneysel penisilin epilepsi modeli uygulanması planlandı.

2- Kontrol grubu (n=6) : İntrakortikal, aynı miktarda Serum Fizyolojik (% 0.9 NaCl) verilerek deney grubuyla karşılaştırılması planlandı.

Operasyona alınan deney grubu hayvan Xylazine (Rhompun) ve Ketamin (Ketalar) ile anestetize edildi. Uygulama, ilaçlar tek bir insülin enjektörüne alınarak ve intraperitoneal olarak yapıldı. Hayvan 4-5 dakika sonra derin anesteziye girdi. Daha sonra sıçan, operasyon tablasına alındı. Hayvanın kafa derisi gözlerinin üzerinden başlayıp, iki kulak arasını kapsayacak şekilde bir jiletle traş edildi ve bu bölgedeki kıllar temizlendi. Traş edilen bölge betadin ile temizlendi. Bir bistüri ile kafa derisi orta hatta, anterior-posterior yönde 2-3 cm. kesildi. Yaklaşık kesi yeri, gözleri birleştiren hat ile kulakları birleştiren hattın arasında ve bu iki hayali çizgiye dik şekildedir. Bregma'nın yerini tespit etmek için, önce deri altı dokuları, sonra periosteum bistüri ile kürete edildi. Hemostazı sağlamak için, önceden hazırlanmış top şeklindeki küçük pamuk parçaları ile

kemik doku yüzeyine tamponlama yapıldı. Bregma frontal kemiğin arkada iki parietal kemik ile birleşme yerine, bir başka deyişle coronal suturun sagittal sutur ile kesişme noktasına verilen isimdir. Burası, kafatası için önemli bir kriter noktasıdır (15,34,57). Bregma açığa çıktıktan sonra, bregma'nın 2 mm. posterior, 1 mm. lateralinden sağ korteks üzerine isabet eden bir nokta belirlendi. Os parietale yüzeyindeki bu noktadan drill ile bir delik açıldı. Bu işlemde, drill nokta üzerinde sabit şekilde tutuldu, yarım daire şeklinde sağa sola çevrilerek hafif bir basınç uygulandı. Kemik tabakayı delme işlemi, kortekse ulaşıncaya sona erdi. Drill'in kortekse girmemesine dikkat edildi.

Eczaneden satın alınan Penisilin-G (1 000 000 IU, Pfizer) steril distile su kullanılarak seyreltildi. 500 IU, 0.1 cc. miktarındaki penisilin-G, ucu düz şekilde kesilmiş ve kısaltılmış insülin enjektörü ile 1 mm. intrakortikal derinliğe inilerek, korteks içine verildi.

Operasyondan sonra, kanama olmamasına dikkat edilerek, kesilen deri suture edildi. Bu sırada, kesilen deri parçalarının tam olarak karşı karşıya getirilmesi ve deride büzüşme olmaması sağlandı. Bu işlem bittikten sonra, deri bölgesi enfekte olmaması için betadin ile temizlendi.

Hayvanın kafa derisi üzerine, EEG kaydı için, iki adet gümüş plaka kondu. Bu plakalar ince birer kablo ile EEG kayıt aletine bağlıydı.

Hayvanda ortalama 2-3 dakika sonra epileptiform değişiklikler başladı. Elektriksel deşarjlar EEG aleti ile kaydedildi. Yaklaşık bir saat nöbetler gözlemlendikten sonra kafa derisindeki gümüş plakalar çıkarıldı. Hayvan kafese alındı, numaralandı ve yem ve su verildi. Bundan sonra, hayvan gözleme alındı ve gözlemler laboratuvar defterine yazıldı.

7.günün sonunda, hayvanlar Xylazine (Rhompun) ve Ketamin (Ketalar) ile intra peritoneal yoldan anestezize edildi. Derin anesteziyeye giren sıçan daha sonra, operasyon tablasına alındı ve bir bistüri sapı yardımıyla medulla spinalis'e foramen magnum'un alt

noktasından şiddetli bası suretiyle dekapitasyon işlemi uygulandı. Bu sırada, hayvanın kuyruğundan aniden çekilmesiyle ölümün kesin ve çabuk olması sağlandı. Çok hızlı bir şekilde kafatası ince ve keskin bir makasla foramen magnum'dan başlayarak, önce orta hatta ve daha sonra yanlara doğru kesildi, craniotomi sonrası beyin açığa çıkarıldı. Taban kısmında bulunan sinirler önden arkaya doğru kesildi. Arkada cerebellum'un altından kesi yapılarak, beyin sapı medulla spinalis'in başlangıcından ayrıldı. Bundan sonra beyin kafatası içinden çıkarıldı. Bu işlem 2-3 dakika içinde tamamlandı. Cryostat aletine ait taşıma tablası üzerine alınan beyin, -50°C'de hazır tutulan Cryostat aletinin içine (Leica CM3050) kondu (Resim-4). Böylece beyin çok hızlı bir şekilde donduruldu (freezing) ve fiksasyonu sağlanmış oldu. Beynin taşıma tablasına yapışması ve dondurma işleminin hızlanması için üzerine jel (tissue freezing medium) döküldü.

Taşıma tablası alet içinde kendine ait bölmeye kondu. Taşıma tablası, mikrotom bıçağının transvers olarak kesit alabilmesi için uygun şekilde yerleştirildi. Alet içinde mikrotom bıçağı ile 150 µm kalınlıkta ve optik parçalayıcı örnekleme stratejisine uygun olarak kesitler alındı. Kesit alma işlemi beyin dokusunun sonuna kadar devam etti. Alınan kesitler birer lam üzerine toplandı ve numaralandı. Böylece, hücre sayımında kullanılacak kesitler boyanmaya hazır hale geldi.

Hücreler doğal durumlarında fikse edilip, kesit alındığında klasik ışık mikroskopunda görülemezler. Hücreleri görülebilir yapmak için en uygun yol özel hücre boyaları ile boyamaktır. Çalışmamızda, histolojik kesitler hematoxylen-eosin (H.E.) ile boyandı. Hematoxylen-eosin rutin bir boyama metodu olup, hücre ile hücre uzantılarını boyamaktadır. Bu boyama metodunda hücrenin nükleusu mavi, stoplazması pembe olarak boyanmaktadır. Çalışmamızda, hücrelerin nükleusu esas alınacağından, nükleusu stoplazmadan ayıran bu metot uygun bir methodur. Kesitler rutin hematoxylen-eosin boyama serisinden geçirildikten sonra üzerlerine entellan döküldü ve lamelle kapatıldı. Kesitler daha sonra kurumaya bırakıldı. Kurutma işleminden sonra, histolojik kesitler klasik ışık mikroskopunda incelenmeye hazır hale geldi.

Kontrol grubu sıçanlara, deney grubu hayvanlara yapılan cerrahi işlemlerin aynı yapıldı. Ancak, intrakortikal uygulanan penisilin-G yerine aynı miktar (0.1 cc.) Serum Fizyolojik (% 0.9 NaCl) verildi. 7. gün sonunda dekapitasyon sonrası craniotomi ile çıkarılan beyinler Cryostat aletinde donduruldu ve optik parçalamaya uygun kesit alınmasından sonra, hematoxylen-eosin ile boyandı. Böylece, elde edilen kesitler klasik ışık mikroskobunda incelenmeye hazır hale geldi.

3.1. Stereolojik sayımlar ve Optik Parçalama

Optik Parçalama, üç boyutlu bir sayım metodu olan optik disektör ile parçalamanın örnekleme stratejisinin bir kombinasyonudur. Parçalama örnekleme stratejisi ile ilgilenilen yapının toplam hacminin bilinmesine ihtiyaç kalmadan, yapıdaki toplam hücre hesaplaması yapılabilmektedir (75).

Çalışmamızda hippocampus bölgesindeki toplam nöron sayısı hesaplanmasında optik parçalama yöntemi kullanıldı. Stereolojik sayım işleminde, piramidal hücrelerin nükleusları sayıldı. Her piramidal hücrenin, bir adet nükleusu olduğu için, hesaplamalarda nükleus sayıları piramidal hücre sayısı olarak alındı (75). Sayım işlemleri hippocampus'un CA1, CA2 ve CA3 alt bölgelerinin stratum piramidale tabakasında yapıldı (Resim-1,2,3). Hippocampus'un stratum piramidale tabakasında piramidal hücreler bulunur. Ayrıca yaklaşık % 1 gibi düşük bir oranda sepet hücreleri de mevcuttur. Sepet hücrelerinin nükleusları, piramidal hücre nükleuslarına benzer. Bu yüzden, toplam nöron sayısı, bu hücreleri de kapsayacak şekilde hesaplandı (75).

3.2. Parçalayıcı örnekleme stratejisine uygun kesit alma ve kesit örnekleme oranı

Cryostat aletinin içinde, beyin dokusu; transvers olarak, 150 µm kalınlıkta sonuna kadar kesildi. Elde edilen tüm kesitlerden en az 10 adet seçildi. Bu seçim Sistematik Rastgele Örnekleme stratejisine göre yapıldı. Buna göre, hippocampus içeren kesitlerden en az 10 adet kalması için her 4 kesitten birisi seçildi. İlk 4 kesitten hangisinin seçileceği

rastgele olarak belirlendi (kura ile) ve bundan sonraki her 4. kesit incelenmek üzere ayrıldı. Böylece kesit örnekleme oranı ($1 / f_1$), her 4 kesitte, 1 adet kesit seçildiği için ($1 / 4$) oldu. ($KeÖO = 1 / 4$). Ancak, bazı hayvanlarda, en az 10 adet kesit kalması için, 2 kesitten birinin seçilmesi gerekti. Bu hayvanlar için $KeÖO = 1 / 2$ oldu.

3.3. Alan örnekleme oranı (AÖO)

Parçalayıcı örnekleme stratejisine göre, sistematik biçimde rastgele seçilmiş kesitler boyandıktan sonra, ayrı ayrı mikroskoba (Nicon Eclipse E 600) yerleştirildi. Hippocampus bölgesi X4 büyütmede bulunduktan sonra mikroskop objektifi X100 (immersiyon, sayısal açıklık 1.25) büyütmeye getirildi. Görüntü, mikroskoba monte edilmiş video kamera (Hitachi OSP Color Video CameraVK - C220E) ile bir monitöre (Sony Trinitron Color Video Monitor PVM - 14N1MDE) aktarıldı (Resim-5).

