

**T.C.**  
**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**  
**TEZLİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

**BEYİN İSKEMİSİ SONRASINDA UYGULANAN ETİL PİRUVATIN**  
**SIÇAN HİPOKAMPUSUNUN NÖRON SAYISI ÜZERİNE ETKİSİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Ayşe İKİNCİ**

**Haziran 2011**

**TRABZON**

**T.C.**  
**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**  
**TEZLİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

**BEYİN İSKEMİSİ SONRASINDA UYGULANAN ETİL PİRUVATIN**  
**SIÇAN HIPOKAMPUSUNUN NÖRON SAYISI ÜZERİNE ETKİSİ**

**Ayşe İKİNCİ**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 17.05.2011**

**Tezin Sözlü Savunma Tarihi : 10.06.2011**

**Tez Danışmanı : Prof. Dr. Ersan ODACI**

**Jüri Üyesi : Prof. Dr. Engin YENİLMEZ**

**Jüri Üyesi : Doç. Dr. Sinan CANPOLAT**

**Enstitü Müdürü : Prof. Dr. Ahmet KALKAN**

**Haziran 2011**

**TRABZON**

## ÖNSÖZ

“Beyin İskemisi Sonrasında Uygulanan Etil Piruvatın Sıçan Hipokampusunun Nöron Sayısı Üzerine Etkisi”<sup>\*</sup> isimli çalışma K.T.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak hazırlanmıştır. Yüksek lisans eğitimim, tez konumun belirlenmesi, planlanması, yürütülmesi ve kontrolleri sürecinde bilimsel ve manevi desteğini esirgemeyen, bu zorlu süreçte hiçbir fedakârlıktan kaçınmayan ve her zaman yanımda olan danışmanım çok değerli hocam Prof. Dr. Ersan ODACI’ya teşekkür ederim. Aynı şekilde yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmalarım esnasında bilimsel ve manevi desteklerini benden hiçbir zaman esirgemeyen Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Engin YENİLMEZ’e ve Doç. Dr. Esin YULUĞ’a teşekkür ederim.

Laboratuar çalışmalarım ve stereolojik analizlerin yapılmasında her türlü desteğini benden esirgemeyen Rize Üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi Anabilim Dalı Başkanı Sayın Doç. Dr. Orhan BAŞ’a, sıçanlara uygulanan cerrahi girişimlerde büyük yardımlarını gördüğüm K.T.Ü. Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Doç. Dr. Sinan CANPOLAT’a ve Beyin ve Sinir Cerrahisi Anabilim Dalı Araştırma Görevlisi Sayın Dr. Hasan ÜÇÜNCÜ’ye, çalışmanın istatistiksel analizlerini yapan K.T.Ü. Tıp Fakültesi Halk Sağlığı Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Gamze ÇAN’a ve değerli hocam Sayın Prof. Dr. Hamdi ÖĞÜT’e teşekkür ederim. Ayrıca aynı dönemlerde yüksek lisans yaptığım ve çalışmalarım bana her türlü desteği sağlayan sevgili arkadaşlarım Sibel TÜREDİ’ye, Zeynep AKTÜRK’e, sıçanların bakımı, takibi ve uygulamalarında yardımlarını benden esirgemeyen K.T.Ü. Tıp Fakültesi, Cerrahi Araştırma Merkez’i çalışanlarına da teşekkür ederim. Benim bugünlere gelmemi sağlayan anneme, bugünleri görmesini çok istediğim rahmetli babama, bu zorlu günlerimde bana sabır gösteren, hiçbir maddi ve manevi desteğini esirgemeyen tüm aile bireylerime de sonsuz teşekkürler.

Haziran 2011

Ayşe İKİNCİ

---

<sup>\*</sup> Bu çalışma Karadeniz Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (KTÜ BAP) tarafından 2010.114.001.9 kod nolu proje ile desteklenmiştir.

## İÇİNDEKİLER

	<b><u>Sayfa No</u></b>
ÖNSÖZ.....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	iv
TABLolar DİZİNİ .....	vi
KISALTMALAR .....	vii
1. GİRİŞ VE AMAÇ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	3
2.1. Hipokampus Morfolojisi .....	3
2.1.1. İnsan Hipokampusunun Anatomik Özellikleri .....	3
2.1.2. İnsan Hipokampusunun Histolojik Özellikleri .....	4
2.1.3. Sıçan Hipokampusunun Anatomik Özellikleri .....	5
2.1.5. Hipokampusun Görevleri .....	7
2.2. İskemi.....	8
2.2.1. İskeminin Patolojisi.....	8
2.2.2. İskemide Hücre Ölümü .....	9
2.2.3. İskemik Hücre Hasarının Patogenezi .....	10
2.2.4. İskeminin Nöron Sayısı Üzerine Etkisi.....	14
2.2.5. Serebral İskemide Deneysel Hayvan Modelleri.....	15
2.3. Etil Piruvat .....	16
2.3.1. Etil Piruvatın Farmakolojik Özellikleri.....	16
2.3.2. Etil Piruvatın Merkezi Sinir Sistemi Üzerine Etkisi .....	16
2.4. Nöron Sayısı Hesaplama Yöntemleri.....	17
2.5. Stereolojik Yöntemler .....	18
2.5.1. Stereolojide Tarafsızlık ve Etkinlik Kavramları .....	18
2.5.2. Stereolojide Sistemik Rastgele Örnekleme .....	19
2.5.3. Stereolojide Ön Çalışma .....	19
2.5.4. Stereolojide Boyut ve Sonda Kavramı.....	21
2.5.5. Tarafsız Sayım Çerçevesi.....	21
2.5.6. Fiziksel ve Optik Disektör .....	22

2.5.7.	Fiziksel ve Optik Parçalama .....	24
3.	GEREÇ VE YÖNTEM .....	26
3.1.	Deneysel Çalışma Süreci .....	26
3.1.1.	Sıçanların Temini ve Bakımı .....	26
3.1.2.	Grupların Özellikleri ve Çalışma Süresince Takibi .....	27
3.1.3.	Sıçanlara Yapılan Cerrahi Müdahaleler .....	28
3.2.	Histolojik İşlemler.....	30
3.2.1.	Dokuların Elde Edilmesi.....	30
3.2.2.	Doku Takibi .....	30
3.2.3.	Kesitlerin Alınması .....	31
3.2.4.	Kesitlerin Boyanması .....	32
3.3.	Nöron Sayısı Hesaplaması .....	33
3.3.1.	Kesitlerde Hipokampus Sınırının Tespiti.....	33
3.3.2.	Kesitlerde Nöronların Tespiti.....	33
3.4.	Stereolojik Analizler .....	34
3.4.1.	Stereoloji Analiz Sistemi .....	34
3.4.2.	Stereolojik Analizlerin Detayları .....	35
4.	BULGULAR.....	36
4.1.	Sıçanların Çalışma Süresince Davranışlarının Yönünden Değerlendirilmesi .....	36
4.2.	Hipokampus Nöronlarının Morfolojik Değerlendirilmesi .....	36
4.3.	Hipokampus Nöron Sayısı Verileri .....	42
4.4.	Verilerin İstatistiksel Analizi .....	44
5.	TARTIŞMA .....	45
6.	SONUÇLAR VE ÖNERİLER .....	52
7.	ÖZET .....	53
8.	SUMMARY .....	54
9.	KAYNAKLAR .....	55

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<b><u>Sayfa No</u></b>
Şekil 1. Sıçan Hipokampusunun Panoramik Görüntüsü (Cresyl Fast Violet), GD: Girus Dentatus, CA: Corno Ammonis. ....	6
Şekil 2. Tarafsız Sayım Çerçevesi.....	22
Şekil 3. Disektör Yönteminin Esası Olan Disektör Sondasının Şematik Gösterimi .....	23
Şekil 4. (A) İkili Sıçanların Takip Edildiği Kafes, (B) Kontrol Grubu Sıçanların Takip Edildiği Kafes, (C) Sıçanların Takip Odası. ....	27
Şekil 5. Yaşargil Anevrizma Klemp (BA045) Kullanılarak, İskemi Oluşturulması. (A) İskemi Bölgesinin Açılması, (B) İskemi Yapılması İçin Damarın Bulunması, (C) Yaşargil Anevrizma Klempinin Takılması, (D) İki Damarda Klemplenecek İskemi Yapılması. ....	29
Şekil 6. Sıçanların Kafasının Kesilmesi İçin Özel Olarak Dizayn Edilen Giyotin .....	30
Şekil 7. Stereoloji Analiz Sistemi. (1) Kamera, (2) Mikroskop, (3) Otomatik Tabla, (4) Monitör, (5) Bilgisayar Kasası, (6) Kontrol Ünitesi, (7) El Kumandası. ....	34
Şekil 8. Kontrol Grubuna Ait Sıçan Hipokampuslarının Morfolojik Görüntüleri (A) Hipokampusun Panoramik Görüntüsü (X2), (B) Corno Ammonisin Genel Görüntüsü (X10), (C) Hipocampus CA Bölgesindeki Nöronların Görüntüsü (X20), (Cresyl Fast Violet), CA: Cornu Ammonis, GD: Girus Dentatus). ....	37
Şekil 9. İskemi Grubuna Ait Sıçan Hipokampuslarının Morfolojik Görüntüleri. (A) Hipokampusun Panoramik Görüntüsü (X2), (B) Corno Ammonisin Genel Görüntüsü (X10), (C) Hipocampus CA Bölgesindeki Nöronların Görüntüsü (X20), (Cresyl Fast Violet), CA: Cornu Ammonis, GD: Girus Dentatus). ....	38
Şekil 10. İskemi+Etil Pirüvat Grubuna Ait Sıçan Hipokampuslarının Morfolojik Görüntüleri. (A) Hipokampusun Panoramik Görüntüsü (X2), (B) Corno Ammonisin Genel Görüntüsü (X10), (C) Hipocampus CA Bölgesindeki Nöronların Görüntüsü (X20), (Cresyl Fast Violet), CA: Cornu Ammonis, GD: Girus Dentatus).....	39
Şekil 11. Sham+Etil Pirüvat Grubuna Ait Sıçan Hipokampuslarının Morfolojik Görüntüleri. (A) Hipokampusun Panoramik Görüntüsü (X2), (B) Corno Ammonisin Genel Görüntüsü (X10), (C) Hipocampus CA Bölgesindeki Nöronların Görüntüsü (X20), (Cresyl Fast Violet), CA: Cornu Ammonis, GD: Girus Dentatus).....	40
Şekil 12. Sham+Ringer Laktat Grubuna Ait Sıçan Hipokampuslarının Morfolojik Görüntüleri. (A) Hipokampusun Panoramik Görüntüsü (X2), (B) Corno Ammonisin Genel Görüntüsü (X10), (C) Hipocampus CA Bölgesindeki	

Nöronların Görüntüsü (X20), (Cresyl Fast Violet), CA: Cornu Ammonis, GD: Girus Dentatus).....	41
Şekil 13. Tüm Grupların Nöron Sayısına Göre Karşılaştırılması (p=0,00001).....	44

**TABLolar DİZİNİ**

	<b><u>Sayfa No</u></b>
Tablo 1. Çalışma Grupları ve Özellikleri .....	27
Tablo 2. Kesit Örnekleme Oranı ve Analizlerde Kullanılan Değerler .....	35
Tablo 3. Her Bir Sıçana Ait Nöron Sayısı, Grupların Ortalama Nöron Sayısı (ONS), Hesaplamalarda Kullanılan Kesit Sayısı, Ortalama Kesit Kalınlığı (OKK), Disektör Partikül Sayısı (DPS), Hata Katsayısı (HK) ve Değişim Katsayıları (DK) .....	42
Tablo 4. Tüm Grupların Karşılaştırılmalı p Değerleri .....	44



**KISALTMALAR**

AMPA	: Propanoic acid
ATP	: Adenozin trifosfat
ANOVA	: Analysis of variance (Varyans analizi)
CA	: Corno ammonis
cGMP	: Spesifik fosfodiesteraz tip 5 (esteraz)
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DPS	: Disektör partikül sayısı
DK	: Değişim katsayısı
eNOS	: Endotelial nitrik oksit sentaz
ET-1	: Endotelin 1
EP	: Etil pirüvat
ELAM	: Endothelial-leukocyte adhesion molecule
GABA	: Gamma aminobütirik asit
GD	: Girus dentatus
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	: Hidrojen peroksit
HK	: Hata katsayısı
iNOS	: İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
İYB	: Yakın iskemi bölgesine
ICAM	: Inter-cellular adhesion molecule
IL-1	: Interleukin -1
IL-6	: Interleukin -6
IL-10	: Interleukin -10
KTÜ	: Karadeniz Teknik Üniversitesi
L-NAME	: L-nitro-arginin
MSS	: Merkezi sinir sistemi
MDA	: Malondialdehit
NO	: Nitrik oksit
NOS	: Nitrik oksit sentaz
nNOS	: Nöronal nitrik oksit sentaz

NMDA	: N-methyl D-aspartate
ONS	: Ortalama nöron sayısı
OKK	: Ortalama kesit kalınlığı
pO <sub>2</sub>	: Partial pressure of oxygen
pCO <sub>2</sub>	: Partial pressure of carbon
ROS	: Reaktif oksijen türleri
SP	: Sodyum pirüvat
SPSS	: Statistical package for the social sciences, version
SS	: Standart sapma
TNF $\alpha$	: Alfa tümör nekrozu faktörü
VEGF	: Vasküler endotelyal büyüme faktörü
7-NI	: 7-nitroindazol
$\mu\text{m}$	: Mikrometre

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

İskemi, damar tıkanması ya da bir damarın yırtılıp kanaması sonucunda dokuya ulaşan kanın azalması veya tamamen kesilmesi ile meydana gelir. İskemiye karşı her dokunun duyarlılığı farklıdır. Merkezi sinir sistemi (MSS) metabolik yönden aktif olduğundan iskemiye karşı oldukça duyarlıdır (1). İskemik beyin hasarı insanlarda önemli patolojik durumlara yol açar. Özellikle hayvanlar üzerinde oluşturulan deneysel iskemi modellerinde hasarın nasıl meydana geldiği önemli ölçüde açıklanmıştır (2, 3). Ancak birçok çalışma olmasına rağmen oluşan hasarın nasıl önleneceği konusunda henüz yeterli ilerleme sağlanamamıştır.

Bu çalışma hipokampus bölgesinde yapılmıştır. Hipokampusun iskemiye karşı hassas oluşu, nöron sayısının fazlalığı ve deney hayvanlarında postnatal dönemde nörogenezisin devam etmesi bu seçimimize sebep olmuştur. Hipokampusun girus dentatusu erişkin memelilerin beyinlerinde nörogenezisin devam ettiği bölgelerden biridir. (4, 5). Hipokampusun öğrenme ve hafıza sürecinde çok önemli rolü olduğu, kısa süreli belleğin uzun süreli belleğe çevrilmesini sağladığı ve edinilen bilgileri depoladığı bilinmektedir (6, 7). Hipokampus sağ ve sol hipokampus olmak üzere ikiye ayrılır. Çoğu bireyde, baskın olan sol hipokampus öncelikle sözel öğrenme ve belleğe aracılık eder. Baskın olmayan sağ hipokampus ise sözel olmayan belleğe aracılık eder (8).

Yakın zamana kadar yetişkin memelilerinin MSS'de yeni nöronların oluşmadığı ya da hasarlı bölgelerde yenilenme olmadığı düşünülmekteydi (9). Ancak son zamanlarda yapılan çalışmalar ile yetişkin MSS'nin yeni glia ve nöron üretme yeteneğinde olduğu ortaya kondu. Bu çalışmalar multipotent özellikleri tanımlanan sinir kök hücrelerinin insanları da içine alan çeşitli memeli türlerinde yaşam boyunca çeşitli sinir hücrelerine dönüştüğünü göstermektedir (10, 11). Normal yetişkin beyinlerinin birçok yerindeki nöronlar hücre ölümü sonrasında yenilenmez. Ancak kendi kendini yenileyen kök hücreleri beynin farklı bölgelerinde gösterilmiştir. Bu bölgeler hipokampusun girus dentatusu ve lateral ventriküllerin subventriküler bölgesine yakın olan subependimal katmandır (12). Bu kısımlardaki kök

hücreler bazı ilaçlar, çevresel etkenler, bazı psikolojik ve patolojik olaylar sonucunda uyarılarak yeni sinir hücreleri oluşumunu tetikler. Bu etkenlerden bir tanesi de beyin iskemisidir. İskemik beyin hasarı hücrel ve moleküler yenilenme mekanizmalarını tetikleyerek iskemik bölgede nörogenezisin başlamasını sağlar (3).

Deneysel iskemi çalışmaları incelendiğinde etil pirüvat'ın (EP) beyinde nöroprotektif etkisinin olduğu ve iskemi uygulamasından 24 saat sonra verilse bile nöroprotektan olarak kullanılabilceğini görülmektedir (13, 14). Postiskemik inflamasyonun iskemik hasara yol açmasının çoklu mekanizmalarla izah edilmesi nedeniyle EP'nin nöroprotektif mekanizması da birçok mekanizma ile izah edilebilir. Ancak her ne mekanizma ile izah edilirse edilsin EP'nin sinir sistemi dokuları üzerine koruyucu etkisinin var olabileceği ve bunun sonucunda beyin iskemisini engelleyebileceğini ifade edebilmek önemlidir (13, 14). Bu nedenle, beyin iskemisinde EP'nin hipokampus nöron sayısı üzerine olabilecek muhtemel etkilerini araştırmak için bu çalışma planlanmıştır.

Yapılan çalışmalar incelendiğinde nöron sayısı gibi sayısal verilerin verildiği çalışmalarda stereolojik yöntemlerin sıklıkla kullanıldığı görülmektedir. Bu nedenle sunulan çalışmada nöron sayısını hesaplamak için stereolojik yöntemler kullanılmıştır. Stereoloji, yapıların iki boyutlu görüntülerinden yola çıkarak, onların üç boyutlu özellikleri ile ilgili sayısal verilerinin elde edilmesini sağlayan bir bilim dalıdır (15). Stereolojik yöntemler az zamanda güvenilir sonuç elde edilmesini sağlayan ve gerçek değerden sistematik bir biçimde sapma göstermeyen yöntemler bütünüdür (16, 17, 18). Sinaps ve nöron sayımını içeren çalışmalarda da stereolojik yöntemlerden olan disektör yöntemine başvurulur (19, 20, 21). Bu nedenle çalışmada nöron sayısını elde etmek için stereolojik yöntemlerden olan optik disektör yöntemi kullanılmıştır (16, 17, 18).