Bu işlemden önce, monitör üzerinde adımlama aralığını tespit etmek için, Thoma Lamı ile görüntü kalibre edildi (Thoma Lamı'nın çizgileri arası 0.1 mm.'dir). Bunun için Thoma Lamı mikroskoba konulup, görüntüde çizgiler arası, X100 büyütmede belirlendi. Daha sonra, bir asetat monitör üzerine kondu ve bu çizgiler bir cetvel kullanılarak, asetat kalemiyle çizildi. Böylece, asetat üzerine çizilen çizgiler arası 100 μm (0.1 mm.) oldu.

Görüntü kalibrasyonu sağlandıktan sonra, mikroskopta bulunan kesit görüntüsünde 300 μm aralıklarla "x" ekseninde ve 300 μm aralıklarla "y" ekseninde "adımlama" yapıldı. Bütün kesitlerde aynı işlem yapıldıktan sonra, hippocampus CA1,CA2,CA3 alt bölgelerinin, stratum pyramidale tabakası, x ekseninde 300 μm 'lik ve y ekseninde 300 μm 'lik aralıklarla taranmış oldu. Her adımlama sonucu, monitör görüntüsüne gelen sol hippocampus CA1,CA2,CA3 alt bölgesine dahil olan alanda nükleus (hücre) sayımı yapıldı. Böylece, x,y adımlama alanı ($a(x,y \text{ adımlama}) = 300 \mu\text{m} \times 300 \mu\text{m} = 90\,000 \mu\text{m}^2$) oldu.

Her adımlama sonucu monitöre gelen görüntünün tamamında sayım yapılmadı. Görüntünün, sadece ölçüleri önceden tespit edilen tarafsız sayım çerçevesinde sayım yapıldı. Tarafsız sayım çerçevesinin kenarlarını belirlemek için, daha önce adımlama aralığını tespit etmekte kullanılan Thoma lamından yararlanıldı. Mikroskop objektifi X100 büyütmedeyken asetata çizilen Thoma lamı aralıkları 100 µm idi. Bu kare şeklindeki alanın ortasına, gerekli kalibrasyon yapılarak, kenarları 25 µm olacak şekilde bir çerçeve çizildi. Bazı hayvanlar için, tarafsız sayım çerçevesinin kenarları 20 µm olarak alındı. Çerçevenin birbirine dik sol ve alt kenarları yasak kenarlar, diğer iki kenar serbest kenar olarak belirlendi. Yasak kenarların uzantıları çizildi. Böylece üzerinde tarafsız sayım çerçevesi çizili asetat monitör üzerine yapıştırıldı. Sayımlar, bu çerçevenin içindeki ve serbest kenarlarla temas eden nükleuslar sayıma dahil edilerek yapıldı.

Tarafsız sayım çerçevesinin eşit iki kenar uzunluğu 25 µm idi. Bu yüzden Tarafsız sayım çerçevesinin alanı (a(tarafsız sayım çerçevesi)) = 25 µm x 25 µm = 625 µm² oldu. Tarafsız sayım çerçevesinin kenarları 20 µm olarak alınan hayvanlar için; tarafsız sayım çerçevesinin alanı (a(tarafsız sayım çerçevesi)) = 20 µm x 20 µm = 400 µm² oldu.

Bu iki değerden sonra;

Alan örnekleme oranı (AÖO) = (a(tarafsız sayım çerçevesi)) / a (x,y adımlama)
= 625 µm² / 90 000 µm² bulundu.

Bu değer, Tarafsız sayım çerçevesinin kenarları 20 µm olarak alınan hayvanlarda;

Alan örnekleme oranı (AÖO) = (a(tarafsız sayım çerçevesi)) / a (x,y adımlama)
= 400 µm² / 90 000 µm² olarak bulundu.

3.4.Nükleus (hücre) sayımı

“x” ve “y” eksenindeki adımlamalar ile belli bir örnekleme bölgesine gelindikten sonra, bu bölge hippocampus CA1, CA2, CA3 alt bölgelerinin stratum pyramidale

tabakası sınırları içinde ise (hippocampus CA1, CA2, CA3 alt bölgelerinin stratum piramidale tabakasının sınırlarını belirlemek için, Nikon-113434 NS marka Stereoskobik mikroskoptan yararlanıldı), optik disektör sayım kuralları uygulanarak nükleus (piramidal hücre) sayımı yapıldı (Tablo-2'de Deney-1 ve Kontrol-1 numaralı sıçanlarda sayılan disektör nöron sayıları verilmiştir).

Görüntü alanındaki tarafsız sayım çerçevesi içinde, ilk netleşen nükleus görüntüsü kriter alınarak, kesitin üst veya alt yüzeyi belirlendi ve mikroskobun mikrovidası işaretlendi. Daha sonra, 10 µm'lik bir güvenlik kuşağı bırakılarak, kesit içinde optik olarak ilerlendi. Bu mesafede, herhangi bir nükleus görüntüye girse bile sayım dışı bırakıldı. 10 µm'lik ilerlemeden sonra, mikroskobun mikrovidası döndürülmeye devam edilerek, 30 µm'lik disektör yüksekliği boyunca optik kesitler şeklinde, kesit içinde ilerlendi. Optik disektör yüksekliği boyunca tarafsız sayım çerçevesinin içine düşen veya serbest kenarlarla kesişen nükleuslar sayıldı. Yasak kenarlarla veya bunların uzantıları ile kesişen nükleuslar ise sayım dışı bırakıldı. Optik disektör yüksekliği geçildikten sonra, kesitin sonuna kadar mikrovida ayarı ile gidildi. Kesitin alt yüzeyi, en son olarak gözlenen net nükleus görüntüsü olarak belirlendi.

3.5.Kalınlık Örnekleme Oranı (KaÖO)

Histolojik kesitlerdeki kesit kalınlığı ölçümü elektronik "mikrokator" adı verilen bir alet yardımıyla ölçülmektedir (36). Mikrokator, "z" eksenindeki derinlik boyutunu, mikroskop tablosunun hareketleri ölçerek belirleyebilen ve böylece optik olarak düzlemler boyunca kesitin içinde ne kadarlık ilerleme yapıldığını tespit edebilen bir alettir. Klasik ışık mikroskobunda, kesit kalınlığı mikroskobun mikrovidası döndürülerek kesitin içinde optik düzlemler boyunca ilerlerken ilk netleşen görüntü ile en son gözlenen net görüntü arasında kalan mesafenin mikrovidadan okunması ile elde edilebilir. Bu işlem için mikroskobun mikrovidasındaki göstergede yer alan rakamların, gerçekte kesit kalınlığının ne kadarına karşılık geldiğinin kalibre edilmesi gerekir. Çalışmamızda bunu sağlamak için, bir lamelin alt ve üst yüzeylerine iki farklı renkte iki çizgi çizildi. Bu lamel

bir lam üzerine yapıştırıldı. Mikroskopta, mikrovida döndürülerek lamel üst yüzeyine çizilen ilk çizgi bulundu. Bu mikrovida değeri not edildi. Mikrovida döndürülmeye devam edilerek, farklı renkteki diğer çizgiye ulaşıldığında, bu mikrovida değeri lamelin alt yüzeyi olarak kabul edildi ve değer okundu. İki değer arasındaki fark mikrovida üzerindeki göstergeden belirlendi. Mikrovidadaki değerlerin gerçek karşılığını bulmak için, lamel 90⁰ dik konumda mikroskop tablasına yerleştirildi. X10 büyütmede lamelin dik konumdaki kenarı monitör görüntüsüne getirildi. Thoma lamı kullanılarak önceden kalibrasyonu sağlanan monitör görüntüsünde lamelin gerçek kalınlığı ölçüldü. Bu ölçüm sonucu, lamelin gerçek kalınlığı ile mikrovida döndürülerek bulunan değerlerin karşılaştırılması sağlandı.

Çalışmamızda kesit kalınlığı, mikroskobun mikrovidası döndürülerek kesitin içinde optik düzlemler boyunca ilerlerken ilk netleşen nükleus görüntüsü ile en son gözlenen net nükleus görüntüsü arasında kalan mesafedir. Bu şekilde her hayvan için örneklenen bütün kesitlerdeki kalınlık ölçümleri yapıldı. Böylece, ortalama kesit kalınlığı bulunmuş oldu.

Kalınlık örnekleme oranı $(Ka\ddot{O}O) = h(\text{disektör}) / t$ değeri bulundu.

$h(\text{disektör})$: Disektör yüksekliği (Çalışmamızda disektör yüksekliği 30 μm olarak alındı)

t : Ortalama kesit kalınlığı

Bu değerler bulunduktan sonra;

$N(\text{toplam}) = (\Sigma Q) \times (1/ Ke\ddot{O}O) \times (1/ A\ddot{O}O) \times (1/ Ka\ddot{O}O)$ formülünde yerine kondu. Böylece, toplam nöron sayısı hesaplandı.

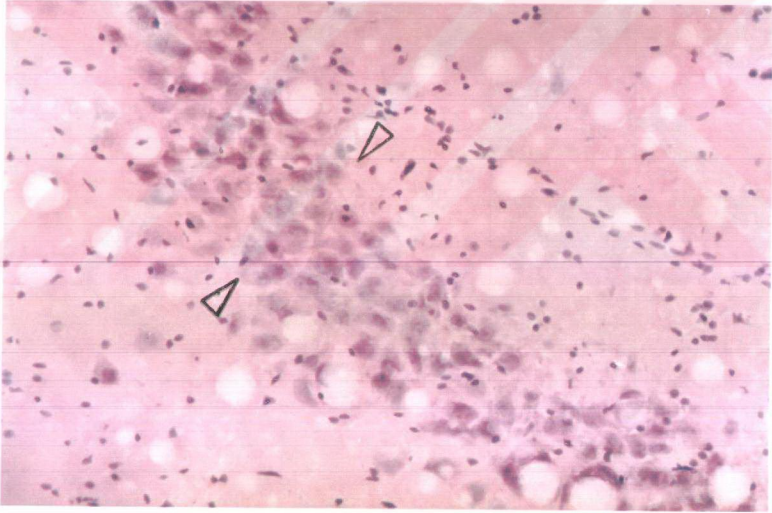
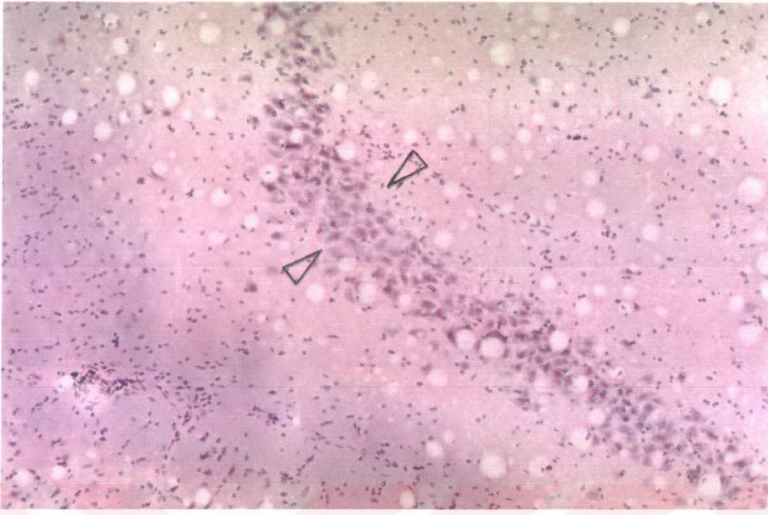
Örnekleme planının yeterliliği Hata Katsayıları hesaplanarak kontrol edildi (Tablo-8,9,10).

Tablo-2 : Deney-1 ve Kontrol-1 numaralı sıçanlardan Sistematik Rastgele Örnekleme Stratejisine göre alınan kesitlerde, hippocampus'ta (CA1, CA2, CA3 alt bölgeleri) sayılan disektör partikül (nöron) sayıları.

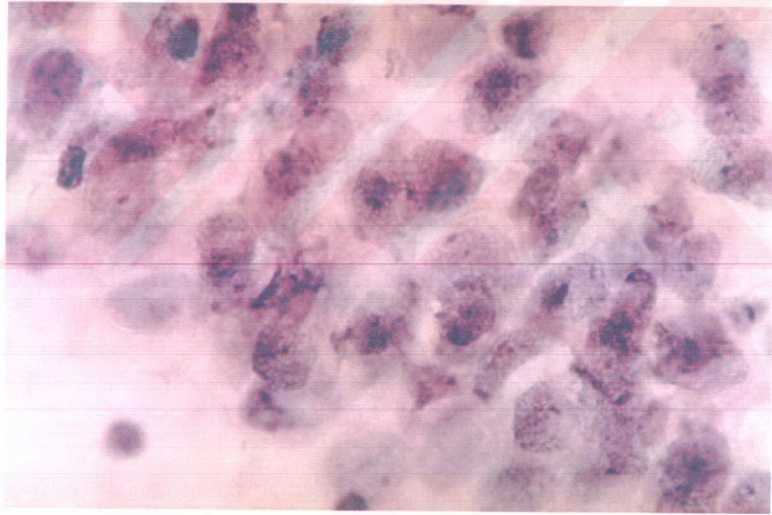
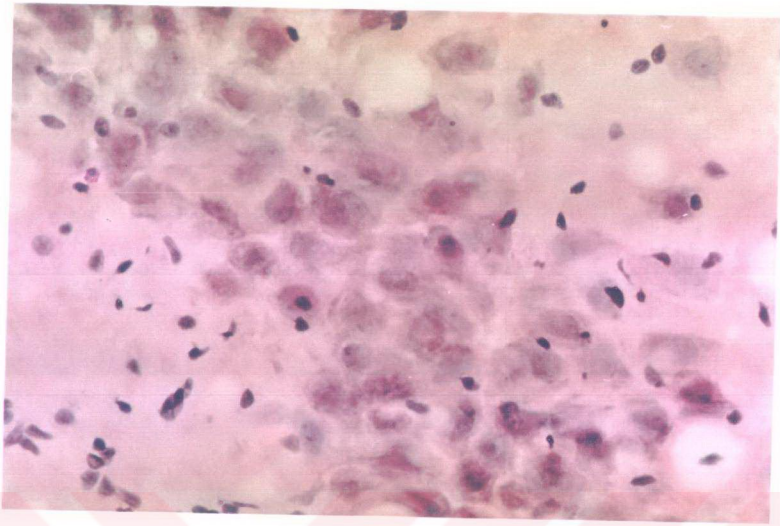
	Deney-1	Kontrol-1
Kesit No	Q` (disektör partikül sayısı)	Q` (disektör partikül sayısı)
1	18	15
2	16	14
3	18	17
4	5	11
5	9	14
6	8	18
7	12	16
8	13	18
9	17	12
10	12	19
11	-	9
12	-	16
Toplam(Q`)	128	179



Resim-1 Sıçan hippocampus'unun ışık mikroskop görüntüsü (H.E., X 10).



Resim-2 : Hippocampus'un nöron sayımı yapılan stratum pyramidale tabakasının;
a) X 10 büyütmedeki (H.E., Üste)
b) X 20 büyütmedeki (H.E., Altt) görünümü.



Resim-3 : Hippocampus'un nöron sayımı yapılan stratum pyramidale tabakasının,

a) X 40 büyütmedeki (H.E., Üstte)

b) X 100 büyütmedeki (H.E., Alttı) görünümü

BULGULAR

4.1. Korteks içine verilen maddelerin etkileri

A- Deney grubu sıçanlarda korteks içine verilen Penisilin'in epileptik etkileri:

Deney grubu hayvanlara, 500 IU, 0.1 cc. Penisilin-G'nin verilmesinden ortalama 2-3 dakika sonra, hayvanlarda epileptiform değişiklikler başladı.

Penisilin'le oluşturulan bu nöbetlerde; önce kafada, sonra tüm vücutta titreme hareketi, ön ve arka ekstremitelerde ve daha sonra tüm vücutta tonik-klonik kasılmalar, ayakta duramama ve dengesizlik, sık ağız hareketleri, kuyruk dikleşmesi ve kuyruğun dairesel hareketler yapması ve hayvanın ekstremiteleri ile beraber tamamen yerden sıçraması hareketleri gözlemlendi. Nöbetler ortalama 3-10 saniye aralıklarla tekrarlandı ve literatürde rapor edilen nöbet şekillerine (61) benzer özellikteydi.

Deney grubu hayvanların kafa derisi üzerine konulan iki adet gümüş plaka aracılığıyla, elektriksel deşarjlar EEG aletinde kaydedildi ve epileptik aktiviteler tespit edildi (Şekil-4.I,II). Kayıtlar, Sensitivite = 20 mikrovolt / mm., KH (Kağıt hızı) = 15 mm./ sn., TC = 0.3, HF = 70 Hz., referans (toprak) : kuyruk, olarak alınmıştır.

B- Kontrol grubu sıçanlarda korteks içine verilen Serum Fizyolojik'in etkileri:

Kontrol grubu hayvanlara, aynı miktar (0.1 cc.) Serum Fizyolojik (%0.9 NaCl) sağ korteks içine verildi. Hayvanlarda uygulama sonrası herhangi bir davranış değişikliği gözlenmedi.

Kontrol grubu hayvanların kafa derisi üzerine konulan iki adet gümüş plaka aracılığıyla, elektriksel deşarjlar EEG aletinde kaydedildi (Şekil-5). Kayıtlar, Sensitivite =

20 mikrovolt / mm., KH (Kağıt hızı) = 15 mm./ sn., TC = 0.3, HF = 70 Hz., referans (toprak) : kuyruk, olarak alınmıştır.

4.2. Operasyon sonrası genel gözlemler

A- Deney grubu sıçanlar:

Intrakortikal Penisilin uygulanan sıçanlar 1 saat sonra kafese kondu. Hayvanlar numaralandı, yem ve su verildi. Daha sonra, hayvanlar gözleme alındı ve davranış değişiklikleri laboratuvar defterine kaydedildi. Buna göre:

1. Gün: Hiperaktivite, sık kaşınma hareketi, çevreye karşı ilgi pozitif.
3. Gün: Hiperaktivite, yem ve su alıyor.
7. Gün: Hiperaktivite, yem ve su alıyor.

B- Kontrol grubu sıçanlar:

Intrakortikal Serum Fizyolojik uygulanan sıçanlar kafese kondu, numaralandı, yem ve su verildi. Hayvanlar operasyon sonrası 1-3-7. günlerde gözlendi. Kontrol grubu sıçanların hareketlerinde normal dışı bir değişiklik gözlenmedi.

4.3. Optik parçalama ile toplam nöron sayısı hesaplamaları

A- Deney grubu:

Penisilin ile deneysel epilepsi oluşturulan deney grubu sıçanların sol hippocampus (CA1, CA2, CA3 alt bölgeleri) toplam nöron sayıları ve toplam nöron sayısı hesaplamalarında kullanılan parametreler Tablo-3'de gösterilmiştir.

B- Kontrol grubu:

Kontrol grubu (İntrakortikal Serum Fizyolojik verilen) sıçanların sol hippocampus (CA1, CA2, CA3 alt bölgeleri) toplam nöron sayıları ve toplam nöron sayısı hesaplamalarında kullanılan parametreler Tablo-4’de gösterilmiştir.