Sonuç olarak bu çalışmada deneysel olarak oluşturulan iskemi sonrası uygulanan EP'nin sıçan hipokampus nöron sayısı üzerine etkisi histolojik ve stereolojik yöntemler kullanılarak değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçların ilerde yapılacak deneysel ve klinik çalışmalar için bir ön çalışma olması, muhtemel sonuçlarından yola çıkılarak iskemi tedavisinde iyileşme süresinin kısaltılması, tedavi maliyetinin düşürülmesi, erken işe dönüşün sağlanması ve daha konforlu bir iyileşme süreci kazanılması gibi katkıları olabileceği düşünülmektedir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Hipokampus Morfolojisi

#### 2.1.1. İnsan Hipokampusunun Anatomik Özellikleri

İlk kez İtalyan anatomist Julius Caesar Aranzius (1530–1589) tarafından beynin medial temporal lobu içinde farkedilen hipokampus'a, denizati'na benzerliğinden dolayı bu isim verilmiştir (22). Hipokampus'un üç boyutlu yapısı oldukça karmaşıktır. Memelilerin çoğunda hipokampusun uzun eksenini C şekline benzer bir yapıya sahiptir (23, 24). Hipokampus çoğu lateral ventrikül içinde olmak üzere ventral yüzeyden içe doğru kıvrılan serebral korteksin uzamış kısmıdır (25).

Hipokampus beynin dorsal ve septal kısmından başlar. Başlangıç kısmından itibaren koçboynuzu şeklinde oluşan kemer, beynin ventral ve temporal bölgelerinde sona erer. Bu hipokampusun uzun eksenidir ve septo-temporal veya dorso-ventral eksen olarak da adlandırılır (26, 27). Anatomik olarak hipokampus, corno ammonis ve girus dentatus'tan oluşur (28). Bazı kaynaklarda işlevsel içeriği nedeniyle subiculum da hipokampusun bir bölgesi olarak kabul edilmektedir (28). Ancak subiculum, manyetik rezonans görüntülerinde corno ammonis'den ayırt edilemez. Bu nedenle bu tip çalışmalarda çoğu zaman corno ammonis terimi subiculum'u da içerir. Özetle hipokampus corno ammonis, girus dentatus ve subiculum bölgelerinden oluşur.

Anatomik olarak hipokampus baş (caput hippocampi), gövde (corpus hippocampi) ve kuyruk (cauda hippocampi) olmak üzere vücut eksenine paralel üç parçaya bölünür (28, 29). Hipokampusun baş kısmı içe ve dışa doğru enine katlanmalar ile karakterize, kalınlaşmış ve kavilidir (28). Bu kısım önde amigdala ve lateral ventrikül'ün temporal boynuzu'nun uncal recessus'u tarafından sınırlandırılır. Hipokampus gövdesi dentate girusun içini çevreleyen corno ammonis'in gri maddesinden meydana gelir (30). Gövde üst ve yan fibrilla'nın sebep olduğu beyaz cevher liflerini içeren alveus tarafından çevrelidir (22). Hipokampus'un kuyruk

kısmı ise dentate gyrus ve corno ammonis ile devam eder. Tabakalı bir yapıya sahiptir. Kuyruk subsplenal gyrus ile sonlanır ve orta kısımdan ambient cistern'in kanatlarıyla çevrilidir. Yan sınırı ise lateral ventrikül'ün temporal boynuzu tarafından oluşturulur (22).

### 2.1.2. İnsan Hipokampusunun Histolojik Özellikleri

Hipokampus bir paleocortikal oluşum olarak tanımlanır. Neokorteksin aksine hipokampus esas olarak granül hücrelerin oluşturduğu iki ve piramidal hücrelerin oluşturduğu bir tabaka olmak üzere üç esas (primer) nöron tabakasından oluşur (31). Bu tabakalar stratum poliforme, stratum piramidale ve stratum molekülare olarak adlandırılır. Üç tabakadaki hücrelerin dendrit ve aksonlarının farklı şekilde düzenlenmesiyle birçok sekonder tabaka da oluşur. Primer ve sekonder tabakalar birlikte ele alındığında hipokampus stratum poliforme (oriens), stratum piramidale, stratum radiatum, stratum lakunozum ve stratum molekülare tabakalarından oluşur (6).

**1. Stratum poliforme (oriens):** Hipokampusun en dış tabakası olup, stratum oriens olarak da adlandırılan bu tabaka, alveus ile stratum piramidale arasında bulunur (6). Stratum oriensin içinde ağırlıklı olarak piramidal hücre bulunur (32). CA3 piramidal hücrelerin aksonları hem karşıda hemde aynı taraftaki üst piramidal bölgenin aşağı kesimlerinde sona erer (33).

**2. Stratum piramidale:** Tüm katmanlarında piramidal hücreler vardır. Bu nedenle piramidal tabaka olarak adlandırılır. Stratum piramidale dışındaki hipokampus bölgelerinde de çok miktarda piramidal hücre bulunur (32).

**3. Stratum radiatum:** Yoğun olarak akson demetlerinin bulunduğu tabakadır. CA3 piramidal hücrelerinin aksonları, hem karşıda hemde aynı tarafta bulunan üst piramidal bölgenin orta kesimlerinde sona erer. Girus dentatus granül hücrelerinin aksonları, yosunsu lifleri, üst piramidal demetlerden meydana gelen üst piramidal bölgenin proksimaldeki çoğu parçaları da bulunur (33).

**4. Stratum lakunozum:** Diğer tabakalardan gelen zengin bir lif ağı içerir. CA3 ve entorhinal korteksten gelen lifler üst piramidal bölgenin distalinde sona erer ve bu tabakayı oluşturur (33).

**5. Stratum molekülare:** En dışta bulunan tabakadır. Granüler ve piramidal hücrelerin dendritleri moleküler tabakaya yayılır. Ayrıca piramidal hücre tabakasından bulunan büyük piramidal hücrelerin dendritleri hem moleküler tabakaya hem iç tabakaya uzantılar verirler.

Cornu ammonis, baş harflerini temsilen CA olarak da ifade edilir ve içerdiği hücre farklılıklarından dolayı CA1, CA2, CA3 ve CA4 olmak üzere dört alt bölgeye ayrılır. Bu adlandırma ilk defa 1934 yılında Lorente de No tarafından yapılmıştır (34). Bu alanlardan subiculum'a en yakın olanı CA1, gyrus dentatus'a en yakın olanı ise CA3'tür. Gyrus dentatus'un bir parçası veya hilusu olarak adlandırılan CA4 alanı ise, CA3 alanı ile gyrus dentatus arasında bulunmaktadır. Fakat bu alan, içerdiği hücre yapısı ve bağlantı lifleri açısından CA3'ten farklı olmadığı için modern sınıflamadan çıkarılmıştır (35, 36). Hipokampus gövdesinin koronal kesitinde, CA1 bölgesi, subiculum içine doğru ilerler, subiculum içinde CA1'e bitişik prosubiculum, subiculum proper, presubiculum ve parasubiculum olarak tekrar bölünerek entorhinal korteks içine devam eder (30, 37, 38).

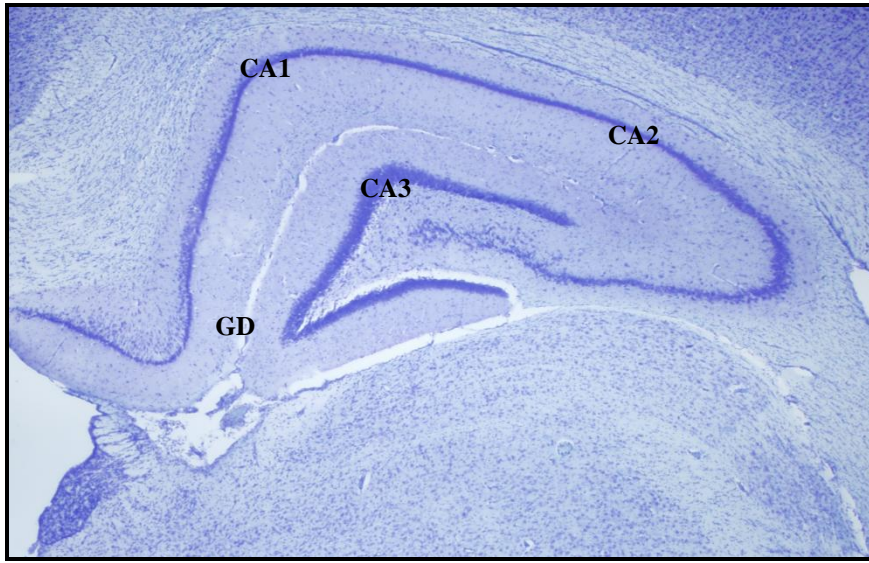
CA3 alanında bulunan hücrelerin en önemli özelliği, gyrus dentatus granüler hücrelerinden gelen mossy lifleri'ni almasıdır. Buradaki piramidal hücrelerin boyutu diğer alanlardaki hücrelere göre daha fazladır. Piramidal hücrelerin en yoğun olduğu alan ise CA2 alanıdır ve bu alanda mossy lifleri'nin kaybolduğu görülür. Supramamillar bölge ve hypothalamus'tan CA2 alanına yoğun lifler gelir. Hipokampus'un en karmaşık bölgesi CA1 alanıdır. Büyüklükleri birbirinden farklı piramidal hücrelerin bulunduğu bu alandaki nöronların %10'unu internöronlar oluşturur (36).

### **2.1.3. Sıçan Hipokampusunun Anatomik Özellikleri**

Hipokampus sıçan ön beyninin geniş bir bölümünü meydana getirir (39). Sıçanda hipokampus dorsal ve ventral olmak üzere iki kısımdan oluşmaktadır. Dorsal hipokampus yanlardan lateral ventriküllerce çevrelenmektedir. Frontalden kaudale doğru ilerlendikçe iki hipokampal formasyon birleşir. Sıçan gyrus dentatusu beyin medialindedir ve geniş bir yer kaplamaktadır. Çalışmalar en iyi gelişmiş gyrus dentatusun insanda olduğunu göstermektedir (40, 41). İnsanlardaki hipokampusun septal ve temporal bölgeleri kemirgenlerde sırasıyla dorsal ve ventral bölgelere karşılıklı gelir (42).

### 2.1.4. Sıçan Hipokampusunun Histolojik Özellikleri

Sıçan hipokampusunda esas olarak granül ve piramidal hücreler bulunur (43). Sıçanlarda, hipokampal piramidal hücrelerin çoğu prenatal dönemde ortaya çıkar ve postnatal birinci ayda hipokampus tam anlamıyla fonksiyonel haldedir (39). Sıçanlar da dahil olmak üzere memeli hipokampusunun subiculum, girus dentatus ve etorhinal korteks'den meydana geldiği tanımlanmıştır (44, 45, 46).



**Şekil 1.** Sıçan Hipokampusunun Panoramik Görüntüsü (Cresyl Fast Violet), GD: Girus Dentatus, CA: Corno Ammonis.

Sıçanlarda hipokampus Lorente de No tarafından kendi içinde CA1, CA2 ve CA3 olmak üzere üç ayrı bölgeye ayrılmıştır (47, 48) (Şekil 1). Bu tanımlamadaki CA2 ve CA3 alanları Ramon y Cajal'ın yaptığı tanımlamadaki büyük hücreli “regio inferior” bölgesine CA1 bölgesi ise küçük hücreli “regio superior” bölgesine karşılık gelmektedir. CA1 ve CA3 bölgelerindeki piramidal hücrelerin büyüklük farklılıklarına ek olarak bağlantı farklılıkları da vardır. CA3 piramidal hücreleri girus dentatus'tan yosunsu liflerden uyarı alırken, CA1 piramidal hücreleri almaz. CA2 alanı ise tartışmalı olup, CA3 ve CA1 arasında, bu iki alanın birbirine karıştığı dar bir geçiş alanıdır. CA2, CA3'teki gibi büyük hücre gövdeleri içerir; fakat CA1 hücreleri gibi yosunsu lif innervasyonu almaz. CA2, çeşitli bakımlardan CA3 alanının uç parçası gibidir (47, 48).



### 2.1.5. Hipokampusun Görevleri

Hipokampus'un karmaşık yapısı ve beyinde bulunan bir çok bölge ile yakın ilişki içinde olması fonksiyonunun tanımını zorlaştırmaktadır (49). Hipokampus limbik sistemin bir parçasıdır. Limbik sistemin bir parçası olarak hipokampusun en önemli görevlerinden bir tanesi cinsel ve fonksiyonel davranışları düzenleyici rolüdür. Yapılan çalışmalar hipokampusun öğrenme ve hafıza sürecinde çok önemli rolü olduğunu göstermektedir (7).

Hipokampusa ulaşan hemen hemen her türlü duyuşsal aktivasyon, hipokampusun küçük bir kısmını aktive eder. Bu aktivasyonla birlikte hipokampus, özellikle en büyük çıkış yolu olan forniks yoluyla ön talamus, hipotalamus ve limbik sistemin diğer bölgelerine sinyaller gönderir. Böylece hipokampus gelen duyuşsal sinyalleri farklı amaçlar için uygun davranış reaksiyonlarının içerisinden geçiren ek bir kanal rolü oynar (6, 50).

Hipokampusun kısa süreli belleğin uzun süreli belleğe çevrilmesi güdüsünü sağladığı düşünülmektedir. Bir başka ifadeyle, hipokampusun yeni bilginin kalıcı olmasına kadar zihnin onu tekrarlamasını gerektiren sinyal veya sinyaller ilettiği ileri sürülmüştür. Mekanizma ne olursa olsun hipokampus olmadan sözlü ya da sembolik uzun süreli anıların kalıcı olması mümkün olamaz (6).

Hipokampusun bilinen diğer fonksiyonlarından biri de depolama ve depolanan anıları hatırlamaktır (51). Hipokampusun CA3 ve CA1 bölgelerinin bildirisel anıların depolanması için ilişkili olduğu da ileri sürülmüştür (52). Hipokampus nöronları arasında oluşan mikrodevreler, nöronların bilgiyi depolaması ve belli bir uyum içinde çalışması için oluşmuş devrelerdir. Bu mikrodevrelerin baskın uyarıcı hücreleri; primidal hücre, granül hücresi ve yosunlu hücrelerdir (53). Bu hücreler arasında iletişim ağları vardır ve bu ağlar hipokampusun temel bilgi işleme yapılarıdır (51).

Hipokampus herbir hemisferde bulunan önemli ve birçok fonksiyonu bakımından eşsiz bölgelerdir. Hipokampus sağ ve sol hipokampus olmak üzere ikiye ayrılır ve her bir bölümün işlevselliği farklıdır. Çoğu bireyde, baskın olan sol hipokampus öncelikle sözel öğrenme ve bellekte aracılık eder. Ancak baskın olmayan sağ hipokampus sözel olmayan bellekte aracıdır (8). Dorsal hipokampus uzaysal bellek işlemlerinden sorumlu tutulurken, ventral hipokampus anksiyete de rol oynar (54).

Sıçanlardaki fonksiyonlarına bakacak olursak; hipokampus kemirgenlerde çeşitli hafıza görevleri için kritik bir öneme sahiptir (42). Hipokampusun öğrenme ve hafızadaki önemi

kemirgenlerde iyi tanımlanmıştır (55). Kemirgenlerdeki hipokampus özellikle uzaysal öğrenme ile ilişkilidir (54).

## 2.2. İskemi

Beyin iskemisi tromboz, emboli veya değişik nedenlerle kan akımının azalması ya da tamamen kesilmesi sonucu meydana gelir. Kan akımının azalması veya tamamen kesilmesi sonucu oksijen, adozin triosfat ve glikoz gibi enerji kaynaklarının tükenmesi ile başlayan ve nöronlarda zedelenmeyle sonuçlanan bir dizi olaylar gerçekleşir (56, 57).

### 2.2.1. İskeminin Patolojisi

İskeminin en önemli üç doğal nedeni; tromboz, emboli ve sistemik kan akımının azalmasıdır (58, 59). Normal bir bireyde beyinden bir dakikada geçen kan miktarı yaklaşık 800 ml civarındadır. Bu durum beyin dokusunun bol kanla beslendiğini ve metabolizmasının yüksek olduğunu göstermektedir (60). Vücuttaki diğer organlarla karşılaştırıldığında kan akımındaki değişikliklere en hassas tepkiyi veren ve bu değişikliklerden en fazla etkilenen organ beyindir. Beyindeki düzenli ve sabit kan akımı, nöronların oksijen ve glikoz ihtiyacının kesintisiz olarak devamlılığını sağlar. Akımda kısa süreli de olsa bir azalma olduğunda sinir hücreleri zarar görür ya da canlılığını kaybeder. Ayrıca beyinde kan akımının azalması, beyin bir diğer bölgesinde kanamaya ve kan akımının kesildiği bölgede ise iskemiye sebep olur. Bu durum halk arasında inme diye adlandırılır (58, 59).

Kanama ile beyin damarlarının yırtılması sonucu, kanama olan bölgedeki beyin boşluğuna kan dolar (58, 59). Kanama olan damarın beslediği bölgede ise iskemi meydana gelir ve iskemi sonucu MSS'ye yeterli miktarda O<sub>2</sub> ulaşamayacağı için nöronların canlılığı dramatik olarak olumsuz etkilenir. İskemi süresince dokularda ve kanda pO<sub>2</sub> değeri azalırken, pCO<sub>2</sub> değeri artar (hiperkapni). Hiperkapni belli dereceye kadar beyin kan akımını ve pulmoner ventilasyonu artırır. Ancak şiddetli ve uzun süre devam eden hipoksi bradikardi oluşturur ve kan basıncını azaltarak kardiyak fonksiyonları baskılar. Eğer iskemi uzun süre devam ederse beyin dokusunda pO<sub>2</sub> azalmasıyla birlikte glikoz konsantrasyonu da azalır. Bu azalma hücrel enerji kaybına neden olarak nöronal hasara ya da hücre ölümüne neden olur (61). Nöron ölümü oksijen veya glikoz ya da her ikisinin temininin azalması sonucunda meydana gelir (62).