A-



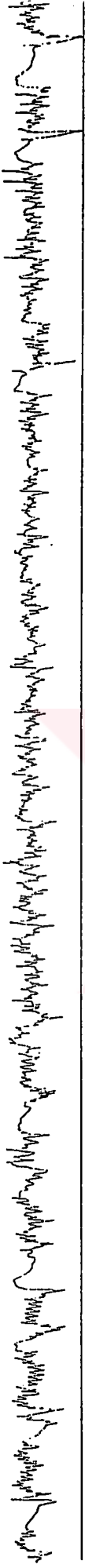
B-



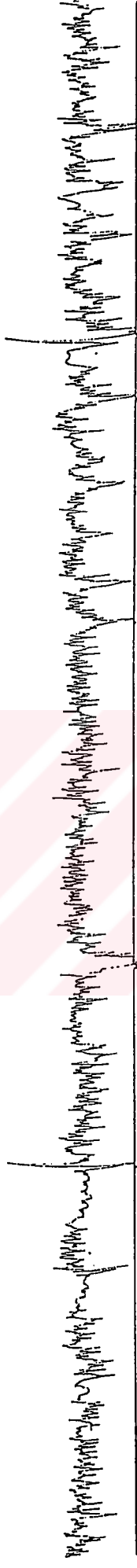
Şekil-4 : Sıçanda intrakortikal penisilin-G sonrası EEG kayıtları

I) İnteriktal dönem; A- İnteriktal epileptik deşarjlar, B- İnteriktal sık diken dalga epileptik deşajları.

C-



D-



Şekil-4 : Sıçanda intrakortikal penisilin-G sonrası EEG kayıtları.

II) İktal dönem: C- Tonik faz, D- Klonik faz.



Şekil-5 : Sıçanda intrakortikal Serum Fizyolojik sonrası EEG kayıtları.

Tablo-3 : Penisilin ile deneysel epilepsi oluşturulan deney sıçanların sol hippocampus (CA1, CA2, CA3 alt bölgeleri) toplam nöron sayıları ve toplam nöron sayısı hesaplamalarında kullanılan parametreler.

	Deney 1	Deney 2	Deney 3	Deney 4	Deney 5	Deney 6
Q ⁻ (disektör sayısı)	128	140	125	117	111	132
1 / KeÖÖ	4	2	4	4	4	3
1 / AÖÖ	144	225	144	144	144	144
1 / KaÖÖ	1.78	2.07	2.14	2.34	2.30	2.40
Ort. Kesit kalınlığı(mikron)	53.60	62.20	64.40	70.40	69.00	72.00
Disektör yüksekliği(mikron)	30	30	30	30	30	30
Tarafsız sayım çer. alanı(mikron ²)	625	400	625	625	625	625
N (toplam)	131 235	130 410	154 080	157 697	147 052	136 857

Tablo-4 : Kontrol grubu (İntrakortikal Serum Fizyolojik verilen) sıçanların sol hippocampus (CA1, CA2, CA3 alt bölgeleri) toplam nöron sayıları ve toplam nöron sayısı hesaplamalarında kullanılan parametreler.

	Kontrol 1	Kontrol 2	Kontrol 3	Kontrol 4	Kontrol 5	Kontrol 6
Q ⁻ (disektör sayısı)	179	144	151	147	138	134
1 / KeÖÖ	2	4	4	4	4	4
1 / AÖÖ	225	144	144	144	144	144
1 / KaÖÖ	2.05	2.01	2.07	2.30	2.29	2.32
Ort. Kesit kalınlığı(mikron)	61.78	60.40	62.20	69.00	68.80	69.60
Disektör yüksekliği(mikron)	30	30	30	30	30	30
Tarafsız sayım çer. alanı(mikron ²)	400	625	625	625	625	625
N(toplam)	165 127	166 717	180 040	194 745	182 027	179 066

Tablo-5 : Deney grubu sıçanlarda (6 adet) optik parçalama yöntemi ile hesaplanan sol hippocampus toplam nöron sayıları.

Hayvan	Toplam nöron sayısı
Deney-1	131 235
Deney-2	130 410
Deney-3	154 080
Deney-4	157 697
Deney-5	147 052
Deney-6	136 857
Ortalama	142 888

Tablo-6 : Kontrol grubu sıçanlarda (6 adet) optik parçalama yöntemi ile hesaplanan sol hippocampus toplam nöron sayıları.

Hayvan	Toplam nöron sayısı
Kontrol-1	165 127
Kontrol -2	166 717
Kontrol -3	180 040
Kontrol -4	194 745
Kontrol -5	182 027
Kontrol -6	179 066
Ortalama	177 953

Tablo-7 : Kontrol ve Deney grubu sıçanlara ait sol hippocampus'daki toplam ortalama nöron sayıları.

N	Kontrol grubu	N	Deney grubu	% Farklılık
6	177 953 ± 10 907	6	142 888 ± 11 745	19.71*

N : Çalışmada kullanılan sıçan sayısı

* : $p < 0.05$ (Ortalama değerler standart hata ile birlikte verilmiştir).

Tablo-8 : Deney-1 Numaralı sıçan için sol hippocampus toplam nöron sayısının bulunması sırasında gözlenen Hata Katsayısı (HK) hesaplanması (38) ($HK = \% 10$ 'un altında bir değerde ise çalışma güvenilirdir ve çalışmanın örnekleme planı yeterlidir) (12,13,42).

Kesit	Q_i	$Q_i \times Q_i$	$Q_i \times (Q_i + 1)$	$Q_i \times (Q_i + 2)$
1	18	324	288	324
2	16	256	288	80
3	18	324	90	162
4	5	25	45	40
5	9	81	72	108
6	8	64	96	104
7	12	144	156	204
8	13	169	221	156
9	17	289	204	-
10	12	144	-	-
Toplam	128	A = 1820	B = 1460	C = 1178

Q_i : Disektör partikül sayısı, $Q_i + 1$: Bir sonraki kesitte sayılan disektör partikül sayısı.

$$HK = \sqrt{[(3A + C - 4B) / 12]} / \sum Q_i = 0.063$$

Tablo-9 : Deney grubu sıçanlarda sol hippocampus toplam nöron sayısının bulunması sırasında hesaplanan Hata Katsayısı (HK) değerleri.

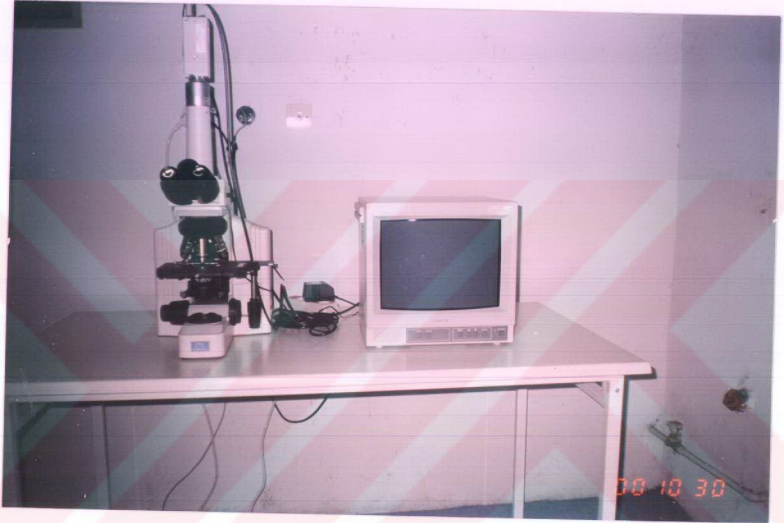
Sıçan No	Hata Katsayısı (HK)
Deney-1	0.063
Deney-2	0.058
Deney-3	0.047
Deney-4	0.046
Deney-5	0.067
Deney-6	0.050

Tablo-10 : Kontrol grubu sıçanlarda sol hippocampus toplam nöron sayısının bulunması sırasında hesaplanan Hata Katsayısı (HK) değerleri.

Sıçan No	Hata Katsayısı (HK)
Kontrol-1	0.054
Kontrol-2	0.056
Kontrol-3	0.098
Kontrol-4	0.051
Kontrol-5	0.047
Kontrol-6	0.052



Resim-4 : Çalışmamızda kullanılan Cryostat aleti (Leica CM3050).



Resim-5 : Optik parçalama metodu ile hücre (nöron) sayımı yapılan sistemin genel görüntüsü (Mikroskop, video kamera ve monitör).

TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında, penisilin-G'nin intrakortikal olarak verilmesi ile deneysel epilepsi modeli oluşturulan deney grubu sıçanların hippocampus CA1, CA2 ve CA3 alt bölgelerinin, stratum pyramidale tabakasındaki toplam piramidal nöron sayısı, stereolojik bir yöntem olan optik parçalama metodu ile hesaplanmıştır (Tablo-3) (Ortalama = $142\ 888 \pm 11\ 745.40$, minimum = $130\ 410$, maksimum = $157\ 697$) (Tablo-5). Kontrol grubu sıçanlara ise; intrakortikal yolla aynı miktar Serum Fizyolojik verilmiş ve optik parçalama ile aynı bölgede nöron sayısı hesaplanmıştır (Tablo-4) (Ortalama = $177\ 953 \pm 10\ 907.95$, minimum = $165\ 127$, maksimum = $194\ 745$) (Tablo-6). Ortaya çıkan sonuçlara göre; deney grubu sıçanların hippocampus CA1, CA2 ve CA3 alt bölgelerindeki piramidal nöron sayısı, kontrol grubu sıçanlara göre istatistiksel olarak düşük bulunmuştur (Mann-Whitney U testi, $p < 0.05$, Tablo-7).

Beypinde yer alan yapılardan hippocampus, uyarılara karşı son derece düşük eşik şiddetine sahiptir. Hippocampus'un bir noktasına verilen uyarı aynı anda tüm hippocampus alt bölgelerine yayılır. Böylece, zayıf bir stimülasyon epileptiform aktiviteye neden olur. Epileptik nöbet uyarı bittikten sonra da devam eder (10,21,39). Bu hipereksitebilitenin nedeninin, diğer korteks yapıları altı tabakalı olmasına karşılık, hippocampus'un üç tabakalı histolojik yapısına bağlı olabileceği belirtilmektedir (39).

Hippocampus'un hipereksitebilitesi sonucu epileptik nöbetlerde kolaylıkla uyarılabilmesi irreversibl hipokampal nöron kaybına, özellikle CA1 ve CA3 alt bölgelerinde piramidal nöron kaybına ve hipokampal skleroza neden olmaktadır (17,28,39,65).