### 2.2.2. İskemide Hücre Ölümü

İskemik hücre ölümünün nekrotik, apoptotik ve otofagositik hücre ölümü diye adlandırılan üç yolu vardır (63). Apoptotik ve otofagositik hücre ölümleri fizyolojik süreçlerdir ve normal hücre fonksiyonlarının bir parçası olarak kabul edilir (64). Nekroz ya da nekrotik hücre ölümü ise apoptotik ve otofagositik hücre ölümlerinden farklıdır. Nekrotik hücre ölümü yalnızca eksojen uyaran veya müdahale sonucu ortaya çıkar, programlanmış ya da normal fizyolojik bir süreç değildir (63).

**1) Nekrotik hücre ölümü:** Üç aşamada incelenebilir.

**a) Ödemli veya soluk hücreye dönüşme:** Bu aşamada sitoplazma çok şişkindir. Bazı mitokondrilerin kristalları düzensiz, şişkin ve yuvarlak görünümündedir. Endoplazmik retikulum, Golgi cisimciği ve polizomlar düzgün değildir. Ribozomlar çekirdeğin yakınında kümelenmiş olarak görülür. Mikrotübüller ve diğer filamentöz yapılar yoktur. Hücre zarı düzensizdir ve nadiren de olsa zar yapısındaki bozukluklar açıkça görülür. Çekirdek, kromatinin düzensiz kümelenmesi dışında normaldir. Bu değişiklikler periferik kromatolizisin özelliklerini gösterir (63).

**b) İskemik hücre değişiklikleri:** Çekirdek ve sitoplazmanın çoğu büzüşmüştür ve daha koyu görünümündedir. Sitoplazma genellikle çok büyük vakuoller içerir. Çekirdekçik sıklıkla bal peteği görünümündedir. Plazma ve çekirdek zarı çok düzensizdir. Hücreler iki boyutlu düzlemde üçgen şeklinde görülür. Mitokondriler çok şişkindir ve kristalları düzensizdir. Normal endoplazmik retikulum ve golgi kompleksi düzeni bozulmuştur. Bol miktarda ribozom ve çok az mikrotübül mevcuttur. Işık mikroskobu ile incelendiğinde bu hücrelerin asidofilik (eozinofilik) olduğu dikkati çeker. Ayrıca bu aşamada nekrotik nöronlar arjinofili de gösterirler (63).

**c) Homojenize hücre değişiklikleri/hayalet (ghost) hücre:** Çekirdek normalden daha koyu ve büzüşmüş görünümündedir. Hücre zarı yapısı bozuktur ve sıklıkla parçalanmıştır. Düzensiz kromatin kümelenmeleri vardır. Sitoplazma hafif büzüşmüş, küçük veziküller ve yoğun cisimler ile parçalanmış görünür. Fakat hala yapısını korur. Büzüşmüş mitokondrilere rağmen başka tanımlanabilir organel yoktur. Hücreler elektron mikroskobunda normal hücrelerden daha soluk ve eozinofilik olarak görünür. Bu nedenle bu hücreler hayalet (ghost) hücre olarak adlandırılır (63).

**2) Apoptotik hücre ölümü:** Apoptozis, normal fizyolojik uyarılara yanıt olarak hangi hücrelerin öleceğinin belli olduğu en iyi süreçlerden biri olarak kabul edilir. Apoptozis

programlanmış fizyolojik bir süreçtir. Apoptozisin nöron ölümünü geciktirdiğini iddia eden çalışmalar olmasına rağmen bunun morfolojik kanıtları henüz pek güçlü değildir (63, 65). Yapılan çalışmalarda sıçan hipokampusunda oldukça hafif iki damar tıkanıklığı ve dört damar tıkanıklığıyla yapılan iskemi de apoptozisin herhangi morfolojik etkisi görülmedi. Ancak 10 dakikalık global iskemi uygulaması sonrasında kedi hipokampusunun Purkinje hücrelerinde apoptozisin etkisi doğrulanmıştır (63, 66).

**3) Otofagositik hücre ölümü:** Hücrede belli şartlar altında, organeller ya da sitoplazmanın bir bölümü membranla çevrelenebilir. Primer lizozomlar bu yapıyla birleşir ve çevrili olan içeriğin sindirimini başlatırlar. Bu olayın sonucunda oluşan sekonder lizozoma otofagozom adı verilir. Otofagozomun içeriği hücre içi kökenlidir ve bu yolla hücre içi sindirim gerçekleşir. Örneğin salgı hücrelerinde salgı ürünü aşırı miktarda biriktiğinde de otofagositik aktivite görülür. Normal şartlarda lizozomal enzimlerce sindirilen ürünler, sitoplazmada tekrar kullanılması için hücre tarafından yeniden devreye sokulur.

Normal hücre içi protein devirleri de bu mekanizma ile meydana gelir ve bu kararlı durum proteinlerin bozulma mekanizmasının temelini de oluşturur (63). Gerçekte normal oranın çok ötesinde meydana gelen otofagositik aktivitenin aktif hücreleri öldürme yeteneği olduğunu gösteren ve otofagositik hücre ölümünü tanımlayan çok sayıda çalışma vardır (64). Otofagositik hücre ölümünün karakteristik morfolojisi, çoğalan sekonder lizozom ya da otofagozomların büyük vakuoller oluşturarak sitoplazmayı yoğunlaştırması ve düzensiz şekilde kümeleşen çekirdek kromatinidir. Bu iskemik hücre değişikliklerinden ya da bazı apoptozis vakalarında tanımlanan sitoplazma morfolojisine benzer bir durumdur (63).

### 2.2.3. İskemik Hücre Hasarının Patogenezi

Serebral iskemi hem oksijen hem de glikoz yoksunluğu ve serebral kan akımında azalma gibi çeşitli sebeplerden kaynaklanabilir. Kan akımında bozulma kalıcı olduğu zaman nöronal ölüme yol açabilir. İskemi odağının merkezindeki hücreler, iskemi başladığında ilk dakikalar içerisinde canlılıklarını kaybederler. İskemi merkezinin çevresindeki, perfüzyonun azaldığı alanlar (penumbra) ise hücrelerin hala yaşayabildiği alanlardır. Fakat iskemik penumbranın içindeki hücreler çeşitli patolojik olaylarla karşı karşıya kalırlar ve yaşamaları ya da ölmeleri çok kısa süre içerisinde gerçekleşir. Spontan reperfüzyon genellikle serebral iskeminin oluşmasıyla başlar. Spontan reperfüzyon çok fazla gecikmeden başlarsa (örneğin geçici iskemik atak durumunda) iskemik zararlar geri dönüşümlü olabilir. Eğer spontan

reperfüzyon meydana gelmez ise çoğu penumbra hücrelerde tamir edilemez hasarlar meydana gelir ve geri dönüşümleri mümkün olmaz .

İskemik penumbra ya da travmanın merkezine bitişik hücreler kendilerinin ve komşularının ölümüne sebep olabilen çeşitli patolojik süreçlerle karşı karşıya kalırlar. Bu hücre ölümünü destekleyen mekanizmalar ve ortaya çıkan etkenler hem iskemik hemde travmatik beyin hasarına neden olur. Bu mekanizmalar ve etkenlerin en önemlileri aşağıda verilmiştir (1).

**1) Eksitotoksik hasar mekanizması:** Glutamat ve aspartat, iskemik ve travmatik alanlardan kontrolsüz bir şekilde salınır. Nöronların glutamata maruz kalması, dakikalar içinde iyonoforik N-methyl D-aspartate (NMDA) ve propanoic acid (AMPA) reseptörlerini aktive eder. Bu da kalsiyum, sodyum ve suyun lezyon bölgesindeki hücrelere akın etmesine yol açar. Bunun sonucunda enerji kaybına bağlı, travmatik bölge'de olduğu kadar iskemik penumbra bölgesinde de sitotoksik ödem ve iyon dengesinde bozulma meydana gelir. Hücre içi kalsiyum seviyesindeki artış hücrel oksidatif stresin de artmasına sebep olur. Bu da hücre hasarına katkıda bulunur. Hücre içi kalsiyum, lipaz, proteaz ve endonükleaz gibi çeşitli enzimlerini aktive ederek Deoksiribonükleik asit (DNA), hücre proteinleri ve lipidlere zarar vererek hücre ölümüne yol açabilir (1).

AMPA ve aspartat reseptörlerinin aktivasyonu, eksitotoksik hasara katkısı olan membran depolarizasyonuna da neden olur (67). Bunların aksine glutamata bağlayan metabotropik reseptörler, iskemi ya da travmanın neden olduğu doku hasarını azaltır . Bu durum sinapslarda glutamat salınımının azalmasıyla ilişkilidir. Gerçektende bu inhibisyon ya sinaptik terminallerden amino asit salınımını uyarır ya da reseptörlerine bağlanmalarını bloke eder. Bu şekilde beyni koruduğu çeşitli çalışmalarda da gösterilmiştir (1).

**2) Nitrik Oksit:** Nitrik oksit (NO), MSS'de birden fazla fonksiyona sahip, aynı anda her yerde olabilen nörotransmitter bir gazdır. Nitrik oksit, nitrik oksit sentazın (NOS) üç farklı şekliyle arjininden üretilir. Bunlar nöronal NOS (nNOS), indüklenebilir nitrik oksit (iNOS) ve endotelial nitrik oksit (eNOS) olarak adlandırılır (1, 68).

Nöronal enzim yapısında olan nNOS, 12. kromozomdaki bir gen tarafından kodlanır. İskemik durumlarda nNOS, orta serebral arter irrigasyonundan etkilenen beyin bölgelerinde özellikle iskemi merkezindeki hasarı önleyicidir. İskemi esnasında nNOS, nörona zarar veren reaktif radikaller olan oksijen türleriyle reaksiyona girer ve NO üreterek miktarında artış sağlar. Örneğin NO, güçlü bir oksidan olan peroksinitrit üreten süperoksit anyonla etkileşime girer ve tiyol içeren proteinler oksitlenir. Benzer şekilde nNOS, travmatik beyin hasarı sonrası

serbest radikaller üretildiğinde ve nöronal hasar yayıldığında, artarak düzenleme yapar. İndüklenebilir NOS kalsiyumdan bağımsızdır ve 17. kromozomda yerleşik bir gen tarafından kodlanır. İndüklenebilir NOS travma gibi çeşitli stres durumlarında makrofaj, nötrofil ve diğer başka hücrelerden de salınarak artar (1, 68).

Endotelyal NOS ise kalsiyum bağımlıdır. Endotel hücrelerinin enzimidir ve 7. kromozomda yerleşik bir gen tarafından kodlanır. İskemik durumlarda diğer NOS izoenzimlerinin aksine beyin perfüzyonunu sağlayan muhtemel vazodilatatör etkiye bağlı koruyucu mekanizmada etkin olduğu düşünülüyor. Böylece nNOS blokajı, 7-nitroindazol (7-NI) gibi özel inhibitörlerle daha küçük enfarktüse neden olurken, L-nitro-arginin (L-NAME) gibi nonspesifik inhibitörlerle eNOS blokajı ve nNOS aktivitesi daha büyük enfarktüse yol açar. Ayrıca farelerde eNOS daha büyük enfarktüslerin, nNOS ise daha küçük enfarktüslerin üstesinden gelir. Endotelyal NOS, travmatik beyin zedelenmesi sonrası erken düzenleyicidir ve beyni korur. Endotelyal NOS'un beyni koruyucu etkisi diğer mekanizmalara yardımcıdır. Nitrik oksit, kan damarlarının çevresinde vazodilatatör etkili küçük yayılabilir bir molekül olarak görev yapar. Yakın iskemi bölgesine (İYB) yayılarak bu bölgedeki kapillerde trombosit agregasyonunu ve parankimaya lökosit infiltrasyonunu baskılar. Ayrıca İYB'de vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) üreterek eNOS açığa çıkmasını indükler ve İYB'de yeni kan damarlarının oluşumunu sağlar (1).

Endotelyal kaynaklı vazodilatatör olan NO, insan beyninin mikrovasküler endotelinde ortaya çıkan potent vazokonstrüktör peptid olan endotelin 1'in (ET-1) etkilerini ortadan kaldırır. Nitrik oksit tarafından ET-1 hücre içine kalsiyum girişini indüklemesi ve hücre iskeletinin F-aktin filamentlerini düzenlemesi baskılanır. Bir başka ifadeyle ET-1 ve NO etkileşimi mikrovasküler fonksiyonun düzenlenmesine yardımcı olur ve beyin dolaşımını sağlar. Endotelyal NOS aracılığıyla üretilen NO'nın diğer nöron koruyucu etkisi gamma aminobütirik asit (GABA) salınımının artışıyla sonuçlanan presinaptik sinyalleri değiştirmek şeklindedir. Endotelyal NOS kaynaklı NO aracılığıyla presinaptik sinyallerdeki böyleleri değişiklikler nöronal yapılanma ve iyileşme bakımından önemlidir. Sonuç olarak eNOS'un spesifik fosphodiesteraz tip 5 (cGMP) ile ilişkili mekanizmalar aracılığı ile motor nöronları apoptotik ölümden koruduğu da söylenebilir (1, 68).

**3) Reaktif oksijen türleri (ROS):** Hücre içi kalsiyum seviyelerinin sürekli artışı ksantin oksidaz gibi sitozolik enzimlerle olduğu kadar solunum zinciriyle süperoksit anyon radikallerinin oluşumuyla da ilişkilidir. Bu radikallerdeki artış ise oksidatif stresde artışa neden olur ve beyin oksidatif hasardan etkilenir. Bunun nedenleri oksidatif metabolik

aktivitenin artışı, reaktif oksijen metabolitlerinin yoğun olarak artışı, düşük antioksidan kapasite, hasarı tamir edecek mekanizmaların yeterli çalışmayışı, nöronların çoğalamaması ve sitoplâzmaya oranla hücre zarı yüzeyindeki artış olarak verilebilir. Reaktif oksijen türleri üretiminin artması lipid peroksidasyonuna sebep olur. Tek bir serbest radikalın oluşması bile etrafındaki moleküllerin ortadan kaldırılmasını hızlandırabilen bir süreç olabilir (1).

**4) İnflamasyon:** Travma bölgesinin etrafında ve iskemi hücrelerindeki inflamasyon hücre hasarını arttırabilir. Polimorfik hücreler, hücre zarına hasar veren myeloperoksidaz gibi toksik enzimler aracılığıyla hasar yapabilir. Alfa tümör nekrozu faktörü (TNF $\alpha$ ), Interleukin-1 (IL-1) ve Interleukin-6 (IL-6 ) gibi inflamatuvar sitokinler iskemiden bir saat sonra salınır. Bu sitokinler inflamatuvar reaksiyonu indükleyebilirler ve lökositleri etkilerler. Inter-Cellular Adhesion Molecule (ICAM) ve Endothelial-leukocyte adhesion molecule (ELAM) gibi adhezyon molekülleri ve doku metalloproteinazları da yayılarak, kan beyin bariyeri bozulunca lökositlerin salınımını kolaylaştırırlar.

Akut faz sırasında inflamatuvar cevabın inhibisyonu travma ve serebral iskeminin modellerinde daha iyi sonuçlara sebep olduğu görülmektedir. Oysa TNF reseptörleri eksik farelerde değerlendirme süresine bağlı olarak daha küçük veya büyük zarar verebilir. Interleukin-10 (IL-10) gibi diğer immünomodilatör sitokinler de immün sistemde sitoprotektif etkiye sahiptirler. Bu nedenle sitokinler zedelenme sonrası ortaya çıkan inflamatuvar cevabın erken (saatler içinde) ve geç (günler-haftalar) dönemlerinde rol alabilirler. Antiinflamatuvar stratejileri belirlerken, proinflamatuvar inhibisyonun zamanlaması da dikkatle değerlendirilmelidir (1).

**5) Endotelinler:** Endotelinler iskemiye alevlendirebilen vazokonstrüktör etkilerinden dolayı doku hasarında önemlidirler. Gerçektende iskemi başladıktan sonra ve daha sonraki zamanlarda endotelin seviyeleri dikkate değer bir şekilde artar. Endotelin seviyelerindeki bu aşırı artış, travmaya maruz kalmış hemisferlerin büyük bölümüyle (örneğin doğrudan korteks ve striatumu içeren komşu dokular) ilişkili görülmüştür (1).

**6) Apoptozis:** Beyin iskemisi sonrası ölen hücreler apoptosis ya da nekroz sonucu ölen hücreler olarak tanımlanabilirler. Apoptozis, iskemide meydana gelen hücre ölümlerinin yarından fazlasından sorumludur. Apoptozis için hücre içi sinyaller mitokondrial disfonksiyon tarafından tetiklenir. Hücre dışı sinyaller ise kaspazların eksikliğini gidermek için nekroz alanlarında aktive olan TNF süper aile reseptörlerinin aktivasyonu ile ilgilidir (1).

#### 2.2.4. İskeminin Nöron Sayısı Üzerine Etkisi

İskemik koşullar nedeniyle beyine yeterince kan akımının olmaması sonucu enerji metabolizmasında düşme, mRNA ve protein sentezinde azalma meydana gelir ve iskemik alan oluşur (63). Bunun sonucunda hedef alanda akut ve masif nöron ölümü meydana gelir. Beyin iskemisi sadece iskemi alanındaki nöronlarda değil çevre alanlarda ki nöronlar üzerinde de etkilidir. Beyinde oluşan iskemik stres, komşu alanlarda da gecikmeli nöron ölümü diye adlandırılan süreci başlatır. Daha sonra bu alanlarda ani ve yoğun hücre ölümüne neden olur (69).