Hippocampus'un CA3 alt bölgesinin piramidal hücrelerinde yüksek derecede eksitator kollateral bağlantılar mevcuttur. Bu bölgedeki bir uyarı aynı anda CA1 alt bölgesine (Schaffer kollateralleriyle) ve karşı taraftaki hippocampus CA1 ve CA3 alt

bölgelerine (hippocampus'un komissural lifleriyle) ulaştırılır (63). Hipokampal sklerozda en çok hasar hippocampus'un CA1 alt bölgesinde görülür. Bunun nedeni, hücre eksitasyonunu azaltıcı kontrol mekanizmalarının CA1 alt bölgesinde yetersiz olması ile açıklanabilmektedir. (63).

Hippocampus'un CA4 alt bölgesi polimorfik hücrelerden oluşan ve gyrus dentatus'un hilusuna uyan bölgedir (76). Hilusun dış sınırı, gyrus dentatus'un granül hücre tabakasının iç sınırı tarafından tanımlanır. İç kenarın orta noktası, CA3 bölgesinin piramidal hücre tabakasının medial sonlanması tarafından belirlenir (75). Hippocampus'un CA1, CA2, CA3 alt bölgeleri esas olarak piramidal hücrelerden oluşurken (56,75), CA4 alt bölgesi polimorfik hücreler içerir (76). CA4 alt bölgesi hem anatomik hem de histolojik olarak diğer alt bölgelerden (CA1, CA2, CA3) farklıdır. Bu farklılıktan dolayı, CA4 alt bölgesi Boss ve arkadaşlarının nöron sayımı yapılan çalışmasında sayım dışı bırakılmıştır (9). West ve arkadaşlarının stereolojik metot kullanılarak yaptıkları çalışmada CA4 alt bölgesi sayımda CA1 ve CA3 alt bölgelerinden ayrı olarak değerlendirilmiştir. Çalışmamızda, literatürde üst bölge (regio superior) ve alt bölge (regio inferior) olarak tanımlanan CA1 ve CA3 alt bölgeleri ile bu iki bölge arasında kalan ve geçiş bölgesi olarak tanımlanan CA2 alt bölgesi sayıma dahil edilmiş, anatomik ve histolojik farklılığı olan CA4 alt bölgesinde sayım yapılmamıştır.

Epilepsi fizyolojisi ve patolojisinin anlaşılması için deneysel epilepsi modelleri geliştirilmiştir (8,49,60). Bu amaçla, hem elektriksel uyaranlar, hem de çeşitli kimyasal uyaranlar kullanılabilir. Kimyasal uyaranlardan çinko sülfatın intrakortikal uygulanmasıyla, tavşan ve sıçan hippocampus'unda piramidal hücre yoğunluğunu azalttığı bildirilmektedir (19,20,31,50). Bir glutamat agonisti olan kainik asit, sıçanlarda beyin ventriküllerine verildiğinde hippocampus'un CA3 ve CA4 bölgelerinde, ilk nöbetten 24 saat sonra gözlenebilen, nöron kaybı oluşturmaktadır (45,48,49). Pia mater üzerine uygulanan alüminyum; nöron kaybı, dendrit yapısında değişiklik ve glial hücre artışına neden olmaktadır (30).

Bizim çalışmamızda, kimyasal konvülsanlardan penisilin-G kullanılması tercih

edilmiştir. Epileptik nöbet oluşturuucu etkisi 1945 yılında tespit edilen penisilin ile deneysel epilepsi modeli oluşturulabilmektedir (30,49). Nonspesifik bir GABA antagonisti olan penisilin'in (25), intrakortikal uygulandığında, epileptojenik bir odak oluşturduğu ve epileptiform aktivitenin fokal başlayıp yayılarak jeneralize olması şekliyle, klinikteki Grand mal epilepsiye benzer bir tablo oluşturduğu bildirilmektedir (22,61). Penisilin modeli, diğer modellere göre hem maliyetinin düşük olması, hem de tek bir intrakortikal injeksiyon ile gerçekleştirilebilmesi nedeniyle avantajlı bir modeldir. Ancak, penisilin ile oluşturulan deneysel epilepsi modelinde, hippocampus'taki nöron sayısı değişiklikleri konusunda çalışma yapılmamıştır. Bu amaçla çalışmamızda, Sprague – Dawley cinsi sıçanlara intrakortikal 500 IU penisilin-G verilerek deneysel epilepsi oluşturulmuş ve hippocampus nöron sayısı değişiklikleri araştırılmıştır. Sıçanlarda intrakortikal 300-500 IU penisilin-G uygulanması epileptik aktivite meydana getirmiştir (5,23,49). Benzer şekilde, tavşanda intrakortikal 300 IU sodyum (Na) penisilin - G verilerek epilepsi oluşturulmuştur (51). Albino farelerde intrakortikal 100 IU kristalize penisilinle epileptik aktivite elde edilmiştir (68). Ayrıca, kedilerde kortekse uygulanan kristalize penisilinle aynı sonuca ulaşılmıştır (49). 1.7 - 3.4 mM penisilin ıslatılarak emdirilmiş pamuk parçası, sıçan, tavşan veya kedi beyin korteksine (pia mater yüzeyine) konulursa, bir kaç dakika sonra interiktal diken (spike) dalgaları (deşarjları) EEG'de kaydedilir. Bu değişiklikler insan korteksindeki elektrokortikografiden elde edilen interiktal diken dalgalarına benzerdir (30). Bizim çalışmamızda da, sıçandan alınan EEG'de interiktal epileptikdeşarjlar kaydedilmiştir (Şekil-4.I.A).

Horn, sıçanlarda motor ve visual korteks içine penisilin-G uygulandığında, epileptik aktivitelerin başlangıç periyodunun, uygulanan penisilin dozundan (16 IU – 1 000 000 IU) bağımsız olduğunu göstermiştir (41). Epileptiform aktivitelerin latent süreleri ise hem penisilin dozundan, hem de intrakortikal injeksiyon yerinden bağımsızdır. Çalışmamızda bu yüzden, literatürde yer alan 500 IU penisilin-G dozu kullanılmıştır. Ancak, deneysel epilepsi modelinde, penisilin-G doz değişikliklerinin nöron sayısına etkisi araştırma konusu yapılabilir. Ayrıca, penisilin-G ile oluşturulan epilepsi modelinde sayısı azalan nöronların, spesifik olarak GABAerjik nöronlar olup olmadığı

immünohistokimyasal boyama yapılarak, optik parçalama yöntemi ile araştırılabilir.

Mouritzen – Dam’ın elektriksel uyaran verilerek deneysel epilepsi oluşturduğu sıçanların hippocampus nöron sayılarında bir azalma bildirilmektedir (16). Bu çalışmada her kesitte $150 \mu\text{m}^2$ ’lik bir alanda hücre (piramidal nöron) sayımı yapılmış ve $1.05 \times 10^{-6} \text{mm}^3$ ’deki hücre yoğunluğu belirlenmiştir. Mouritzen - Dam, yine aynı çalışmada insan epilepsi hastalarında aynı yöntemle yaptığı hesaplamada hippocampus piramidal nöron sayılarının azaldığını rapor etmiştir. Bizim çalışmamızın sonuçları, Mouritzen - Dam’ın sonuçları ile uyumludur. Ancak, çalışmamızda kullandığımız stereolojik metotlardan optik parçalama daha güvenilir sonuçlar vermektedir. Sayısal yoğunluk verisi doku büzüşmesi veya doku şişmesinden etkilenebilirken, çalışmamızda kullanılan yöntem bu tür değişikliklerden etkilenmemektedir (54,75).

Boss ve arkadaşları 1987’de yaptıkları çalışmada, Sprague - Dawley ve Wistar cinsi sıçanlarda hippocampus CA1 ve CA3 alt bölgelerinde nöron sayımı yapmışlardır (9). “Bioquant görüntü analiz sistemi” ile yaptıkları sayımlarda, belirli bir hacimde hücre yoğunluğunu bulmuşlardır. Bu yöntem için Abercrombie düzeltme faktörü kullanılmıştır. Buna göre, 1 Aylık Sprague - Dawley cinsi sıçanlar için, hesaplanan nöron sayısı ortalama = 750 000’dir. Ancak, Boss’un kullandığı metot, Stereolojik olmayan bir metottur. Bundan başka, Babb ve arkadaşlarının temporal lob epilepsili (kompleks parsiyel epilepsili) insanlarda temporal lobun 13 farklı alt bölgesinde hacimsel (volumetrik), hücre yoğunluğunu bildiren çalışması vardır (4). Bu çalışmada mm^3 ’deki hücre yoğunluğu hesap edilmiştir. Düzeltme faktörü olarak Abercrombie formülü kullanılmıştır.

Nöron sayısının tespitinde, Mouritzen – Dam (16), Boss ve arkadaşları (9), Babb ve arkadaşlarının (4) kullandığı, belirli bir hacimdeki sayısal yoğunluk (N_v) yeterli bir parametre değildir. Hippocampus’taki toplam nöron sayısı (N_{toplam}), hippocampus’taki sayısal yoğunluktan (N_v) daha geçerli bir parametredir (70). Hippocampus hacmi değiştiğinde, $N_{\text{toplam}} = (N_v) \times (V_{\text{ref}})$ formülüne göre toplam hücre sayısında değişiklik

olur (14,36). Yani, Nv ile yapılan hesaplamalar, hacim değişikliklerinden, histolojik işlemlerden (fiksasyon, takip, gömme, kesit alma, boyama vb.) dolayı dokuda oluşabilecek büzüşme veya şişmeden etkilenebilir. Ancak, optik parçalama yöntemi böyle bir olumsuzluk taşımamaktadır. Optik parçalamada hesaplamalar, sayımın yapıldığı yerin (CA1,CA2,CA3 alt bölgelerinin stratum pyramidale tabakasının örneklenen bölümü), bütün yapının ne kadarlık bir oranına karşılık geldiğinin bilinmesi esasına göre yapılır. Bizim çalışmamızda, karşılık gelen oranlar gözönüne alınarak, tarafsız ve etkin olan bu yöntemle kantitatif (sayısal) bir sonuca ulaşılmıştır. Ayrıca, direk olarak toplam nöron sayısına ulaşılmış, hippocampus hacminin bilinmesine ihtiyaç kalmamıştır.

Stereolojik metotların ortaya çıkması ile sinir bilimleri, patoloji, fizyoloji, anatomi ve histoloji gibi Tıp bilim dallarında yaygın olarak kullanılmaya başlanmasından sonra, bu yöntemlerle bir çok çalışma yapılmıştır. West ve Gundersen 1990'da, çeşitli nedenlerle ölen insanların hippocampus'undaki toplam nöron sayısını tarafsız stereolojik yöntemlerle hesaplamışlardır (73). West, hippocampus'taki stereolojik çalışmalarla, hipokampal alt bölgelerin nöron sayılarını kirpi, kobay (laboratuar kemirgeni), vahşi fare ve insanda karşılaştırmalı olarak vermiştir (71).

Stereolojik metotların kullanılmadığı çalışmalarda çeşitli hata kaynakları ile karşılaşılır. Hata kaynaklarından kaçınabilmek amacıyla çalışmamızda stereolojik bir yöntem kullanılmıştır. Karşılaşılan başlıca hata kaynakları şunlardır :

1- Üç boyutlu yapılardan elde edilen iki boyutlu kesit düzlemlerinde ortaya çıkan "Boyut azalması" prensibinin farkedilememesi,

2- Kesit düzlemlerinde doğrudan incelenemeyen derinlik boyutunun görmezden gelinmesi veya bu eksik bilginin bir takım düzeltme faktörleriyle telafi edilmeye çalışılması (Abercrombie düzeltme faktörü vb.),

3- Üç boyutlu partiküller ile bunların kesilmesiyle elde edilen iki boyutlu izdüşümler arasında matematiksel ilişki kurma çabaları (13).

Hata kaynakları gözardı edilirse, çalışma sonuçları gerçek değerden sistematik biçimde sapma gösterebilir. Stereolojik olmayan metotlarla yapılan çalışmalar, iki boyutlu kesitlerden elde edilen sonuçları, üçüncü boyutu ihmal ederek, gerçek değer gibi sunmaktadır (37).

Bizim çalışmamızda, hücre (partikül) sayımı optik disektör sayım kurallarına göre yapılmıştır. Optik disektör’de sayımlar, iki boyut yerine üç boyutlu optik görüntülerde yapılmaktadır. Böylece, hata kaynaklarından “boyut azalması” prensibinin farkedilememesi sorunu ortadan kalkmaktadır.

Mouritzen - Dam’ın yaptığı çalışmada, iki boyutlu düzlemlerde sayım yapılmıştır (16). Oysa, bizim çalışmamızda kullanılan optik disektör, kesitin içinde optik düzlemler boyunca ilerlenmesini sağlar. Böylece, derinlik yani üçüncü boyut sağlanmış olur. Boss ve arkadaşlarının (9), Mouritzen - Dam’ın (16) ve Babb ve arkadaşlarının (4) yaptığı çalışmalarda, Abercrombie düzeltme faktörü kullanılmış ve bu şekilde üçüncü boyut sağlanmaya çalışılmıştır. Ancak, bu yöntemle çoğu zaman objektif sonuçlara ulaşmak mümkün olamaz. Çünkü, iki boyutlu kesitlerdeki izdüşümlerinden sağlanan sonuçları üç boyutlu partiküllerden elde edilmiş gibi matematiksel olarak kullanmak doğru bir yaklaşım değildir. Optik parçalama yönteminde, üçüncü boyut sağlandığı için hesaplamalarda ayrıca düzeltme faktörü kullanılmasına gerek yoktur. Düzeltme faktörü kullanılmayan stereolojik metotlarla yapılan çalışmalar daha güvenilir sonuçlara ulaşılmasını sağlar. Bizim çalışmamızda da düzeltme faktörü kullanılmasına gerek kalmamıştır.

Stereolojik olmayan metotlarla yapılan çalışmalar tekrar edildiğinde, önceki değerlerden çok farklı, objektif olmayan sonuçlara ulaşılabilir. Çalışmamızda uyguladığımız stereolojik metotlardan optik parçalama, objektif (tekrar edildiğinde yakın sonuçlara ulaşan) bir metottur ve kantitatif (sayısal) sonuçları gerçek değere çok yakın bir kesinlikte verir (35,55,74,75).

Günümüzde çok çeşitli stereolojik metotlar kullanılmaktadır (fiziksel disektör, optik disektör, selector vb.). Çalışmamızda kullanılan optik parçalamanın disektöre göre bir çok üstünlüğü vardır. West ve arkadaşları 1988'de sıçanların gyrus dentatus granül hücre hesaplamalarını disektör yöntemiyle, fotoğraflar üzerinde yapmışlardır (72). Ancak, bu çalışmada kullanılan fiziksel disektörde çok sayıda görüntü veya fotoğrafa ihtiyaç olduğu için, fazla zaman ve enerji harcanması gerekir. Buna karşılık, çalışmamızda kullanılan optik parçalama zaman ve enerji kaybettirmeden sonuca ulaşabilen bir yöntemdir (70).

Optik parçalama yöntemi; her laboratuarda bulunabilen mikroskop ve monitörden başka sadece asetata ihtiyacı olan ve kolay uygulanabilen bir yöntemdir. Boss ve arkadaşları yaptıkları çalışmada "Bioquant görüntü analiz sistemi"ni kullanmışlardır (9). Oysa çalışmamızda sayımlar, pahalı görüntü analiz sistemleri yerine, mikroskop ve monitörden oluşan basit bir sistemde yapılmıştır (Resim-5).

Ayrıca, sinir sistemindeki yapılarda, nöron sayımı için, tarafsız ve etkin kullanımıyla en uygun yöntem optik parçalama. Bu metotta, sadece nöron sayımı yapılacak bölgenin nöroanatomik sınırlarının belirlenmesi yeterlidir (13,70,75). Bundan sonra sayımlar kolaylıkla yapılabilir.

Optik parçalama; histolojik işlemlerden dolayı oluşabilecek büzüşme veya şişme gibi etkilerden bağımsız olarak toplam nöron sayısını bulabilen bir yöntemdir (13,36,55,70,75). Bu çalışmamızda, Cryostat aletinde 150 µm kalınlığında kesitler alınmıştır. Hematoxylen-eosin ile boyama işleminden sonra oluşan büzüşme ile kesitlerin ortalama 60-70 µm kalınlığa düştüğü tespit edilmiştir. Ancak, optik parçalama dokuda oluşan büzüşmelerden etkilenmeksizin, toplam nöron sayısına ulaşmamızı sağladığı için, bu büzüşme sonuçlarımız üzerinde etkili olmamıştır.

Çalışmamızda nöron sayımları, sistematik rastgele örnekleme stratejisine göre belirlenen kesitlerde ve örneklenen alanlarda yapılmıştır. Oysa, Mouritzen - Dam'ın (16)

ve Boss ve arkadaşlarının (9) yaptığı çalışmalarda bütün kesitlerde hücre (partikül) sayımı yapılmıştır. Bu durumda, bir kesitte yer alan hücre, kesit kalınlığına bağlı olarak ardışık kesitte de yer alabilir ve tekrar tekrar sayıma dahil edilebilir. "Overprojection" adı verilen bu durum, iki boyutlu sayımlarda, sayım sonuçlarının gerçek değerden fazla çıkmasına (over estimation) neden olan olumsuz bir durumdur. Çalışmamızda, sayılan bir hücrenin (partikülün) tekrar sayılması önlenerek, sonuçların gerçek değerden fazla çıkması engellenmiştir.

Çalışmamızda histolojik kesitlerden bir nöronun (partikülün) bütün olarak ayrılması yada kesilmesi anlamına gelen "lost caps" etkisinden (13,75) etkilenmeksizin hücre (nöron) sayımı yapılması sağlanmıştır. Preparatlarda, kesit üst veya alt yüzeyi belirlendikten sonra, 10 μm 'lik güvenlik kuşağı bırakılmış ve kesit içinde optik olarak ilerlenmiştir. Daha sonra, hücre (nöron) sayımı 30 μm 'lik optik disektör yüksekliğinde yapılmıştır. Kesitin disektör yüksekliği geçildikten sonraki bölümünde de hücre (nöron) sayımı yapılmamıştır. Alt ve üst güvenlik kuşaklarının bırakılmasıyla bu bölgelerde kesilen veya ayrılan nöronların sayıma dahil edilmemesi sağlanmıştır. Boss ve arkadaşları (9) yaptıkları çalışmada, güvenlik kuşağı kullanmamışlardır. Bu durumda, bir hücre yarıdan kesildiğinde, birbirini takip eden ardışık kesitlerde sayıma dahil edilebilmekte ve böylece sonuçların hatalı olmasına neden olmaktadır. Bizim çalışmamızda güvenlik kuşağı bırakılarak "lost caps" etkisi giderilmiştir.

Araştırmamızda "fazla sayım" etkisini (over estimation) ortadan kaldırmak için, West ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada (75) yararlandıkları "Gundersen'in tarafsız sayım çerçevesi" kullanılmıştır. Asetata çizilen tarafsız sayım çerçevesi, monitör görüntüsü üzerine yerleştirilmiş ve sayımlar bu çerçeve içinde, kurallara uygun olarak yapılmıştır. Mouritzen - Dam (16), Dam (17) , Babb ve arkadaşları (4) çalışmalarında, sayımları mikroskop görüntüsünün tamamında yapmışlardır. Ancak sayımlar, belli sınırları olan bir çerçevede yapılmadığında sonuçlar hatalı çıkabilmektedir (13). Çalışmamızda, tarafsız sayım çerçevesi kullanılarak "fazla sayım" etkisinden doğan sayım hataları giderilmiştir.

Literatürde, optik parçalama metodu kullanılarak yapılan nöron sayımı çalışmaları mevcuttur. West ve arkadaşları, optik parçalama metodu ile normal sıçan hippocampus'unun alt bölgelerindeki toplam nöron sayısını hesaplamıştır (75). Bir aylık Wistar cinsi sıçanlarda hippocampus nöron sayısı ortalama = 632 000 olarak bulunmuştur. West ve arkadaşlarının çalışmalarında kullandığı sıçanlar genç iken (1 aylık), bizim çalışmamızda kullandığımız sıçanlar daha yaşlıydı. Hücre sayım çalışmalarında, deney hayvanlarının yaşlarının standardize edilmesi önemlidir. Ancak, çeşitli yaş grupları arasında karşılaştırmalı hücre sayım çalışmaları yapılabilir. Ayrıca, West ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada (75) kullanılan sıçan cinsi Wistar'dır. Bizim çalışmamızda ise Sprague-Dawley cinsi sıçanlar kullanılmıştır. Bu durum, sonuçların farklı çıkmasında etkili olabilir.