Merkezi sinir sisteminde belirli bölgelerdeki hücreler ve hücre grupları iskemi sonucunda meydana gelen hipoksik-iskemik incinmeye diğerlerinden daha hassastırlar. Nöronlar en duyarlı hücrelerdir ve bunları astrositler, oligodendroglialar ve endotelial hücreler takip eder. Bir beyin bölgesi içindeki farklı nöron tipleri de iskemik hasara farklı duyarlılık gösterir. Örneğin hipokampusun CA1 bölgesi, dentate , hilus dorsolateral striatum ve Purkinje hücreleri iskemiye daha çok hassastır (70). Merkezi sinir sistemindeki hücrelerin iskemi süresine göre de duyarlılıkları farklıdır. Çalışmalar hipokampusta CA1 piramidal nöronların geçici ön beyin iskemisini takiben yaklaşık 2-3 günde canlılıklarını yitirdiklerini, CA3 piramidal nöronları ve girus dentatusun granül hücrelerinin ise canlı kaldığını göstermiştir (71, 72, 73). Ancak sinir hücrelerinin iskemiye olan duyarlılık farklılıkları ve seçici gecikmiş nöronal hasar mekanizmaları yoğun olarak araştırılmasına rağmen henüz tam olarak açıklanamamıştır (73).

Beyin iskemisi nöronlarda çeşitli yapısal değişikliklere de yol açar. Yapılan elektron mikroskop çalışmalarda iskemi sonrasında hipokampus nöronlarındaki Golgi aygıtı ve düz endoplazmik retikulum organellerinde azalmalara, poliribozomlar da ayrılmalara, mitokondrilerde geçici olsa da şişkinliklere neden olduğunu göstermektedir. Bu hücrelerin iskemik hasardan kurtulmalarının ise düz endoplazmik retikulumun artışı ile ilişkili olduğu ileri sürülmektedir (74). İskemi, hipokampus hücrelerinde şişkinliğe ve ekstraselüler sıvının dramatik bir şekilde azalmasına neden olur (75, 76, 77).

Uzun bir süre yetişkin memelilerinde MSS'nin kendini tamir ya da rejenerasyon yeteneğinin olmadığına inanılıyordu (9). Son zamanlardaki çalışmalarda ise yetişkin MSS'nin yeni glia ve nöron üretme yeteneği olduğunu ortaya koymaktadır (10, 11). Ayrıca yapılan çalışmalar kendini yenileme ve multipotent özellikleri ile tanımlanan sinir kök hücrelerinin



insanları da içine alan çeşitli memeli türlerinde yaşam boyunca var olduğunu göstermektedir (10, 11).

Normal yetişkin beyninin birçok yerindeki nöronlar, hücre ölümü sonrasında yenilenmez. Fakat kendi kendini yenileyen kök hücreleri farklı beyin bölgelerinde vardır. Bu bölgelerden en iyi tanımlananları hipokampusun girus dentatusu ve lateral ventriküllerin subventriküler bölgesine yakın olan subependimal katmandır (12, 78). İskemik beyin hasarı, iyileşmesiyle bağlantısı olan hücre sel ve moleküler yenileme mekanizmalarını tetikler. Bir başka ifadeyle iskemik hasarın kendisi yetişkin beyin nörogenezisini tetikler (79). Tüm bunlardan inme sonrası iyileşmeye bağlı adaptasyon sürecinde, nörogenezisin iskemi için önemli olduğu sonucu da çıkarılabilir. Nörogenezis yetişkin memeli beyninde patolojik ve psikolojik olaylar ile başlayabilir ve devamlılığı sağlanabilir (3). Ayrıca nörogenezisin iyi tanımlandığı bölgelerden biri olması nedeniyle iskemi sonrası sinir hasarı CA1 hipokampal alanında piramidal hücre kaybı ölçülerek değerlendirilir (78).

### 2.2.5. Serebral İskemide Deneysel Hayvan Modelleri

Kaynaklar incelendiğinde kedi, tavşan, köpek ve insan dışı primatların beyin iskemisi ile ilgili deneysel çalışmalarda kullanıldığı, ancak çalışmaların çoğunun kemirgenler ile yapıldığı görülmektedir. Beynin vasküler anatomisinin insan ve kemirgenler arasında diğer canlı gruplarına göre daha fazla benzerlikler göstermesi bu seçimin nedenini de açıklamaktadır. Çalışmalarda kemirgenlerin tercih edilmesinin bir çok pragmatik sebepleri de vardır. Buna ilaveten sosyal ve etik olarak kabul edilmesi, düşük maliyet ve hayvanların geldiği soyların bilinmesi nedeniyle grup içi değişikliklerin daha az olması sıçan ve fare gibi kemirgenlerin tercih edilmesine neden olmaktadır.

1980'li yıllarda sıçan ve fare gibi kemirgenlerde global iskeminin üç farklı modeli uygulanmış ve bu üç model günümüzde de kullanılmaktadır. Bunlar, dört damar tıkanıklığı modeli, iki damar tıkanıklığı ile birlikte uygulanan hipotansiyon modeli ve her iki karotis arterin geçici tıkanıklığı ile oluşturulan iskemi modelidir.

**1) Dört damar tıkanıklığı modeli:** Vertebral arterlerin kalıcı tıkanması ve karotis arterlerin 10–30 dk. geçici klemplenmesiyle oluşturulan iskemi (72).

**2) İki damar tıkanıklığı ile birlikte uygulanan hipotansiyon modeli:** Her iki karotis geçici oklüzyonu ve eş zamanlı arteriyel hipotansiyon oluşturulması ile meydana gelen iskemi (80).

**3) Her iki karotis arterin geçici tıkanıklığı ile oluşturulan iskemi:** Global serebral iskemi oluşturmak için karotis arterlerin klemplenerek kan akımının kesilmesi (71, 81).

### **2.3. Etil Piruvat**

#### **2.3.1. Etil Piruvatın Farmakolojik Özellikleri**

Pirüvat, 2-oxopropionat'ın ( $\text{CH}_3\text{COCO}_2\text{H}$ ) genel kullanımdaki adıdır. Pirüvat, pirüvatkinaz enziminin katalizlediği glikolitik yolun son ürünüdür (82, 83). Pirüvatın kararlı bir türevi (13) olan EP, 2-karbon alkol, etanol ile pirüvik asitin yoğunlaşması sonucu şekillenen lipofilik ester türevidir. Oysa pirüvat bir monokarboksilik den meydana gelen anyoniktir (84, 85). Etil pirüvat, kalsiyum ve potasyum içeren dengeli bir tuz solüsyonudur (13). Kaynaklarda Ringer laktat gibi kalsiyum ve potasyum içeren bir solüsyon içerisinde hazırlanan EP'nin bozulmadan ve etkinliğini kaybetmeden deney hayvanlarına uygulanabildiği gösterilmiştir (82, 83). Hayvanlarda EP tedavi edici dozu 40mg/kg'dır (83).

#### **2.3.2. Etil Piruvatın Merkezi Sinir Sistemi Üzerine Etkisi**

Pirüvatın hücre içinde antioksidan etkisi olduğu bilinmektedir. Etil pirüvat ise umut veren antioksidan ve antiinflamatuvar bir ajandır (82, 83). Hem pirüvat hemde EP'nin primer kortikal kültür de oksijen-glikoz yoksunluğu ya da hidrojen peroksit ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) varlığı sırasında nöroprotektif etkiye sahip olduğu da gösterilmiştir. Etil pirüvat geniş bir terapötik ve güçlü bir koruyucu etkiye sahiptir. Bu koruyucu etkisi onun antiinflamatuvar etkisiyle de ilişkilidir (13). Etil pirüvat antiinflamatuvar etkisi sayesinde hipokampusda nöron ölümünü azaltır (86).

Pirüvat, oksidatif stres oluşturulan hayvan modellerinde yararlı etkileri olan bir endojen antioksidandır. Etil pirüvat ise antioksidan eylem yoluyla iskeminin hasara uğrattığı organ sistemindeki hemorajik hasarı ve endotoksik şoku kısmen azaltır (87). Pirüvat sıçanlarda geçici genel beyin iskemisini takiben hipokampus CA1 nöron hasarlarına karşı koruma sağlar (88). Fakat geçici iskemi olaylarında pirüvatın nöroprotektif etkisi belirli bir bölgeyle sınırlıdır ve kalıcı iskemideki nöroprotektif etkisi tam olarak açıklanamamıştır (13). Bununla birlikte EP'nin yetişkin sıçanlarda serebral arter tıkanıklığı sonrasında nöroprotektif etkisi olduğunu gösteren çalışmalar vardır (13, 14, 84).

Piruvat, glikoz metabolizmasında orta ve güçlü bir ROS temizleyicisi gibi rol oynar. Oksidatif strese karşı pirüvatın koruyucu etkisi nöronlarda dahil olmak üzere çeşitli dokularda gösterilmiştir (89, 90). Fakat bu etkinliğine rağmen henüz terapötik bir ajan olarak kullanılması sınırlıdır (91).

Etil pirüvatın mezenterik iskemide, iskemi sonrası reperfüzyona bağlı epitelyal hasar ve oksidatif stresten koruyucu etkisi az da olsa rapor edilmiştir (13). Buna ek olarak, EP'nin sitokinlerin ekspresyonu ve proinflamatuvar gen regülasyonu üzerinde de doğrudan yararlı etkileri olduğu görülmektedir. Etil pirüvat bir gıda katkı maddesi olarak da kullanılmaktadır (87). Ayrıca EP'nin sistematik inflamasyon ve ölümcül sepsislerden ölümleri önlediği son zamanlarda yapılan deneysel çalışmalarda da rapor edilmiştir (13).

#### **2.4. Nöron Sayısı Hesaplama Yöntemleri**

Klasik olarak herhangi bir yapı ya da doku içindeki hücre veya hücre içi elemanlarının sayısını bulmak için ilgilenilen yapıdan araştırmacının belirlediği sayıda kesitler alınır ve kesitler üzerinde değişik yöntemler kullanılarak mikroskop altında hesaplama yapılır (92). Bu tür çalışmalarda doku kesitlerinde derinlik boyutu göz ardı edildiğinden, ilgilenilen objelerle ilgili veriler ancak objelerin kesitteki iki boyutlu izdüşümlerine aittir. Bu nedenle obje sayısı ile onun iki boyutlu kesit düzlemindeki izdüşümlerinin sayısı arasında doğrudan kurulacak bir ilişki çoğu zaman güvenilir sonuçlar vermeyecektir. Buna karşılık son zamanlarda ilgilenilen objeleri üç boyutlu olarak değerlendiren yöntemler de geliştirilmeye başlanmıştır. Bu yöntemlerden birisi de “disektör” yöntemidir. Disektör modern tabanlı stereolojik yöntemlerden biridir ve bu yöntem sayesinde yapıların derinlik boyutu göz önüne alınarak sayısal veriler elde edilir (92).

Modern tabanlı stereolojik yöntemlerin kullanıldığı çalışmalar incelendiğinde sinaps ve nöron sayısı gibi verilerin elde edildiği ve çoğu uygulamada disektör yönteminin kullanıldığı görülmektedir (19, 20, 21). Disektör yönteminin fiziksel disektör ve optik disektör olmak üzere iki farklı uygulama şekli vardır. Her iki yöntem kullanılarak da nöron sayısı hesaplanabilir. Memeliler ve kuşların MSS ve periferik sinir sistemi nöronları, gliaları ve diğer hücrelerinin sayısal hesaplamalarında sıklıkla optik disektör kullanılmıştır (93). Bununla birlikte nöron hesaplamasında modern stereolojik yöntemlerden olan parçalama yöntemi de kullanılmaktadır. Parçalama yöntemi, optik parçalama ve fiziksel parçalama yöntemleri olmak üzere iki farklı şekilde uygulanabilir (17).

## 2.5. Stereolojik Yöntemler

Stereoloji, gerçekte üç boyutlu olan herhangi bir yapının iki boyutlu görüntülerinden yola çıkarak, onların üç boyutlu özellikleri ile ilgili yorumlar yapılmasını ve veriler elde edilmesini sağlayan bilim dalının adıdır. Biyolojik yapılarla ilgili çalışmalarda eğer dokuyu elde etmek mümkün ise uygun histolojik yöntemler kullanılarak dokudan kesitler elde edilmesi, kesitlerin boyanması ve elde edilen bu kesitler üzerinde stereolojik çalışma yapılması mümkündür (18, 93).

Kesitler, herhangi bir yapının içinden geçen ve yapının bileşenleri ile kesişen iki boyutlu düzlemler olarak düşünülürse, her bileşen bu kesitlerde sayısı, büyüklüğü, uzunluğu, kapladığı alan ve hacim oranıyla ilişkili bir biçimde izdüşümler oluşturur. Bu izdüşümler de yapının içerdiği bileşenler hakkında bilgi edinmek üzere kullanılır. Fakat yapının içinde bulunan bileşenlerin kesitlerde ortaya çıkan izdüşümleri sadece ait oldukları yapıların, kesit düzlemi üzerindeki temsillerinden ibarettirler. Dolayısıyla, bu izdüşümlerden yola çıkarak doğrudan yorumlar yapmak, bunların ait oldukları bileşenlerin üç boyutlu özelliklerine ait gerçek verilerin elde olmamasından dolayı oldukça yanıltıcı olabilmektedir (18).

Modern stereolojik yöntemler kullanılarak sadece iki boyut değil üçüncü boyutta değerlendirilmeye dahil edildiğinden gerçek değere daha yakın veriler elde edilir. Ancak stereolojik yöntemlerin kullanımında uyulması gereken önemli kurallar vardır. Bunların en önemlilerinden bazıları tarafsızlık, etkinlik, sistematik rastgele örnekleme ve ön çalışmadır (18, 93).

### 2.5.1. Stereolojide Tarafsızlık ve Etkinlik Kavramları

Stereoloji bir yöntemler bütünüdür ve bu yöntemlerin en önemli özelliği tarafsız ve etkin yöntemler olmalarıdır (93). Stereolojik yöntemlerin diğerlerinden en önemli farkı budur. Stereolojik yöntemler geliştirilmeden önce uygulanan yöntemlerde birçok ön kabul yapılarak sonuca ulaşılmaya çalışılırdı (94). Bunlara örnek olarak tüm hücrelerin küre şeklinde olduğunun varsayılması ya da ilgilenilen yapıların düz bir yüzeye sahip olduğu ön kabulü verilebilir (18).

Tarafsızlık, stereolojik yöntemlerin doğru bir şekilde uygulanması ile ortaya çıkan önemli bir kavramdır. Tarafsızlık kavramının özünü, çalışmaya başlamadan önce, çalışma sırasında ve sonrasında yapıların geometrik özellikleri hakkında herhangi bir ön kabul

yapılmaması ve yapının her noktasına eşit örnekleme şansının tanınması oluşturmaktadır (95). Stereolojide tarafsızlık prensibinin uygulanması, tekrarlayan ölçümler sonucu, gittikçe gerçek değere yaklaşan, bir başka ifadeyle gerçek değerden sistematik bir sapma göstermeyen veriler elde edilmesini sağlar (61).

Stereolojideki bir diğer önemli prensip de etkinlik prensibidir. Etkinlik, sadece gerektiği kadar birey ve örnek kullanarak, yeterli doğrulukta ve daha az değişkenlik gösteren sonuçların nispeten kısa bir zaman diliminde elde edilmesinin sağlanmasıdır (96). Etkinlik prensibi çalışmalarda kısa zamanda güvenilir sonuca ulaşmak olarak da özetlenebilir (61).

### **2.5.2. Stereolojide Sistematik Rastgele Örnekleme**

Biyolojik materyallerde sağlıklı ölçüm ve değerlendirmenin yapılabilmesi için temel ve vazgeçilmez şartlardan birisi de örnekleme doğru olarak yapılmasıdır. Yaptığımız çalışmaya bağlı olarak, ilgilenilen yapının tamamında ölçüm yapmak her zaman mümkün olmayabilir. Bu gibi durumlarda zaman ve ekonomik kayıpları en az seviyeye indirmek için, yapıdan sistematik ve rastgele örnekleme yaparak hesaplama yapmak en doğru olanıdır. Örneğin sayıları milyonlarla ifade edilen beyin dokusu içerisindeki nöronların tamamını saymak yerine, beynin tarafsız ve etkin biçimde sistematik ve rastgele örnekleme yapılarak elde edilen kesitler üzerinde sayımlarını yapmak çoğu zaman yeterli olacaktır (16, 92).

Sistematik rastgele örnekleme tarafsız ve etkin bir örnekleme modelidir. Bu model, ilgilenilen yapılarda bir örnekleme yapılacağı zaman, örnekleme sonucu elde edilecek kesitlerin tüm yapıyı temsil edebilmesini sağlar. Sistematik rastgele örnekleme incelenecek yapının tamamına eşit olasılıkla incelenme şansı verilmesi temeline dayanmaktadır. Stereolojik çalışmalarda doğru sonuca ulaşma şartlarından en önemlisi, işlemlerin her aşamasında sistematik rastgele örnekleme koşuluna bağlıdır. Burada “sistematik” sözcüğü ile örnekleme tekrar edilen periyodu, “rastgele” sözcüğü ile ön çalışmada belirlenen periyodun tesadüfi bir biçimde seçilmesi anlatılmaktadır (16, 92).

### **2.5.3. Stereolojide Ön Çalışma**

Stereolojide yapılan çalışmalarda kullanılması gereken örnekleme planının öncelikli olarak bir ön çalışma ile ortaya konması önemlidir. Ön çalışma ile kabul edilebilir hata miktarına göre ne sıklıkta bir örnekleme yapılması gerektiği saptanır ve örnekleme planı

çalışmadaki tüm bireyler için aynı şekilde uygulanır. Ayrıca bu plan daha sonra yapılacak benzer stereolojik çalışmalar için de kullanılabilir. Ön çalışma biraz deneme yanılma yöntemi olarak da ifade edilebilir. Ön çalışmada birkaç hayvan üzerinde yapılacak değişik sıklıktaki örnekleme, istatistiksel analizlere tabi tutularak en uygun örnekleme şeması belirlenir ve bu şema daha sonra tüm çalışmalara aynen uygulanır (96).