Bundan başka, Gökçe yaptığı tez çalışmasında (33), optik parçalama metoduyla, 7 ve 15 günlük kontrol grubu sıçanların sol hippocampus toplam piramidal nöron sayılarını optik parçalama ile hesaplamıştır. Tezdeki ortalama değerler (7 günlük sıçanlarda ortalama = 186 700 ve 15 günlük sıçanlarda ortalama = 171 960) bizim çalışmamızdaki kontrol grubu ortalama değerleri ile çok yakın sonuçlar vermektedir. Ancak, bu tür çalışmalarda yaş, cinsiyet, laboratuvar şartları ve hayvan ırklarının standardize edilmesi gerektiği dikkatten uzak tutulmamalıdır.

Özetle; penisilin-G ile oluşturulan deneysel epilepside, diğer deneysel epilepsi modellerinde gözlendiği gibi hippocampus nöron sayılarında bir azalma bulunmuştur. Bu farklılığın tespit edilmesinde kullanılan optik parçalama metodu kolay uygulanabilir ve etkin bir yöntem olması nedeniyle, beynin değişik bölgelerindeki nöron sayımlarında tercih edilebilir.

SONUÇ

Bu çalışmada, sıçanlarda Penisilin-G ile oluşturulan deneysel epilepsi modelinde, hippocampus'daki nöron sayısı değişiklikleri araştırılmıştır.

Oluşturulan deneysel epilepsi modelinde nöron sayıları, objektif ve kesin sonuçlar veren stereolojik metotlardan, optik parçalama yöntemiyle yapılmıştır. Çalışmamızda elde edilen bulgular sonucunda şunlar söylenebilir;

- 1- Optik parçalama yöntemi ile hesaplandığında, Penisilin-G ile oluşturulan deneysel epileptik sıçanların hippocampus CA1, CA2 ve CA3 alt bölgelerindeki piramidal nöron sayıları, kontrol grubundaki sıçanların nöron sayılarından istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur ($p<0.05$).
- 2- Optik parçalama metodu; normal veya patolojik dokularda nöron sayılarının değerlendirilmesinde etkin olarak kullanılabilen objektif bir yöntemdir.
- 3- Çalışmamızda bulduğumuz, penisilin epilepsi modelinde hippocampus nöron sayısındaki azalmanın, öğrenme ve hafıza fonksiyonları ile ilişkisini araştırmak için hayvanlara öğrenme ile ilgili davranışsal testler uygulanarak yeni çalışmalar yapılabilir.

KAYNAKLAR

1. AMARAL, D.G., WITTER, M.P.: The three-dimensional organization of the hippocampal formation: A review of anatomical data, *Neuroscience*, 31 (3), 571-591, (1989).
2. ARINCI, K., ELHAN,A.: *Anatomi*, 2. Baskı, Cilt 2, Güneş Kitabevi Ltd. Şti., Ankara, (1997).
3. ASLAN, H.: Bir ve yedi günlük civcivlerin Hippocampuslarında toplam nöron sayısının Optik Parçalama Metodu ile Hesaplanması, Uzmanlık Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi, Samsun, (1999).
4. BABB, T.L., BROWN, W.J., PRETORIUS, J., DAVENPORT, C., LIEB, J.P., et al.: Temporal lobe volumetric cell densities in temporal lobe epilepsy, *Epilepsia*, 25 (6), 729-740, (1984).
5. BAGIRICI, F., GOKCE, F.M., MARANGOZ, C.: Depressive effect of Nicardipine on Penicillin-induced Epileptiform activity in Rats, *Neuroscience Research Communications*, 24(3), 149-154, (1999).
6. BERKOW, R. (Ed.), FLETCHER, A.J.: *The Merck Manual of Diagnosis and Therapy*, Fifteenth Edition, Merck Sharp and Dohme Research Laboratories, (1987).
7. BERKOW, R. (Ed.), PEKUS, R.M. (Çev.): *The Merc Manual Teşhis Tedavi El Kitabı*, Ondördüncü Baskı, Cilt 2, Merk Yayıncılık, İstanbul, (1986).

8. BIZIERE, K., CHAMBON, J.P.: Modeles Animaux D'epilepsie et Crises Experimentales, Rev. Neurol. (Paris), 143 (5), 329-340, (1987).
9. BOSS, B.D., TURLEJSKI, K., STANFIELD, B.B., COWAN, W.M.: On the numbers of neurons in fields CA1 and CA3 of the hippocampus of Sprague-Dawley and Wistar rats, Brain Research, 406, 280-287, (1987).
10. BRODAL, A.: Neurological Anatomy, In Relation to Clinical Medicine, Second Edition, New York Oxford University Press, London, Toronto, (1969).
11. BURT, A.M.: Textbook of Neuroanatomy, W.B. Saunders Company, United States of America, (1993).
12. CANAN,S.: Geçici Serebral İskemi sonrası civciv Hippocampusunda meydana gelen nöron sayısı değişimlerinin Optik Fraksiyonlama yöntemi ile araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı, Samsun, (1998).
13. CANAN,S., ASLAN, H., ÜNAL, B., ŞAHİN,B., KAPLAN, S.: II. Stereolojik Metotlar ve Uygulamaları Kurs Kitapçığı,Notları,CD, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi, Samsun, (1999).
14. COGGESHALL, R.E., LEKAN, H.A.:Methods for determining numbers of cells and synapses: A case for more uniform standards of review, The Journal of Comparative Neurology, 364, 6-15, (1996).
15. COOLEY, R.K., VANDERWOLF,C.H.: Stereotaxic Surgery in the Rat: A Photographic Series, A.J. Kirby Co., London, Ontario, Canada, (1990).

16. DAM, A.M.: Hippocampal neuron loss in epilepsy and after experimental seizures, *Acta Neurol. Scandinav.*, 66, 601-642, (1982).
17. DAM, M., BOLWIG, T., HERTZ, M., BAJOREC, J., LOMAX, P., et al.: Does seizure activity produce purkinje cell loss ?, *Epilepsia*, 25 (6), 747-751, (1984).
18. DEMİR,Ş.: Beyinde Çinkonun Sebep olduğu hücre ölümüne Verapamil'in etkisi, Yüksek Lisans Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Samsun, (1994).
19. DEMİR, Ş., AYYILDIZ, M., GENÇ, O., MARANGOZ, C.: Sıçan hipokampusunda çinkonun sebep olduğu hücre ölümüne nikardipinin etkisi, *On Dokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Dergisi*, 15 (1), 44-48, (1998).
20. DEMİR, Ş., GENÇ, O., BAĞIRICI, F., AYYILDIZ, M., KORKMAZ, A. ve ark.: Sıçan hipokampusunda çinkonun sebep olduğu hücre ölümüne verapamilin etkisi, *On Dokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Dergisi*, 13 (1), 19-26, (1996).
21. DERE, F.: *Nöroanatomi, Fonksiyonel Nöroloji Atlası ve Ders Kitabı*, 3. Baskı, Cilt 3, Adana Nobel Tıp Kitabevi, Adana, (1999).
22. DICHTER, M.A., AYALA, G.F.: Cellular mechanisms of epilepsy: A status report, *Science*, 237, 157-164, (1987).
23. DOMANN, R., UHLIG, S., DORN, T., WITTE, O.W.: Participation of interneurons in penicillin-induced epileptic discharges, *Experimental Brain Research*, 83, 683-686, (1991).

24. DREIFUSS, F.E.: Classification of Epileptic Seizures, In Epilepsy: A Comprehensive Textbook, (PEDLEY,T.A. Ed.), 517-524, Lippincott Raven Publishers, Philadelphia, (1997).
25. ENGEL, J.: Seizures and Epilepsy, F.A. Davis Company, Philadelphia, (1989).
26. ENGEL, J., PEDLEY, T.A.:Introduction: What Is Epilepsy, (PEDLEY,T.A. Ed.), Lippincott Raven Publishers, Philadelphia, (1997).
27. EREN, N.: Epilepsi El Kitabı, Denizli Sağlık Müdürlüğü, Eğitim Şubesi, Denizli, (2000).
28. ESIRI, M.M., OPPENHEIMER, D.R.: Diagnostic Neuropathology, Blackwell Scientific Publications, Oxford, London, Edinburgh, Boston, Melbourne, (1989).
29. EŞKAZAN, E.:Epilepsilerde Tanı ve Tedavi, İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Komisyonu Yayın No: 8, İstanbul, (1998).
30. FISHER, R.S.: Animal Models of the Epilepsies, Brain Research Reviews, 14, 245-278, (1989).
31. GENÇ, H., AYYILDIZ, M., TAŞCI, N., MARANGOZ, C.: İnrakortikal çinko sülfatın tavşan hipokampusunda piramidal hücre yoğunluğuna etkisi, X. Gevher Nesibe Tıp Günleri Kongre Kitapçığı, Kayseri, (1992).
32. GILMAN, A.G.(Cons.Ed.), MOLINOFF, P.B., RUDDON, R.W. (Editors): The Pharmacological Basis of Therapeutics, Ninth Edition, Mc Graw Hill, New York, St. Louis, San Francisco, Auckland, Bogota, (1996).