Yapılacak istatistiksel analizlerin başında çalışmanın toplam hata miktarının hesaplanması gelir. Örnekleme ile çalışılan bir ölçüm yönteminde gerçekte belli bir miktar hata payı olacaktır. Hata miktarı, yapılan örnekleme miktarına göre değişir. Çok fazla sayıda örnek alınan sık bir örnekleme üzerinden yapılan hesaplamalar daha düşük hata miktarına sahip olurken, daha seyrek ve az örnek alınarak yapılan çalışmalarda hata miktarı daha fazla olacaktır. Bir çalışmadaki hata miktarı, hata kat sayısı (coefficient of error) ile belirlenir. Genellikle 0,05 değerinin altında bir hata katsayısı stereolojik bir çalışmanın güvenilirliği için yeterli kabul edilir (16, 97, 98). Hata katsayısının 0,05 değerinin altında ya da bu değerde tutabilmek için çoğu zaman bir grupta en az 5 hayvanın olması gerekir (16).

Çalışılan birey sayısını artırmak ebettteki gerçek değere daha fazla yaklaşmayı sağlayacaktır, fakat çok fazla sayıda bireyde çalışmak, stereolojinin etkinlik prensibine uymadığı gibi daha fazla deney hayvanı kullanılmasını gerektiğinden çoğu zaman tercih edilmemelidir. Yapılan çalışmalarda hiçbir zaman hata kat sayısı sıfır'a indirilemez. Çünkü canlılar arasında biyolojik değişkenlik vardır. Çalışılacak gruptaki birey sayısı ne kadar arttırılırsa arttırılsın, biyolojik yani canlılar arasındaki yapısal değişkenlikten ve sayısal farklılıklardan kaynaklanan hesaplama hatasını belli bir sabit değer altına indirmek olanaksızdır (16).

Biyolojik değişkenliğin hata payına katkısı, çalışılan canlıya göre de değişir. Örneğin sıçan, fare ve civciv gibi deney hayvanları ile yapılan çalışmalarda istenilen hata katsayısı 5 adet hayvanın çalışmaya dâhil edilmesi ile sağlanabilir. Çünkü bu hayvanlarda bireyler arasındaki biyolojik değişkenlik azdır. Aynı hata katsayısı değerini insan örneklerinden elde edebilmek için ise en az 25 üzerinde çalışmak gereklidir (99). Dolayısıyla, yapılan her çalışma belli bir hata katsayısı sınırı içinde gerçekleştirilecek ve bu sınırlar içinde elde edilen veriler araştırmacı için yeterli güvenlikte olacaktır (96).

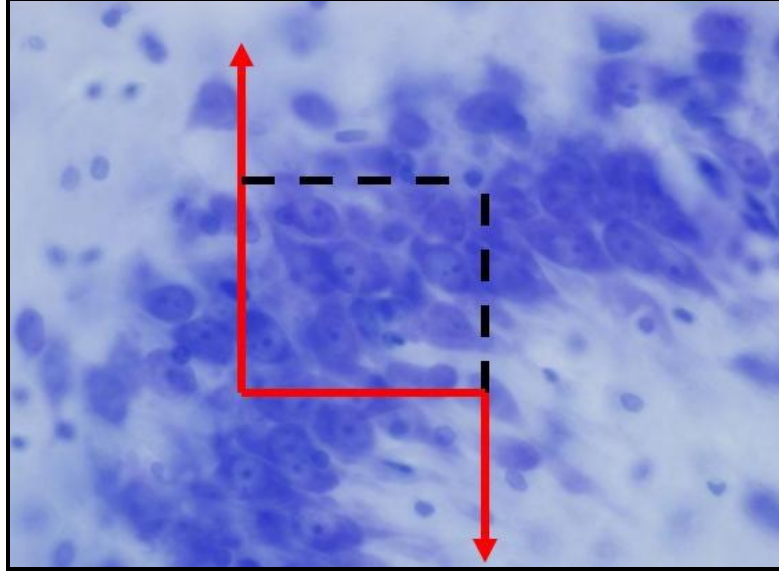
#### 2.5.4. Stereolojide Boyut ve Sonda Kavramı

Stereolojide iki boyutlu düzlemde çalışılacak yapıların üç boyutlu şeklinin yorumunu yapabilmek için bazı noktalara dikkat edilmesi gerekmektedir. Kesitlerde gerçekte üç boyutlu olan yapıların, iki boyutlu düzlemdeki izdüşümlerinden yola çıkarak sonuç elde edilmeye çalışılır. Ancak sayı, uzunluk ve hacim gibi parametreleri üç boyutlu ortamda buldukları şekilde iki boyutlu ortamda gözlemek mümkün değildir. Gerçekte uzunluk bir, alan iki, hacim üç boyutlu, nokta ise boyutsuzdur. Bu boyutlara sahip yapılar iki boyutlu kesit düzlemlerinde boyut azalmasına uğrarlar. Bir başka ifade ile gerçekte uzunluk şeklinde olan yapı kesit düzleminde nokta (0 boyutlu), alan çizgi (1 boyutlu), hacim düzlem (2 boyutlu) şeklinde izlenir (18, 61, 92).

Boyut kavramıyla yakından ilgili diğer bir terim ise sonda'dır. Sonda, ilgilenilen yapıya, elde edilmek istenen veriye bağlı olarak sorulan geometrik sorular olarak tanımlanabilir. Stereolojik sondalar, bir, iki ve üç boyutlu olabilirler. Bir yüzey üzerindeki belli bir alanı sınırlandırmak, burada ölçümler yapmak, iki boyutlu sondaya örnek olarak verilebilir. Kural olarak incelenecek yapının boyutu ve sonda boyutunun toplamı üç olmalıdır. Bir başka deyişle tek boyutlu uzunluk iki boyutlu düzlem sondası, iki boyutlu alan tek boyutlu çizgi sondası, üç boyutlu hacim ise boyutsuz nokta sondası ve boyutsuz tanecik sayısı üç boyutlu disektör hacim sondası ile çalışılmalıdır (18, 61, 92, 100).

#### 2.5.5. Tarafsız Sayım Çerçevesi

Stereolojide tarafsız sayım çerçevesi sayılabilir yapılar hücre, çekirdek, glomerül gibi genel olarak tanecik olarak tanımlanır. Tanecik sayısının tarafsız bir şekilde hesaplanabilmesi için sayım çerçevesinin ve sayımda kullanılan kuralların önemi büyüktür. Sayım çerçeveleri arasında bilinen en tarafsız kurallara sahip olanı tarafsız sayım çerçevesidir. Tarafsız sayım çerçevesini 1977 yılında Gundersen tanımlamıştır (101). Tarafsız sayım çerçevesi, komşu iki kenarı serbest, diğer komşu iki kenarı yasak olan ve bu yasak kenarların uzantılarının sonsuza doğru uzandığı bir dörtgen veya karedir (Şekil 2) (100, 101).



**Şekil 2.** Tarafsız Sayım Çerçevesi

Tarafsız sayım çerçevesinde bir taneciğin sayım sırasında yalnızca bir defa sayılabilmesi için iki boyutlu kesit düzleminde uygulanan bir takım sayım kuralları vardır. Bu kurallar şu şekilde özetlenebilir (100, 101).

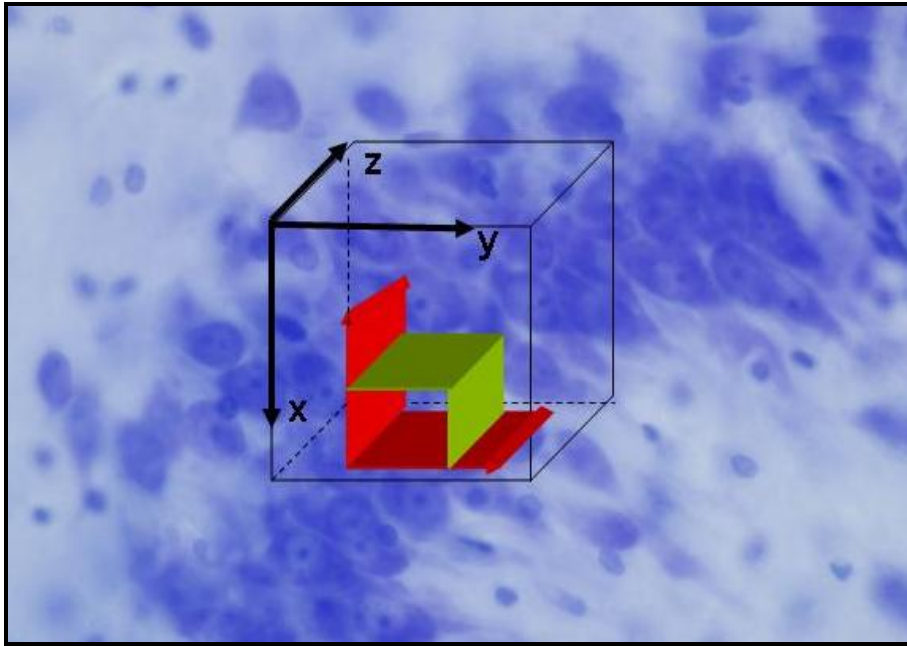
- 1) İzdüşümleri tamamen sayım çerçevesi içerisinde kalan yani herhangi bir kenar ve köşeyle kesişmeyen tanecikler sayıma dâhil edilir.
- 2) Çerçevenin yasak kenarları olarak tanımlanan kenarlar ile kesişen izdüşümler sayılmaz.
- 3) Serbest kenar ile temas eden tanecik izdüşümleri sayıma dahil edilir.
- 4) Çerçevenin yasak kenarlarının uzantıları ile herhangi bir şekilde kesişen izdüşümlerde sayıma dahil edilmezler.

### **2.5.6. Fiziksel ve Optik Disektör**

Nöron sayısı hesaplamalarında sıklıkla kullanılan disektör metodu, stereolojik yöntemlerden birisidir ve modern anlamda ilk defa 1984 yılında Sterio tarafından geliştirilerek yeniden tanımlanmıştır (15). Bu metotla doku ya da organ içerisindeki tanecik sayısı, kesitlerin alınma yönü, sayılacak olan taneciğin büyüklüğü, doku içindeki yönelimi ve dokunun histolojik işlemler sırasında büzüşme ve genişlemesi gibi hesaplama hatalarına sebep olabilen tüm hata kaynaklarından bağımsız olarak, tarafsız bir biçimde hesaplanabilmektedir (15). Disektör bilinen bir  $t$  mesafesi ile birbirinden ayrılmış iki kesik düzlemden oluşan ve üç



boyutlu bir hacimde sayı parametresinin hesaplanmasına imkân veren bir yöntemdir (100). Bu metodun temelini iki boyutlu, iki ardışık kesit düzleminin birlikte değerlendirilmesiyle oluşturulan üç boyutlu bir sorgulama aracı diye de tanımlanan üç boyutlu sonda oluşturmaktadır (Şekil 3), (92).



**Şekil 3.** Disektör Yönteminin Esası Olan Disektör Sondasının Şematik Gösterimi

Disektör metodu kullanılarak yapının tamamının değerlendirilmesine gerek kalmadan, alınan kesitler vasıtasıyla biyolojik ortamlardaki sayısal çoklukların hesaplanmasında doğru ve tarafsız sonuçlara ulaşılabildiği Degroot ve Bierman tarafından pratik uygulamalarıyla gösterilmiştir (102). Disektör yönteminin uygulanması için iki ayrı kesit gerekmektedir. Bu kesitlerden biri “örnek” diğeri “gözlem” kesiti olarak adlandırılır. Kesitler üzerinde yapılacak sayımlarda dikkat edilmesi gereken en önemli nokta birinde gözüken ancak diğeriinde gözükmeyen taneciklerin sayılmasıdır. Diğer bir husus ise kesitler alınırken “sistemik rastgele örnekleme” ile kesitlerin alınmasıdır (100).

Disektör yönteminin optik ve fiziksel disektör olmak üzere iki tipi vardır. Fiziksel disektör, tanecik sayımı için kullanılan temel stereolojik yöntemlerden birisidir (15). Aralarında belli bir mesafe olan iki ardışık kesitin fiziksel olarak karşılaştırılmasını içerir. Fiziksel disektör yönteminin temel mantığı, sayılmak istenen taneciklerin “uçlarını” saymak

olarak özetlenebilir. Taneciklerin herhangi bir yöndeki uçları sayıldığında, elde edilen sayı, tanecik sayısına eşit olacaktır (100).

Optik disektör ise sanal olarak mikroskop altında oluşturulmuş üç boyutlu sayım kutucuklarında uygulanır. Üç boyutlu sanal sayım kutucukları, tarafsız sayım çerçevesinin üç boyutlu eşdeğeri olarak da düşünülebilir. Tarafsız sayım çerçevesi, sanal olarak doku kesiti içerisinde ilerletilir ve üç boyutlu sanal bir optik disektör sondası oluşturularak sayım gerçekleştirilir. Bu sonda ile yapılacak sayımın kuralları ise iki boyutlu tarafsız sayım çerçevesinin sayım kurallarının, üç boyuta aktarılmış halidir (100).

### 2.5.7. Fiziksel ve Optik Parçalama

Nöron sayısı hesaplamalarında sıklıkla kullanılan bir diğer stereolojik yöntemde parçalama yöntemidir. Parçalama, ilgilenilen yapıdaki sayı, uzunluk, yüzey alanı gibi herhangi bir niceliğin tüm yapıdaki toplam değerini bulmak amacıyla kullanılır. Parçalama temel olarak, bir yapıyı küçük parçalarına ayırarak, bu parçalarda tanecik sayımı yapma esasına dayanır. Aslında tek başına bir sayım yöntemi olmayıp, istatistiksel bir örnekleme biçimi ile bir ölçüm yönteminin bileşkesi olarak tarif edilebilir. Stereolojik yöntemler arasında en pratik ve basit olanıdır. Parçalama, dokuya uygulanan histolojik işlemlerden, dokunun şişme, büzüşme gibi yapısal değişimlerden, kesit alma sırasındaki zedelenme ve hacim değişimlerinden bağımsızdır. Bir başka ifadeyle bu değişkenler çalışma sonucunu etkilemez. Ayrıca, çalışılan yapı, organ ve taneciklerle ilgili hiçbir ön bilgiye veya kabule gereksinim yoktur (96, 103, 104).

Sistematik rastgele örnekleme, parçalama yönteminin örnekleme stratejisini oluşturur. Genel olarak bakıldığında, parçalama aslında bir örnekleme biçimi olup güvenilirliğini tamamen sistematik rastgele örnekleme sisteminin ispatlanmış güvenilirliğinden almaktadır (16). Parçalama metodunda herhangi bir taneciğin örneklenmesi yani sayılması ihtimali, sadece o taneciğin fiziksel varlığına bağlıdır. Görünen tüm tanecikler sayılır (103). Parçalamada tanecik sayısı, aşağıda verilen formül kullanılarak elde edilir (96).

$$N \text{ hesap} = \sum Q \times (1/f_1) \times (1/f_2) \times (1/f_3) \times (1/f_4) \times (1/f_5)$$

Bu formülde N hesap hesaplama ile bulunan toplam tanecik sayısını,  $\sum Q$  toplam disektör taneciği sayısını, f ise parçalama katsayısını ifade etmektedir.

Parçalama metodunun fiziksel parçalama (103) ve optik parçalama (17) olmak üzere iki farklı uygulanma şekli vardır. Her iki yöntemde temelde aynı mantığı içerir. Ancak uygulamada bazı farklılıkları mevcuttur (96).

Fiziksel parçalama, parçalamanın ilk uygulanan biçimidir. Belli bir örnekleme şeması ile elde edilen doku parçalarında, fiziksel disektör metodu aracılığıyla tanecik sayımı yapılması ve buradan toplam tanecik sayısının hesaplanmasına dayanır (96). Mikroskopik bir çalışmada, örneğin hücre sayımı yapabilmek için çalışılabilecek tek örnek, kesit adını verdiğimiz ince doku dilimleridir. Bu dilimlerin kalınlıkları 2–60 µm arasında değişebilir. Bazı durumlarda daha fazla kalınlıkta kesitlerde gerekebilir. Dolayısıyla, çalıştığımız yapı ne olursa olsun, tanecik sayımı yapmak için önce onu uygun kalınlıkta kesitler haline getirmeliyiz. Ancak, bir koyun beyninde bulunan toplam nöron sayısını veya insan karaciğerindeki toplam hepatosit sayısını belirlemeye çalıştığımızı düşünürsek, bu denli büyük yapıların başından sonuna kadar histolojik kesitlere ayrılması zordur. Bundan dolayı, toplam tanecik sayısını hesaplamak için yapılması gereken organı daha küçük parçalara ayırmaktır. Organ öyle parçalara ayrılmalı ve bunların arasından öyle parçalar seçilmeli ki, bu parçalar hem çalışılabilecek boyutlarda olmalı, hem de tüm organı mümkün olduğunca tarafsız bir şekilde temsil edebilmelidir. Bu gibi çalışmalarda organ veya yapının tüm bölümlerinin eşit ihtimallikle örneklenmesi ancak sistematik rastgele örnekleme ile sağlanabilir (16, 96, 97, 98).

Optik parçalama yöntemi, uygulama kolaylığı sebebiyle en çok tercih edilen tanecik örnekleme ve sayım yöntemidir. Optik disektörün uygulanmaya başlamasından sonra kendiliğinden ortaya çıkmıştır. Optik parçalama kısaca, basamaklı örneklemeyle elde edilen ve tüm yapıya olan oranı (parçalama oranı) bilinen örnekler üzerinde, optik disektörler ile tanecikleri örnekleme. Uygulanması, fiziksel parçalamaya göre çok daha kolaydır ve daha az zaman alan bir metottur. Bu kolaylık, optik disektör uygulamasının sağladığı kolaylıklardan kaynaklanmaktadır. İki ayrı fiziksel kesitin karşılaştırılması zorunluluğu bulunmadığından, çok daha yaygın olarak kullanılan bir metottur. Özellikle sinir sistemi ile ilgili çalışmalarda yaygın olarak kullanılan optik parçalama, bazı durumlarda, fiziksel parçalamada olduğu gibi uygulanmamaktadır. Kalın kesitlerin alınamaması, kesitlere boya nüfuzunda zorluk, büyük yapıların söz konusu olduğu çalışmalar gibi durumlarda, fiziksel parçalama kullanılması bir zorunluluktur (16, 96, 97, 98).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Deneysel Çalışma Süreci

##### 3.1.1. Sıçanların Temini ve Bakımı

Çalışmaya Karadeniz Teknik Üniversitesi (KTÜ) Tıp Fakültesi, Hayvan Deneyle Yel Etik Kurul onayı alınarak başlandı. Çalışmada 16 haftalık, Sprague Dawley türü, 30 adet diş sıçan kullanıldı. Sıçanlar KTÜ Tıp Fakültesi Cerrahi Araştırma Merkezi'nden satın alındı.