33. GÖKÇE, M.F.: Beyinde çinkonun sebep olduğu hücre ölümüne Nitrik oksit sentaz inhibitörü aminoguanidin'in etkisi, Uzmanlık Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı, Samsun, (1999).
34. GREENE, E.C.: Anatomy of the Rat, Volume XXVII, American Philosophical Society, Hafner Publishing Company, New York, London, (1963).
35. GUNDERSEN, H.J.G.: Stereology of arbitrary particles, A review of unbiased number size estimators and the presentation of some new ones, in memory of William R. Thompson, Journal of Microscopy, 143, 3-45, (1986).
36. GUNDERSEN, H.J.G., BAGGER, P., BENDTSEN, T.F., EVANS, S.M., KORBO, L., et al.: The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis, review article, APMIS, 96, 857-881, (1988).
37. GUNDERSEN, H.J.G., BENDTSEN, T.F., KORBO, L., MARCUSSEN, N., MOLLER, A., et al.: Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis, review article, APMIS, 96, 379-394, (1988).
38. GUNDERSEN, H.J.G., JENSEN, E.B.: The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction, Journal of Microscopy, 147, 229- 263, (1987).
39. GUYTON, A.C.: Basic Neuroscience Anatomy and Physiology, Second Edition, W.B. Saunders Company, Philadelphia, London, Toronto, Montreal, Sydney, Tokyo, (1991).

40. HAUSER, W.A.: Incidence and Prevalence, In *Epilepsy: A Comprehensive Textbook*, (PEDLEY,T.A. Ed.), 47-55, Lippincott Raven Publishers, Philadelphia, (1997).
41. HORN, E., ESSELING, K., WEBER, R.: Protective sensitivity changes of the motor cortex due to epileptiform experience of the visual cortex, *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 44 (3), 709-715, (1993).
42. KAPLAN, S., CANAN, S., ŞAHİN B., ÜNAL, B.: I. Stereolojik metotlar ve uygulamaları kurs notları, Samsun, (1997).
43. KATZUNG, B.G.: *Basic and Clinical Pharmacology*, Seventh Edition, Appleton and Lange , Stamford, Connecticut, (1998).
44. KAYAALP, O.: *Tıbbi Farmakoloji*, 8. Baskı, 1. Cilt, Hacettepe Taş, Ankara, (1998).
45. KOH, S., STOREY,B.A., SANTOS, T.C., MIAN, A.Y., COLE, A.J.: Early -life seizures in rats increase susceptibility to seizure-induced brain injury in adulthood, *Neurology*, 53, 915-921, (1999).
46. LINDSAY, K.W., BONE, I., CALLENDER, R.: *Neurology and Neurosurgery Illustrated*, Third edition, Churchill Livingstone, Edinburgh, London, Philadelphia, (1997).
47. LOSHER, W., SCHMIDT, D.: Strategies in antiepileptic drug development: is rational drug design superior to random screening and structural variation?, *Epilepsy Res.*, 17, 95-134, (1994).

48. LOUIS, N.C.A., NIQUET, J., BEN-ARI, Y., REPRESA, A.: Cellular plasticity, In *Epilepsy: A Comprehensive Textbook*, (PEDLEY, T.A. Ed.), 387-395, Lippincott Raven Publishers, Philadelphia, (1997).
49. MARANGOZ, C.: Deneysel Epilepsi Modelleri, *Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Dergisi*, 14 (3), 147-186, (1997).
50. MARANGOZ, C., AĞAR, E., AYYILDIZ, M., TAŞÇI, N.: İntrakortikal çinko sülfattan sonra sıçan hipokampusunda piramidal hücrelerin azalması, *Doğa Tr. J. Of Medical Sciences*, 14 (1), 231-238, (1990).
51. MARANGOZ, C., AYYILDIZ, M., TAŞÇI, N., ŞAHİNOĞLU, H.: Tavşanda penisilinle oluşturulan Epilepsiye Ketaminin etkileri, *Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 2(1), 101-106, (1993).
52. MATHERN, G.W., BABB, T.L., ARMSTRONG, D.L.: Hippocampal sclerosis, In *Epilepsy: A Comprehensive Textbook*, (PEDLEY, T.A. Ed.), 133-154, Lippincott Raven Publishers, Philadelphia, (1997).
53. Nöroloji (Yazarı belirtilmemiş): 3. Baskı, Cilt 4, İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Ders Kitapları, İstanbul, (1983).
54. OORSCHOT, D.E.: Are you using neuronal densities, synaptic densities or neurochemical densities as your definitive data? There is a better way to go, *Progress in Neurobiology*, 44, 223-247, (1994).
55. PAKKENBERG, B., GUNDERSEN, H.J.G.: Total number of neurons and glial cells in human brain nuclei estimated by the disector and the fractionator, *Journal of Microscopy*, 150, 1-20, (1988).

56. PAXINOS, G.: The Rat Nervous System, Second Edition, Academic Press, San Diego, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto.
57. PAXINOS, G., WATSON, C: The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, Third Edition, Academic Press, San Diego, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto, (1986).
58. PEDLEY, T.A: Historical Perspectives, In Epilepsy: A Comprehensive Textbook, (PEDLEY, T.A. Ed.), 28-39, Lippincott Raven Publishers, Philadelphia, (1997).
59. PEDLEY, T.A., MELDRUM, B.S.: Recent Advances in Epilepsy, Number two, Churchill Livingstone, Edinburgh, London, Melbourne, New York, (1985).
60. PURPURA, D.P., PENRY, J.K., TOWER, D.B., WOODBURY, D.M., WALTER, R.D.: Experimental Models of Epilepsy, A Manual for the laboratory worker, Raven Press, New York, (1972).
61. SAGRATELLA, S., NIGLIO, T., CAROLIS, A.S.: An investigation on the mechanism of anticonvulsant action of ketamine and phencyclidine on convulsions due to cortical application of penicillin in rabbits, Pharmacological Research Communications, 17 (8), 773-786, (1985).
62. SAUNDERS, B.D., TRAPP, R.G.: Basic and Clinical Biostatistics, Prentice-Hall International Inc., U.S.A., (1990).
63. SCHWARTZKROIN, P.A., MCINTYRE, D.C.: Limbic Anatomy and Physiology, In Epilepsy: A Comprehensive Textbook, (PEDLEY, T.A. Ed.), 323-337, Lippincott Raven Publishers, Philadelphia, (1997).

64. SCHWARTZKROIN, P.A., MODY, I.: Acute Seizures Models (Intact Animals), In *Epilepsy: A Comprehensive Textbook*, (PEDLEY, T.A. Ed.), 397-403, Lippincott Raven Publishers, Philadelphia, (1997).
65. SLOVITER, R.S.: Decreased hippocampal inhibition and a selective loss of interneurons in experimental epilepsy, *Science*, 235, 73-76, (1987).
66. SNELL, R.S.: *Neuroanatomy, A Review with questions and Explanations*, Little, Brown and Company, Boston, Toronto, London, (1995).
67. STERIO, D.C.: The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector, *Journal of Microscopy*, 134, 127-136, (1984).
68. ŞİMŞEK, F.Ç.: Deneysel Konvülsif nöbetlere Ketaminin etkisi, Yüksek Lisans Tezi, Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmakoloji Anabilim Dalı, Edirne, (1995).
69. WEST, M.J.: How to Count, *Neurobiology of Aging*, 17 (4), 503, (1996).
70. WEST, M.J.: New stereological methods for counting neurons, *Neurobiology of Aging*, 14, 275-285, (1993).
71. WEST, M.J.: Stereological studies of the hippocampus: a comparison of the hippocampal subdivisions of diverse species including hedgehogs, laboratory rodents, wild mice and men, *Progress in Brain Research*, 83, 13-36, (1990).
72. WEST, M.J., COLEMAN, P.D., FLOOD, D.G.: Estimating the number of granule cells in the dentate gyrus with the disector, *Brain Research*, 448, 167-172, (1988).

73. WEST, M.J., GUNDERSEN, H.J.G.: Unbiased stereological estimation of the number of neurons in the human hippocampus, *The Journal of Comparative Neurology*, 296, 1-22, (1990).
74. WEST, M.J., OSTERGAARD, K., ANDREASSEN, O.A., FINSEN, B.: Estimation of the number of somatostatin neurons in the striatum: An in situ hybridization study using the optical fractionator method, *The Journal of Comparative Neurology*, 370, 11-22, (1996).
75. WEST, M.J., SLOMIANKA, L., GUNDERSEN, H.J.G.: Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator, *The Anatomical Record*, 231, 482-487, (1991).
76. WILLIAMS, P.L. (Ed.): *Gray's Anatomy, Thirty eighth Edition*, Churchill Livingstone, New York, Edinburgh, London, Tokyo, Madrid, Melbourne, (1995).
77. WOLF, P.: International Classification of the Epilepsies, In *Epilepsy: A Comprehensive Textbook*, (PEDLEY, T.A. Ed.), 773-777, Lippincott Raven Publishers, Philadelphia, (1997).
78. YALTKAYA, K., BALKAN, S., OĞUZ, Y.: *Nöroloji Ders Kitabı*, Palme Yayıncılık, Ankara, (1998).
79. YÜCEL, F., WARREN, A.: *Workshop on Morphometry*, Osmangazi University, Eskişehir, (1999).

ÖZGEÇMİŞ

- 04.01.1970 Aydın'da doğdum.
- 1987 Aydın'da ilk ve orta öğretim tahsili.
- 1994 Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi'nden mezuniyet.
- 1994-1995 Denizli Buldan Göğüs Hastalıkları Hastanesi'nde hekim olarak Mecburi Hizmet görevi.
- 1995 Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi Anabilim Dalı'nda Araştırma Görevlisi olarak göreve başlama.
- 1995 (Ekim) Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi Anabilim Dalı'nda Doktora eğitimine başlama.
- 1-5 Eylül 1997 IV. Ulusal Anatomi Kongresi'ne katılım (İstanbul).
- 1998 Türkiye Beyin Araştırmaları ve Sinir Bilimleri Derneği'ne üyelik.
- 1999 Denizli Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi Anabilim Dalı'nda Araştırma Görevlisi olarak göreve başlama.
- 28-29 Mayıs 1999 Klinik Araştırmalar Sempozyumu'na katılım (Denizli).
- 25-27 Ağustos 1999 II. Stereolojik Metotlar ve Uygulamaları Kursu'na katılım (Samsun).
- 16-18 Eylül 1999 Bazı Etkin Morfometrik ve Stereolojik Metotlar ve Bunların Biyolojik Araştırmalardaki Kullanımı Workshop'una katılım (Eskişehir).
- 25-30 Ekim 1999 V. Ulusal Anatomi Kongresi'ne katılım (Antalya).
- 1999 Stereoloji Derneği'ne üyelik.