Çalışma süresince sıçanların bakımı, beslenme ve barınması KTÜ Tıp Fakültesi Cerrahi Araştırma Merkezi'nde bulunan sıçan takip odalarında sağlandı. Dene için kullanılan sıçanlar Cerrahi Araştırma Merkez'inden temin edildiği için çevre stresi ve uyum problemi yaşanmadı. Hayvan bakımı ve uygun fiziki ortamın sağlanması için KTÜ Tıp Fakültesi Cerrahi Araştırma Merkez'inde çalışan veteriner ve teknikerlerden yardım alındı. Sıçanların barındırıldığı odaların ısısı  $22\pm 2$  °C olacak şekilde ayarlandı ve ısı sürekli olarak oda termometresi ile kontrol edildi. Işık 12 saat açık, 12 saat kapalı olacak şekilde otomatik ayarlandı. Sıçanların beslenmesinde standart sıçan yemi ve su ihtiyaçlarını gidermek için de musluk suyu kullanıldı.

Çalışmada sıçanların barındırılması amacıyla standart Tip III sıçan kafesleri kullanıldı. Kontrol grubu sıçanlar hariç diğer gruplara ait sıçanlar birbirinden ayrı takip edildi. Bu amaç için her kafes ortadan ikiye bölündü ve sıçanların birbiri ile temas etmeden barınması için uygun hale getirildi. Her iki bölmeye de su şişesi kondu. Ayrıca bölmenin ortasına iki sıçanında ulaşabileceği şekilde yemler konuldu. Herhangi bir müdahale yapılmayan kontrol grubu sıçanların tamamı aynı kafeste barındırıldı ve tüm sıçanların ulaşabileceği yere su ve yem bırakıldı. Sıçanların bulunduğu ortamın temiz olması için kafeslere talaş serildi. Tüm gruplara ait sıçanlar çalışma süresince aynı odada takip edildi (Şekil 4. A, B, C ).



**Şekil 4.** (A) İkili Sıçanların Takip Edildiği Kafes, (B) Kontrol Grubu Sıçanların Takip Edildiği Kafes, (C) Sıçanların Takip Odası.

### 3.1.2. Grupların Özellikleri ve Çalışma Süresince Takibi

Çalışmaya 16 haftalık, Sprague Dawley türü dişi sıçanlar dahil edildi. Çalışmada toplam 30 sıçan kullanıldı ve her biri altı sıçandan oluşan toplam beş grup oluşturuldu. Çalışmanın başlangıcında grupları oluşturan sıçanlar rastgele seçildi. Oluşturulan kontrol ve deney gruplarının özellikleri Tablo 1’ de verilmiştir.

**Tablo 1.** Çalışma Grupları ve Özellikleri

Gruplar (n=5)	Grupların Özellikleri ve Yapılan Müdahaleler
I	Herhangi bir müdahale yapılmayan kontrol grubu sıçanlar
II	30 dk iskemi uygulanan sıçanlar
III	30 dk iskemi uygulanan ve iskemi sonrası 10 gün boyunca EP uygulanan sıçanlar
IV	Boynuna kesi yapıp dikilen ve kesi sonrası 10 gün boyunca EP uygulanan sham grubu sıçanlar
V	Boynuna kesi yapıp dikilen ve kesi sonrası 10 gün boyunca ringer laktat uygulanan sham grubu sıçanlar

Çalışmaya başlamadan önce gruplardaki sıçanların tamamı tartılarak ağırlıkları tespit edildi. Aynı şekilde çalışma süresince her gün sıçanlar tartılarak düzenli kilo takipleri yapıldı. I. Grup hariç diğer tüm gruplardaki sıçanlar, 2 sıçan bulundurma kapasitesi olan kafeslere yerleştirildi ve ayrı ayrı takip edildi. Kafeslerin üzerine bir etiket yapıştırılarak etiket üzerine, sıçanların ait oldukları grup numaraları, kiloları ve çalışmaya başlama tarihi yazıldı. I. Grupta ki 6 sıçan aynı kafese yerleştirildi. Bu grup sıçanların numaraları ise etiketle kuyruklarına yapıştırıldı. Grup numaraları, kiloları ve çalışmaya başlama tarihi ise yine aynı şekilde kafes üzerine yapıştırılan etiket üzerine yazıldı (Şekil 4. A, B, C).

I. Grup herhangi bir uygulama yapılmadı. Kontrol grubu olarak belirlendi. II. ve III. Gruplarda bulunan sıçanlara 30 dakika süre ile iskemi oluşturuldu. II. Gruba iskemi sonrası herhangi bir uygulama yapılmadı. 10 gün boyunca takip edildi. III. Gruba ise iskemi yapıldığı günden başlamak üzere on gün boyunca günde bir kez, aynı saatte, EP (40 mg/kg) intraperitoneal olarak uygulandı. IV. ve V. Gruplarda bulunan sıçanların boyun bölgelerine sadece cilt kesisi yapıldı ve dikildi. IV. Gruba cerrahi müdahaleden hemen sonra başlanmak üzere on gün boyunca günde bir kez, aynı saatte EP (40 mg/kg) intraperitoneal olarak uygulandı. V. Gruba yine cerrahi müdahaleden hemen sonra başlanmak üzere on gün boyunca günde bir kez, aynı saatte ringer laktat (40 mg/kg) intraperitoneal olarak uygulandı.

### 3.1.3. Sıçanlara Yapılan Cerrahi Müdahaleler

İskemi uygulaması ve diğer cerrahi işlemlere başlamadan önce sıçanlara 100 gr sıçana 0,1cc Ketamin ve 0,1 diziye Xylazine olmak üzere intraperitoneal olarak uygulandı. Yaklaşık 10 dk anestezinin etkisini göstermesi beklendi ve daha sonra işleme başlandı. Sıçanlar cerrahi girişim tahtası üzerine sırt üstü pozisyonda ve kafaları ekstansiyonda olacak şekilde yatırıldı. Ayaklarından tespit edildi. Ön boyun bölgesindeki tüyler tıraş edildi ve batikonla temizlendi. Boyun ön bölgesi, orta hattın yaklaşık 2 cm'lik vertikal insizyonla açıldı. Deri dokulara zarar vermeyecek şekilde ekartör yardımı ile yanlara doğru açıldı. İnsizyon bölgesindeki dokulara ve damarlara zarar verilmeden, sağ ve sol internal karotid arterlere ulaşıldı. İnternal karotid arterleri etkin bir şekilde klemplenebilmek için dorsal kısımlarında bulunan boyun derin fasyası, prevertebral boyun kaslarından izole edildi. İskemi ve iskemi+EP gruplarında bulunan sıçanların (II. ve III. Gruplar) her iki damarları aynı anda Yaşargil Anevrizma Klempsi (BA045) ile klemplenerek kan akımı durduruldu. Böylece 30 dk boyunca kan akımı kesilerek iskemi oluşturuldu (Şekil 5. A, B, C, D ). 30 dk süresince açık olan insizyon bölgesi



izotonikle nemlendirilerek kuruması engellendi. Sıçanın solunum ve kalp atımı gibi yaşam bulguları sürekli takip edildi. 30 dk sonunda klempler açıldı. Dolaşım ve etraftaki dokuların pozisyonları kontrol edilerek insizyon bölgesi dikildi. Sham grubu sıçanlara (IV. ve V. Gruplar) ise anestezi uygulandıktan sonra boyun bölgesine yukarıda anlatıldığı şekilde sadece insizyon uygulandı. Kontrol grubuna (I. Grup) ise herhangi bir işlem yapılmadı.

Cerrahi müdahaleler sonrasında sıçanlar 10 gün boyunca takip edildi. Gruplara ait sıçanların tamamı her gün tartıldı ve genel durumları kontrol edilerek not tutuldu. İlaç uygulanan gruplara (III., IV., V. Gruplar) her gün aynı saatlerde (08:00-10:00 arası) intraperitoneal olarak ilaçları uygulandı. Çalışmanın sonunda histolojik işlemler ve stereolojik analizler 30 sıçandan alınan beyin dokuları üzerinde yapıldı.

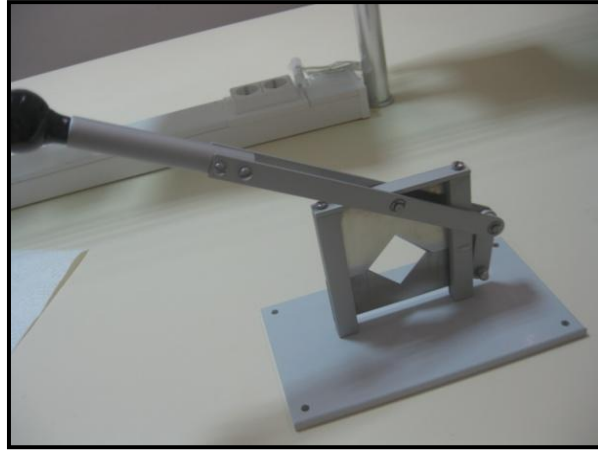


**Şekil 5.** Yaşargil Anevrizma Klempsi (BA045) Kullanılarak, İskemi Oluşturulması. (A) İskemi Bölgesinin Açılması, (B) İskemi Yapılması İçin Damarın Bulunması, (C) Yaşargil Anevrizma Klempinin Takılması, (D) İki Damarda Klemplenerek İskemi Yapılması.

## 3.2. Histolojik İşlemler

### 3.2.1. Dokuların Elde Edilmesi

Çalışma sonucunda 30 sıçana ait beyin dokuları cerrahi müdahaleden sonra 11. günde çıkarıldı. Bu amaç için sıçanlar için özel tasarlanmış giyotin kullanılarak sıçanların kafası kesildi (dekapitasyon) (Şekil 6). Daha sonra makas yardımıyla, kafanın üst kısmının her iki yanından girilerek kafatası kemikleri kesildi ve kafatası kemiği çıkarıldı. Duramaterden ayrılarak beyin dokusu alındı. Beyin dokusunun (beyincik, beyin sapı ve beyin) tamamı ve sadece beyin tartıldı. Elde edilen veriler not edildi. Beynin sağ ve sol yarım küreleri birbirinden ayrılarak daha önce hazırlanan %10'luk formaldehit içerisine kondu.



**Şekil 6.** Sıçanların Kafasının Kesilmesi İçin Özel Olarak Dizayn Edilen Giyotin

Çalışmanın deney aşamaları ve beyin dokularının çıkarılma işlemlerinin tamamı KTÜ Tıp Fakültesi Cerrahi Araştırma Merkezinde bu amaçlar için düzelenmiş hayvan takip ve cerrahi müdahale odalarında gerçekleştirildi.

### 3.2.2. Doku Takibi

Beyin dokularının %10'luk formaldehit içerisine alındıktan sonraki tespit, bloklama, kesit alma ve boyama aşamaları işlemlerinin tamamı KTÜ Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Mikroskopi Laboratuarında, gerçekleştirildi. Beyinler formaldehit



içinde 10 gün bekletilerek tespit edildikten sonra aşağıda verilen sıralama ve sürelerle uyularak alkol, ksilen ve parafin serilerinden geçirildi ve parafin bloklar içerisine gömüldü (61).

1. Akar suda yıkama ..... 1 gece
2. %70'lik alkol..... 1 saat
3. %80'lik alkol..... 1 saat
4. %90'lik alkol..... 1 saat
5. %96'lık alkol..... 1 saat (2 kez)
6. %100'lük alkol..... 1 saat (2 kez)
7. Ksilen ..... 1/2 saat (2 kez)
8. Ksilenden alınan dokular daha önce eritilmiş parafin içine konarak oda sıcaklığında 1 gün bekletildi.
9. Bir sonraki akşam 40 °C etüve kondu ve 1 gece bekletildi.
10. Sabah 60°C'deki etüv içerisindeki parafinde 2 saat bekletildi.
11. Bloklama yapıldı.

### 3.2.3. Kesitlerin Alınması

Stereolojik çalışmalarda kesit kalınlığı ve kesit örnekleme oranı önemli olduğundan, kesit almaya başlamadan önce bu konuyla ilgili yapılan çalışmalar incelenerek çalışmada kullanılacak kesit kalınlığı ve kesit örnekleme oranı tespit edildi. Yapılan literatür taraması sonucunda benzer çalışmalarda 1/7 oranında örnekleme yapıldığı ve 26-40 µm (mikrometre) kalınlığında kesitlerin kullanıldığı tespit edildi (61, 94). Bu nedenle çalışmada 30 µm kalınlığında kranial yönde alınan kesitler 1/7 oranında örnekleme yapılarak lam üzerine alındı.

Çalışma hipokampus bölgesinde yapılacağından kesitler alınırken öncelikle doku hipokampus'a kadar tıraşlandı ve bu aşamaya kadar herhangi bir doku alınmadı. Hipokampus'a ulaşıldıktan sonra kesitler alınmaya başlandı ve hipokampus bitene kadar 1/7 oranında örnekleme yapılarak doku kesilmeye devam edildi. Kesitler kalın olduğu için lama yapışmalarında sorun yaşanabileceği düşünülerek, kesitleri almaya başlamadan önce lamların üzerlerine fırça yardımıyla jelâtin, distile su ve %10 formaldehit karışımından oluşturulan yapıştırıcı sürüldü (61). Yapıştırıcı kesit alınmadan önce kullanılacak olan tüm lamların üzerine sürülerek kurumması beklendi.

Mikrotom (LEICA RM 2255) yardımıyla alınan dokular, benmari içerisinde 45 °C ısıtılmış suda kırışıklıkları giderilinceye kadar yüzdürüldü ve daha önce yapıştırıcı sürülen lamalar üzerine alındı. Bir lam üzerine 4 kesit alındı ve doku kesitlerinin daha iyi yapışmalarını sağlamak için üzerlerine hafifçe fırçayla bastırıldı. Üzerine doku kesitlerini aldığımız lamalar daha önce içine 1 cc %10'luk formaldehit (dokuların etüvde yanmalarını ve kurumalarını engellemek için) konan kapaklı kaplara konularak, ağızları hava almayacak şekilde kapatıldı ve 60 °C etüvde bir gece bekletildiler. Böylece dokuların hem parafini eritildi hem de lamlara daha iyi yapışmaları sağlandı.

### 3.2.4. Kesitlerin Boyanması

Deney ve kontrol grubuna ait sıçan beyin dokularının kesitleri alındıktan sonra boyama işlemine geçildi. Kesitler cresyl fast violet boyasıyla boyandı. Creyl fast violet boyasını hazırlamak için öncelikle 500 cc distile su içerisine 0,5 gr toz creyl fast violet boyası kondu ve iyice karıştırıldı. Daha sonra boyanın rengini koyulaştırmak için 9 damla glacial acetic acid damlatıldı ve ağzı parafilm ile kapatılarak bir gün boyunca dinlendirildi. Dinlendirilen boya kurutma kâğıdından süzüldü ve her kullanımdan önce etüvde 60 °C' de bekletildi. Boya hazırlandıktan sonra dokular aşağıdaki aşamalardan geçirildi (61, 105).

1. Ksilen ..... 20 dakika
2. Ksilen ..... 20 dakika
3. % 100'lük alkol..... 10 dakika
4. % 96'lık alkol..... 10 dakika
5. % 80'lik alkol..... 10 dakika
6. % 70'lik alkol..... 10 dakika
7. Distile su ..... 10 dakika
8. Cresyl fast violet (daha önce etüvde ısıtılmış)... 6 dakika
9. Distile su ..... 10 dakika
10. %70'lik alkol..... 5dk
11. % 96'lık alkol..... 5dk
12. % 100'lük alkol..... 10 dakika
13. Ksilen içerisinde bir gece bekletildi.
14. Entellan ile kapatıldı.

### 3.3. Nöron Sayısı Hesaplaması

#### 3.3.1. Kesitlerde Hipokampus Sınırının Tespiti

Stereolojik araştırmalarda ilgilenilen yapının sınırlarının belirlenmesi önemlidir. Daha önce yapılan çalışmalar incelendiğinde hipokampus sınırlarının farklı şekillerde belirlendiği görülmüştür. Bazı çalışmada hücrelerin büyüklükleri veya yoğunlukları hipokampus sınırının belirlenmesinde kriter olarak alınırken, bazı çalışmalarda ise ani hücresel değişikliklerin olduğu alanlar hipokampus sınırı olarak kabul edilmektedir. Her ne şekilde olursa olsun hipokampus sınırının belirlenmesinde hücre farklılaşmasının ve büyüklüklerinin önemli olduğu açıktır. Sıçan hipokampusunda granüler hücre ve piramidal hücre tabakaları arasındaki sınırlar Nissl lekeli bölümlerinden dolayı kolayca tanımlanabilirken (104), piramidal hücrelerin kalınlıklarından yararlanılarak hipokampusun CA2 bölgesi de belirlenebilir. Bu hücresel değişiklikler hipokampus sınırlarının belirlenmesinde yardımcıdır (78).

Beyin bölümleri arasında sınırları belirlemek için uygulanan bir yöntemde creyl fast violet ile boyamaktır. Çünkü creyl fast violet boyası, beyin bölgeleri arasındaki sınırları en iyi gösteren boyadır. Bu boyama yöntemi iskemik lezyonun sınırını kolayca belirlememizi de sağlar (69, 106). Bir diğer yöntemde yapıların anatomik şeklinden yararlanmaktır. Hipokampusun C şeklindeki görüntüsü, organın bulunduğu yer ve komşu bölgeler bizlerin onu diğer beyin dokularından ayırmamızı sağlar (23, 24).

#### 3.3.2. Kesitlerde Nöronların Tespiti

Kesitlerdeki nöronlar buldukları tabakalara göre farklılıklar göstermektedir. CA1'deki piramidal tabakada nöronlar çok yoğundur. CA2 dar bir alanı oluşturmaktadır. CA2 ve CA3 nöronları daha büyüktür (107).

Nöron sayımı için birçok yöntem kullanılabilir. Daha önce yapılan çalışmalara bakıldığında, nöron sayımında sıklıkla organel sayımının kullanıldığı görülmüştür (97). Bu nedenle sunulan çalışmada nöronların en belirgin organeli olarak kabul edilen çekirdeklerin sayılmasına karar verildi. Böylece tüm çalışmada nöron çekirdekleri baz alınarak, görülen çekirdeklerin sayılmasıyla nöron sayısı tespit edildi.

Kesitlerde nöronların belirgin bir şekilde görülmesi ve tespiti için konvansiyonel histokimyasal boyalardan cresyl fast violet kullanıldı. Bilindiği üzere bu boyama yöntemi

beyin bölgeleri arasındaki sınırları en iyi gösteren boyama yöntemi olmasının yanı sıra, nöronların ve iskemik bölgenin sınırlarının da kolayca belirlenmesini sağlar (69, 106). Cresyl fast violet ile nöronlar, açık mavi zeminde yuvarlak ya da oval şekilde görülür.

### 3.4. Stereolojik Analizler

#### 3.4.1. Stereoloji Analiz Sistemi

Çalışmanın stereolojik analizleri KTÜ Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Stereoloji Laboratuvarında bulunan stereoloji analiz sisteminde yapıldı (Şekil 7).



**Şekil 7.** Stereoloji Analiz Sistemi. (1) Kamera, (2) Mikroskop, (3) Otomatik Tabla, (4) Monitor, (5) Bilgisayar Kasası, (6) Kontrol Ünitesi, (7) El Kumandası.

Stereoloji analiz sistemi Leica firmasının üretimi olan stereoloji analiz yazılımı ve donanımını içermektedir. Sistem, MicroBrightField (ABD) firmasının stereolojik araştırmalar için tasarlanmış stereoloji analiz yazılımı (Stereo Investigator 9, Computer Assisted Stereological Toolbox-Leica) içeren bir bilgisayar (Pentium PC, DELL OptiPlex, USA), araştırma mikroskobu (Leica, DM4000B-M, Germany), CCD kamera (JVC, Japan), Z ekseninde ölçüm yapan ölçüm çubuğu (Heidenhain LIP401 R, Germany), mikrakator göstergesi (Heidenhain ND 221 B, Germany), PC tarafından kontrol edilerek mikroskop tablasının X ve Y eksenlerinde hareketini bilgisayar kontrollü olarak yönetebilen bir tabla

motorundan (Prior ProScan, USA) ve bir adet tabla kontrol çubuğundan (Prior, USA) oluşmaktadır.

### 3.4.2. Stereolojik Analizlerin Detayları

Çalışmada kullanılan örnekleme oranları ve ölçüm sırasında kullanılan diğer değerler Tablo II verilmiştir. Sistemik rastgele örnekleme yöntemiyle her yedi kesitten biri seçilerek, stereolojik analiz yapılacak kesitler belirlendi (Kesit Örnekleme Oranı: 1/7). Stereoloji analiz sisteminde örnekleme ile belirlenen kesitlerdeki nöronlar optik parçalama yöntemi kullanılarak sayıldı.

Stereolojik analiz ve nöron sayımına başlamadan önce öncelikle sistem açılarak, çalışmasında herhangi bir aksaklık olup olmadığı kontrol edildi. Sistemin hatasız olarak çalıştığından emin olduktan sonra öncelikle incelenecek kesit mikroskopun otomatik tablasına yerleştirildi ve görüntü netliği sağlandı. İlk önce mikroskopun en küçük büyütmesinde sayım yapılacak alanların sınırları çizildi. Daha sonra mikroskopun objektifi nöron sayımı yapılacak büyüklüğe getirildi. Çalışmada nöron sayımında 100X/1,35 büyüklüğünde objektif kullanıldı. Daha önce ön çalışma ile tespit edilen, adım aralığı, optik disektör yüksekliği, üst güvenlik kuşağı, tarafsız sayım çerçevesi ölçüleri sisteme girildi (Tablo II). Örneklenen her kesit için aynı işlemler yapıldı. Veriler ham veri şeklinde elde edildikten sonra her kesitteki toplam tanecik sayısı excel'de hazırlanan bir sayfaya aktarıldı ve her bir hayvanın hipokampusundaki toplam nöron sayısı hesaplandı.

**Tablo 2.** Kesit Örnekleme Oranı ve Analizlerde Kullanılan Değerler

<b>Analiz Parametreler</b>	<b>Değerler</b>
Kesit örnekleme oranı	1/7
Tarafsız sayım çerçevesi alanı ( $\mu\text{m}^2$ )	40000
Disektör hacmi ( $\mu\text{m}^3$ )	400000
Optik disektör yüksekliği ( $\mu\text{m}$ )	10
Üst ve alt güvenlik kuşağı ( $\mu\text{m}$ )	5
Sayım yapılan objektif büyüklüğü ( $\mu\text{m}$ )	100X/1,35

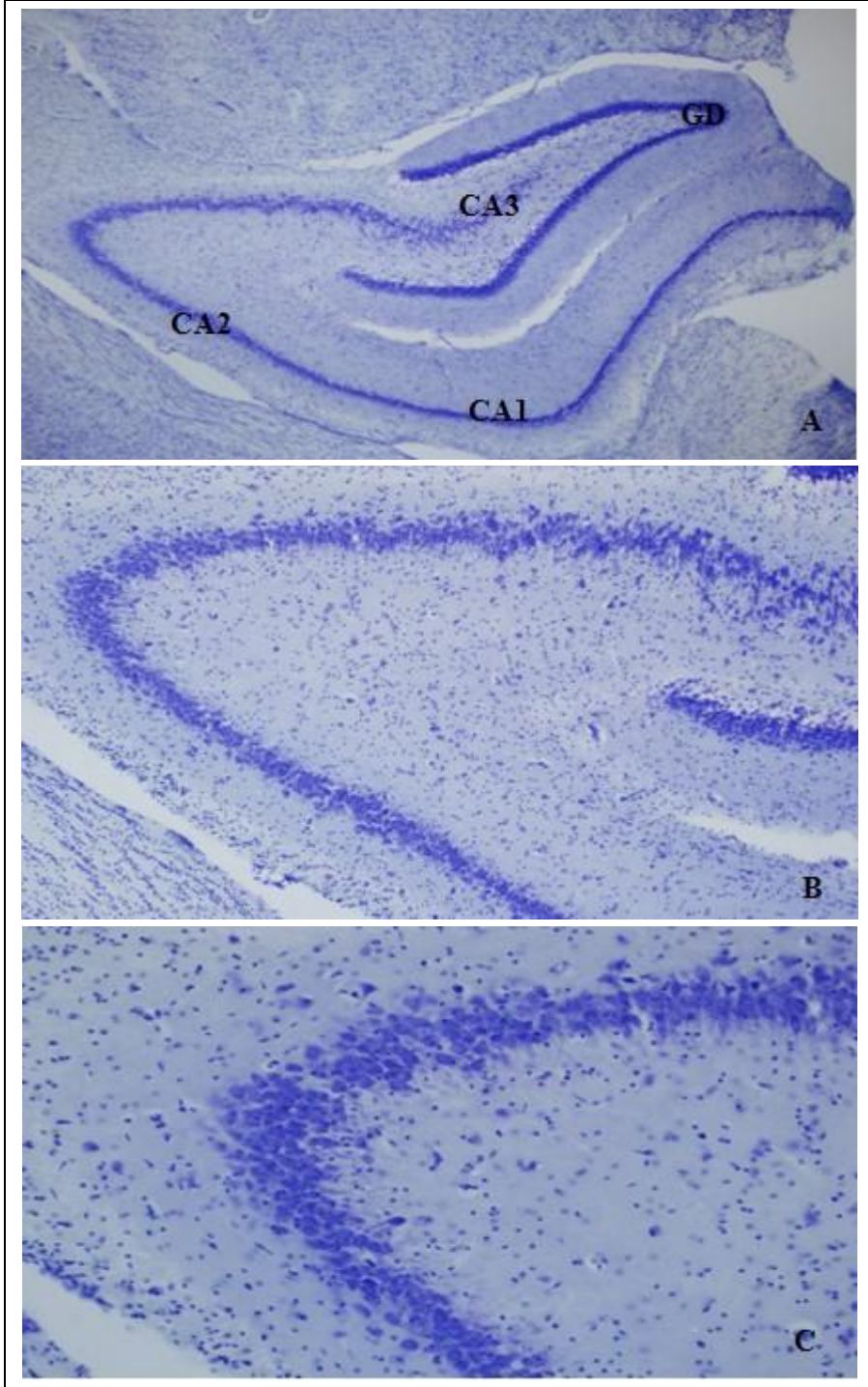
## **4. BULGULAR**

### **4.1. Sıçanların Çalışma Süresince Davranışlarının Yönünden Değerlendirilmesi**

Değerlendirmeye cerrahi müdahale sonrasında başlandı. Sıçanlar anestezi etkisinden 1 saat sonra çıktı. İlk 3 saat boyunca bir şey yiyip içmedi. Daha sonraki saatlerde yeme ve içme davranışları normale döndü. Özellikle ilk 4 gün sıçanlarda işlemler sırasında aşırı sinirlilik ve saldırganlık davranışları olduğu gözlemlendi. 5. günden itibaren davranışları normale dönmeye başladı. IV. ve V. Gruplardaki sıçanların ilk gün saldırgan davranışları oldu. Diğer günlerde ise normal davranışlar gözlemlendi.

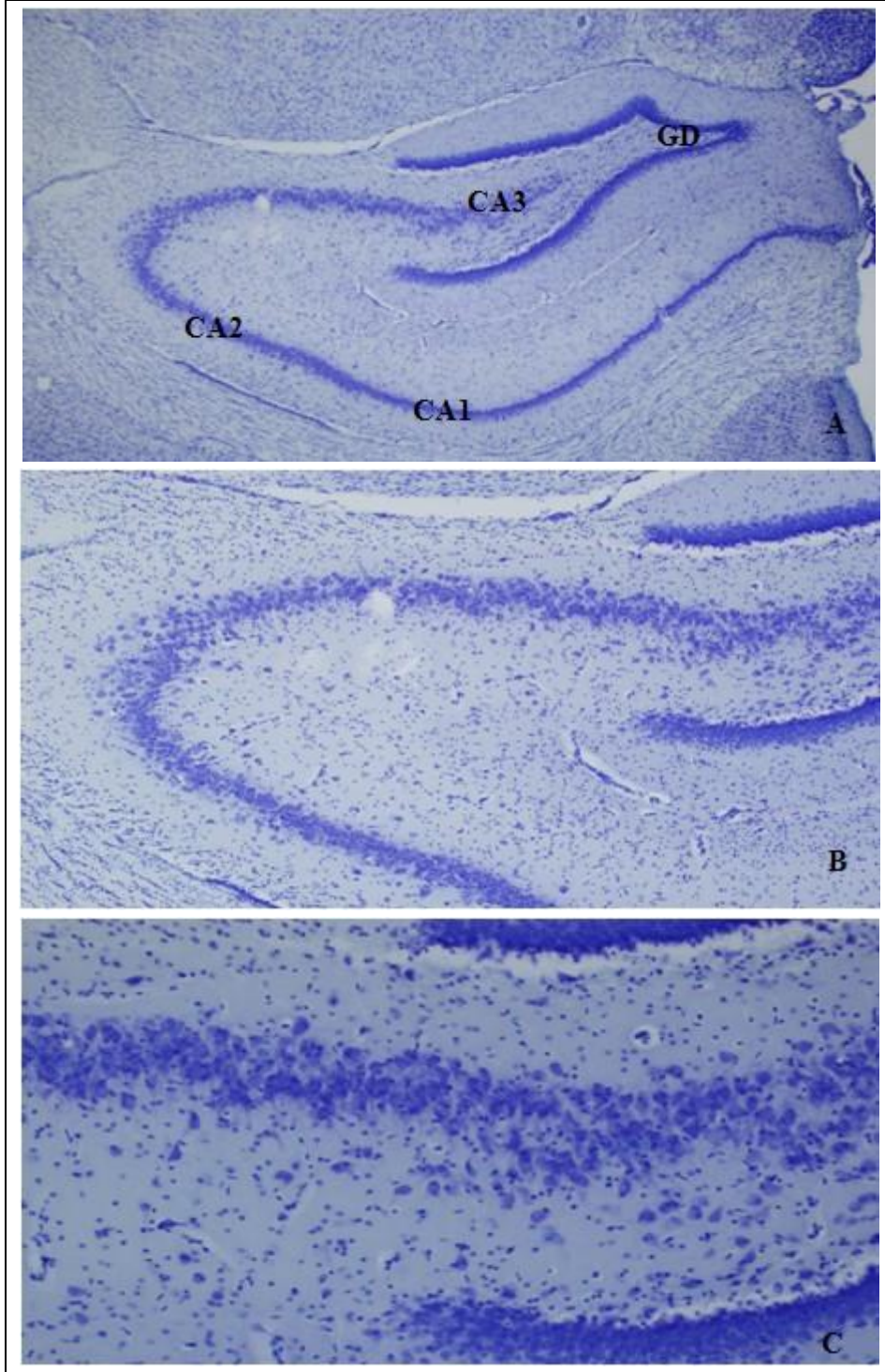
### **4.2. Hipokampus Nöronlarının Morfolojik Değerlendirilmesi**

Sıçan hipokampus nöronları morfolojik olarak değerlendirildiğinde I., II., III., IV. ve V. Gruplardaki sıçanlara ait nöronlar arasında belirgin bir morfolojik farklılığın olmadığı gözlemlendi (Şekil. 8, 9, 10, 11, 12).



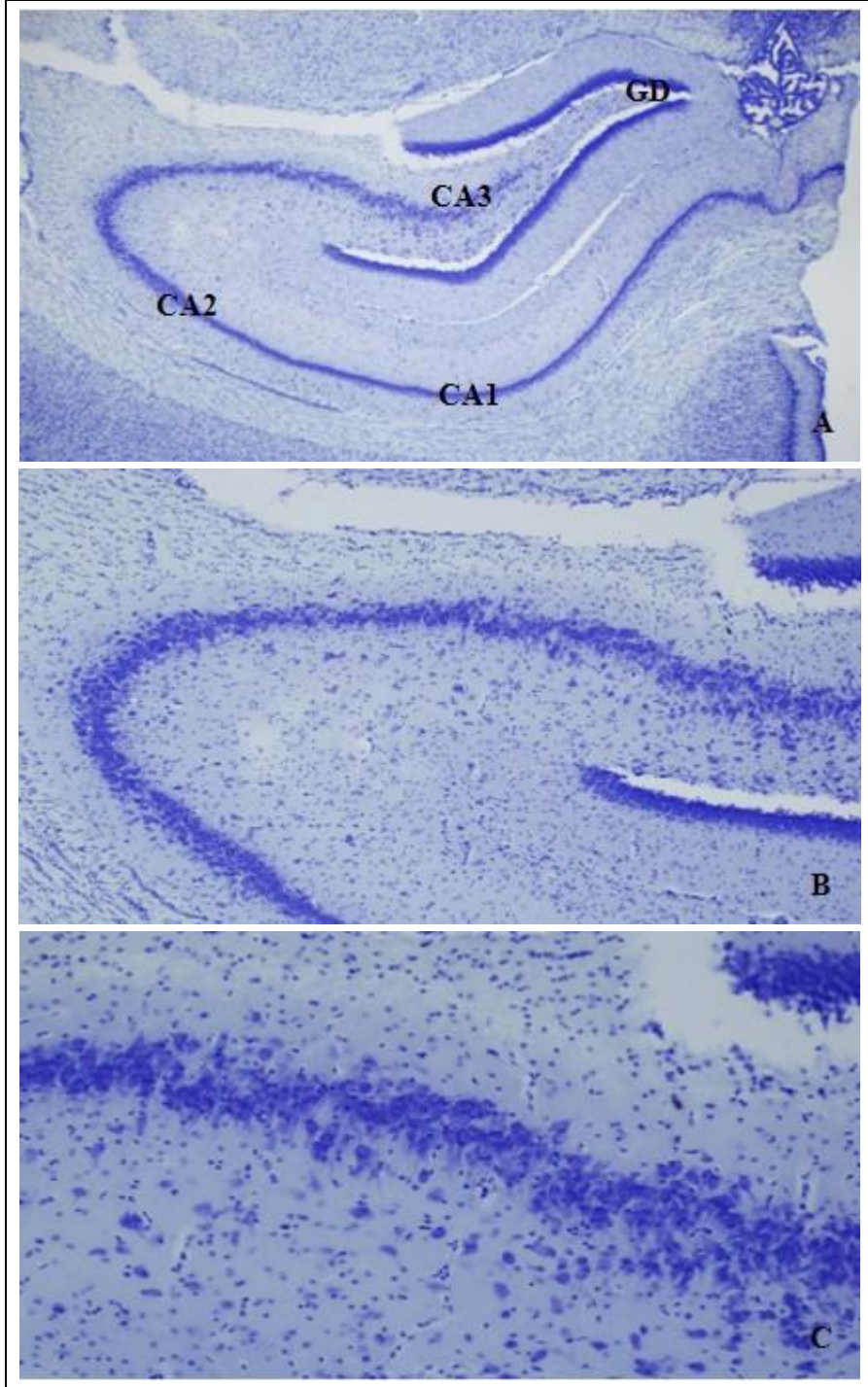
**Şekil 8.** Kontrol Grubuna Ait Sıçan Hipokampuslarının Morfolojik Görüntüleri (A) Hipokampusun Panoramik Görüntüsü (X2), (B) Corno Ammonisin Genel Görüntüsü (X10), (C) Hipocampus CA Bölgesindeki Nöronların Görüntüsü (X20), (Cresyl Fast Violet), CA: Corno Ammonis, GD: Girus Dentatus).



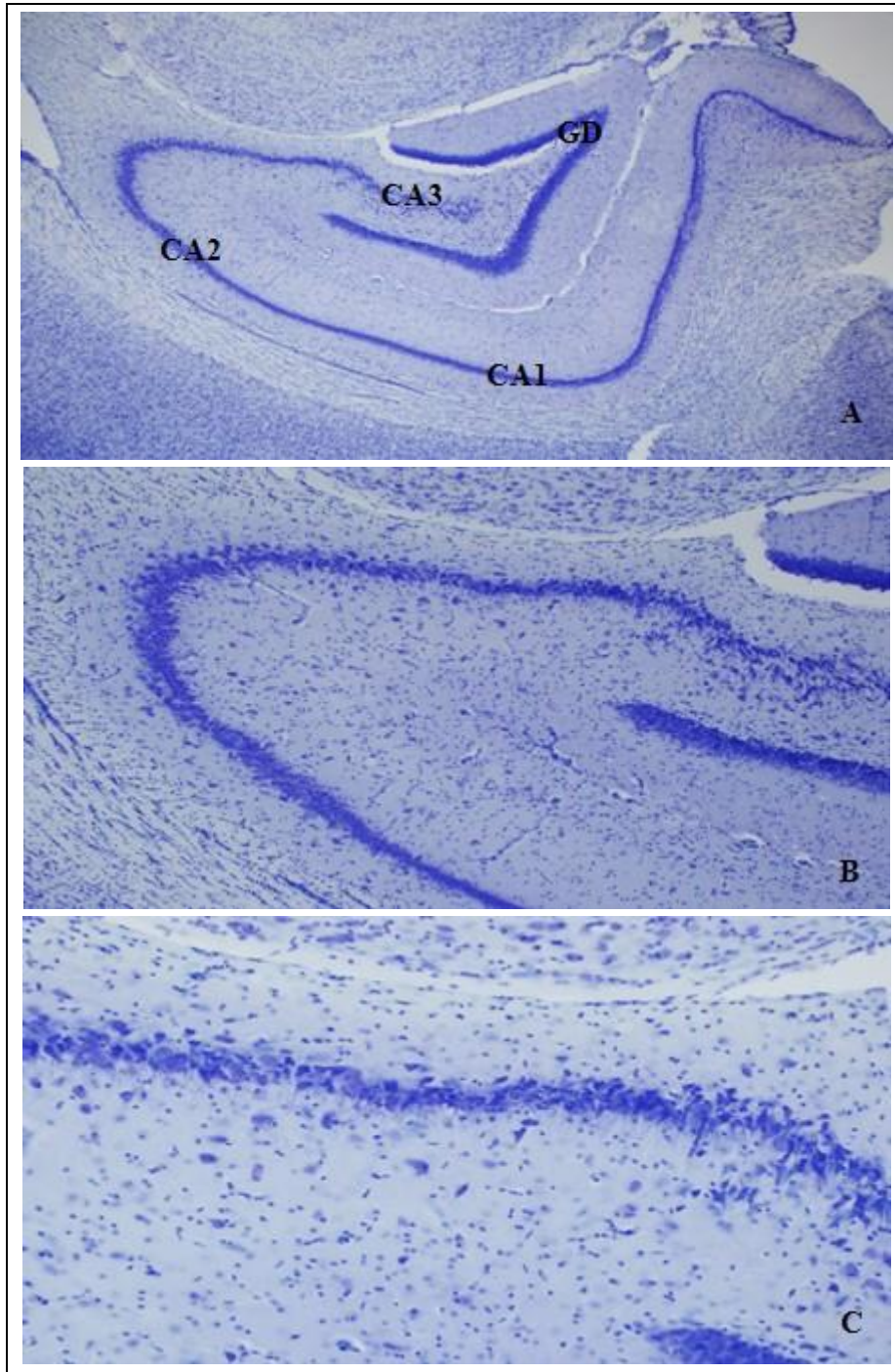


**Şekil 9.** İskemi Grubuna Ait Sıçan Hipokampuslarının Morfolojik Görüntüleri. (A) Hipokampusun Panoramik Görüntüsü (X2), (B) Corno Ammonisin Genel Görüntüsü (X10), (C) Hipocampus CA Bölgesindeki Nöronların Görüntüsü (X20), (Cresyl Fast Violet), CA: Corno Ammonis, GD: Girus Dentatus).



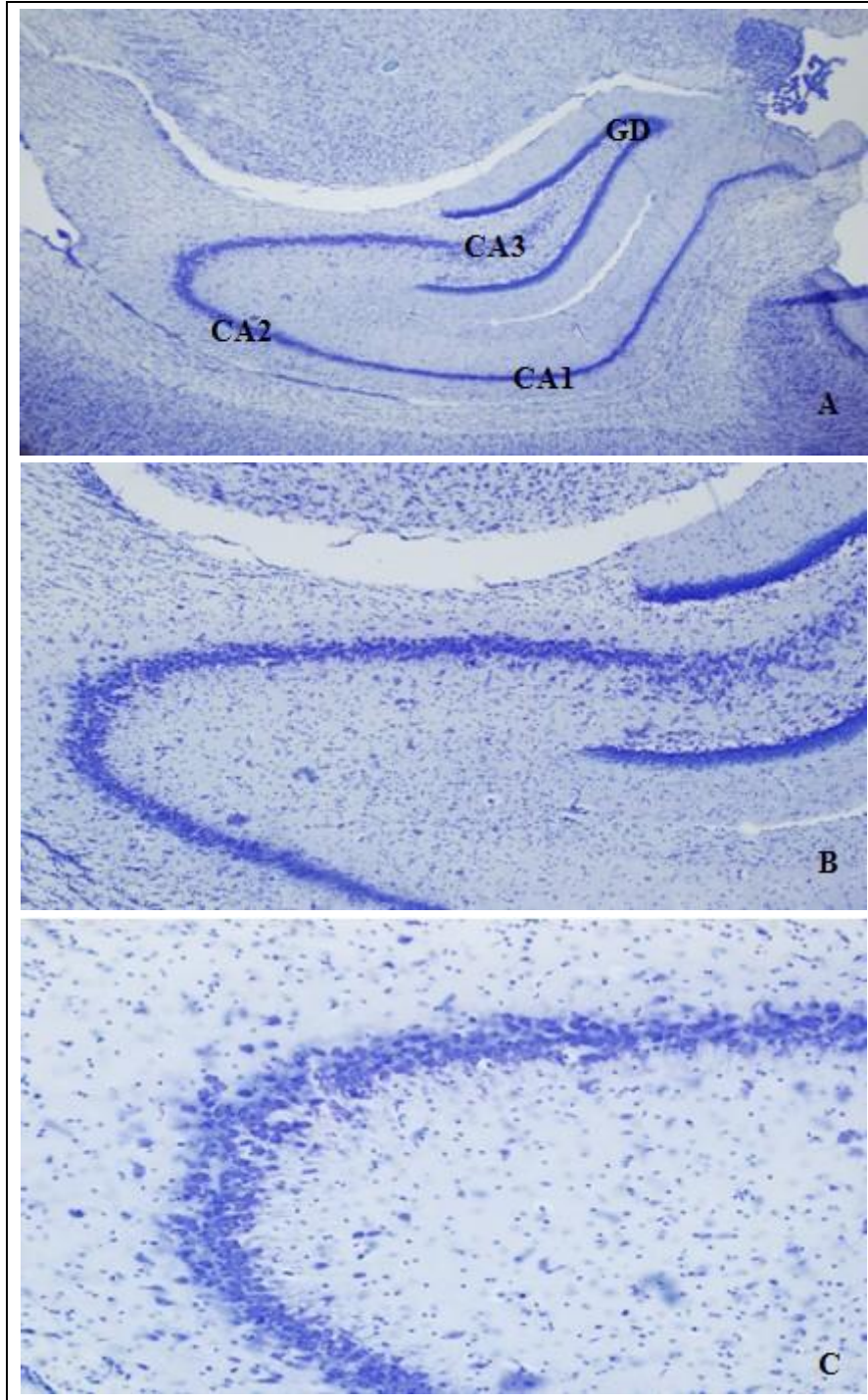


**Şekil 10.** İskemi+Etil Pirüvat Grubuna Ait Sıçan Hipokampuslarının Morfolojik Görüntüleri. (A) Hipokampusun Panoramik Görüntüsü (X2), (B) Corno Ammonisin Genel Görüntüsü (X10), (C) Hipocampus CA Bölgesindeki Nöronların Görüntüsü (X20), (Cresyl Fast Violet), CA: Cornu Ammonis, GD: Girus Dentatus).



**Şekil 11.** Sham+Etil Pirüvat Grubuna Ait Sıçan Hipokampuslarının Morfolojik Görüntüleri. (A) Hipokampusun Panoramik Görüntüsü (X2), (B) Corno Ammonisin Genel Görüntüsü (X10), (C) Hipocampus CA Bölgesindeki Nöronların Görüntüsü (X20), (Cresyl Fast Violet), CA: Cornu Ammonis, GD: Girus Dentatus).





**Şekil 12.** Sham+Ringer Laktat Grubuna Ait Sıçan Hipokampuslarının Morfolojik Görüntüleri. (A) Hipokampusun Panoramik Görüntüsü (X2), (B) Corno Ammonisin Genel Görüntüsü (X10), (C) Hipocampus CA Bölgesindeki Nöronların Görüntüsü (X20), (Cresyl Fast Violet), CA: Corno Ammonis, GD: Girus Dentatus).

### 4.3. Hipokampus Nöron Sayısı Verileri

Gruplardaki her bir sığana ait nöron sayısı, grupların ortalama nöron sayısı, stereolojik analizlerde kullanılan kesit sayısı, ortalama kesit kalınlıkları, disektör partikül sayısı, hata katsayısı ve değişim katsayıları Tablo III'de verilmiştir.

**Tablo 3.** Her Bir Sığana Ait Nöron Sayısı, Grupların Ortalama Nöron Sayısı (ONS), Hesaplamalarda Kullanılan Kesit Sayısı, Ortalama Kesit Kalınlığı (OKK), Disektör Partikül Sayısı (DPS), Hata Katsayısı (HK) ve Değişim Katsayıları (DK).

Grup No	Hayvan No	Kesit Sayısı	Nöron Sayısı	ONS (ortalama±SS)	OKK (µm)	DPS	HK	DK
I	1	17	619123	603376±8297	21,27	1039,1	0,46	0,09
	2	16	587672					
	3	16	603911					
	4	18	628592					
	5	16	573127					
	6	17	607833					
II	1	15	487071	499226±6863	20,93	930,4	0,47	0,08
	2	16	493820					
	3	16	503912					
	4	15	476352					
	5	17	512011					
	6	16	522192					
III	1	16	513821	523021±13115	20,35	1023,27	0,43	0,12
	2	16	529045					
	3	15	490352					
	4	16	541789					
	5	15	489879					
	6	16	573241					
IV	1	17	612345	595447±11215	21,91	1032,22	0,49	0,05
	2	18	637854					
	3	16	585467					
	4	16	571985					
	5	16	563734					
	6	16	601297					
V	1	16	613537	576055±21127	21,39	1027,16	0,46	0,07
	2	15	593200					
	3	16	577640					
	4	17	521397					
	5	16	509321					
	6	18	641237					

Kontrol, iskemi, iskemi+EP, sham+EP ve sham+ringer laktat gruplarına ait toplam nöron sayılarının istatistiksel olarak karşılaştırılması sonucunda aşağıdaki veriler elde edilmiştir.

1) Kontrol ve iskemi grupları toplam nöron sayısı bakımından karşılaştırıldığında, iskemi grubunun nöron sayısında azalma olduğu ve bu azalmanın anlamlı olduğu görüldü ( $p<0.001$ ) (Tablo IV, Şekil 14).

2) Kontrol ve iskemi+EP grupları toplam nöron sayısı bakımından karşılaştırıldığında, iskemi+EP grubunun nöron sayısında azalma olduğu ve bu azalmanın anlamlı olduğu görüldü ( $p=0,002$ ) (Tablo IV, Şekil 14).

3) Kontrol ve sham+EP grupları toplam nöron sayısı bakımından karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılığın olmadığı görüldü ( $p>0,05$ ) (Tablo IV, Şekil 14).

4) Kontrol ve sham+ringer laktat grupları toplam nöron sayısı bakımından karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılığın olmadığı görüldü ( $p>0,05$ ) (Tablo IV, Şekil 14).

5) İskemi ve iskemi+EP grupları toplam nöron sayısı bakımından karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılığın olmadığı görüldü ( $p>0,05$ ) (Tablo IV, Şekil 14).

6) İskemi ve sham+EP grupları toplam nöron sayısı bakımından karşılaştırıldığında, iskemi grubunun nöron sayısında azalma olduğu ve bu azalmanın anlamlı olduğu görüldü ( $p<0,001$ ) (Tablo IV, Şekil 14).

7) İskemi ve sham+ringer laktat grupları toplam nöron sayısı bakımından karşılaştırıldığında, iskemi grubu nöron sayısında azalma olduğu ve bu azalmanın anlamlı olduğu görüldü ( $p=0,003$ ) (Tablo IV, Şekil 14).

8) İskemi+EP ve sham+EP grupları toplam nöron sayısı bakımından karşılaştırıldığında, iskemi+EP grubunun nöron sayısında azalma olduğu ve bu azalmanın anlamlı olduğu görüldü ( $p=0,006$ ) (Tablo IV, Şekil 14).

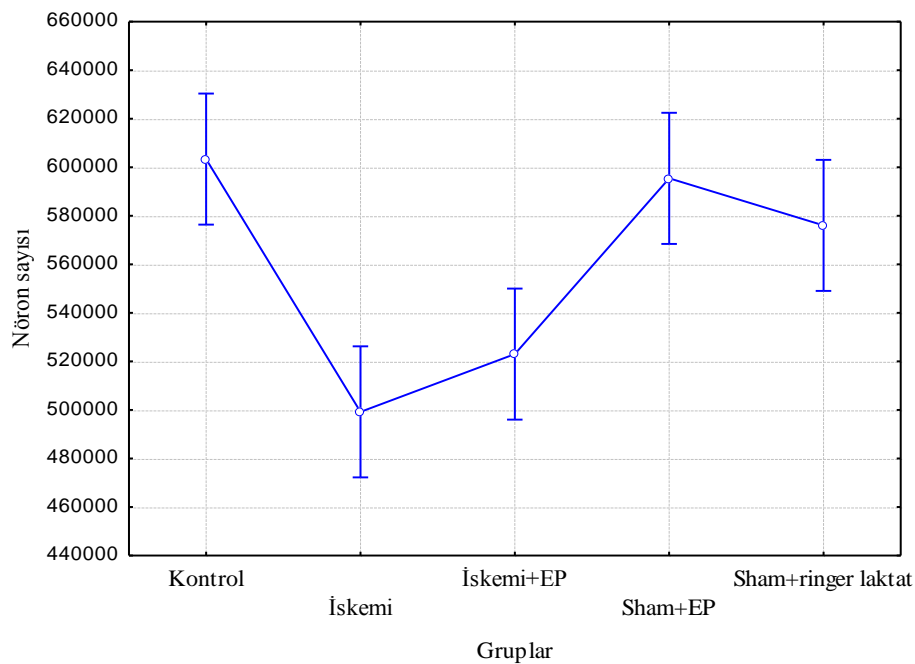
9) İskemi+EP ve sham+ringer laktat grupları toplam nöron sayısı bakımından karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılığın olmadığı görüldü ( $p>0,05$ ) (Tablo IV, Şekil 14).

10) Sham+EP ve sham+ringer laktat grupları toplam nöron sayısı bakımından karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılığın olmadığı görüldü ( $p>0,05$ ) (Tablo IV, Şekil 14).

**Tablo 4.** Tüm Grupların Karşılaştırılmalı p Değerleri

Grup No	I	II	III	IV	V
I		0,000077*	0,002104*	1,000000	1,000000
II	0,000077*		1,000000	0,000230*	0,003438*
III	0,002104*	1,000000		0,006327*	0,084468
IV	1,000000	0,000230*	0,006327*		1,000000
V	1,000000	0,003438*	0,084468	1,000000	

\* p &lt; 0,05

**Şekil 13.** Tüm Grupların Nöron Sayısına Göre Karşılaştırılması (p=0,00001).

#### 4.4. Verilerin İstatistiksel Analizi

Verilerin istatistiksel analizinde SPSS (Statistical Package for the Social Sciences, version 13.1, SSPS Inc., Chicago, IL, USA) ve STATISTICA 7 programlarından yararlanılmıştır. Çalışma grupları nöron sayısı yönünden normal dağılıma sahip olduğu için parametrik testlerden ANOVA Post-Hoc Bonferroni testi kullanılarak dörtlü karşılaştırmalar yapılmıştır. Her bir gruba ait nöron sayısı ortalama±standart sapma (SS) olarak verilmiştir. Tüm karşılaştırmalarda p<0.05 değeri anlamlı kabul edilmiştir.

## 5. TARTIŞMA

Hücre içinde antioksidan etkisi olduğu bilinen pirüvatın bir türevi olan EP, kalsiyum ve potasyum içeren dengeli bir tuz solüsyonudur (13). Etil pirüvat ise umut veren antioksidan ve antiinflamatuvar bir ajandır (82, 83). Çalışmalarda hem pirüvat hemde EP'nin primer kortikal kültür de oksijen-glikoz yoksunluğu ya da hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) varlığı sırasında nöroprotektif etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Etil pirüvat geniş bir terapötik ve güçlü bir koruyucu etkiye sahiptir ve bu koruyucu etkisi onun antiinflamatuvar etkisiyle de ilişkilidir (13). Pirüvat, oksidatif stres oluşturulan hayvan modellerinde yararlı etkileri gösterilmiş bir endojen antioksidandır. Ancak geçici iskemi olaylarında pirüvatın nöroprotektif etkisi belirli bir bölgeyle sınırlıdır ve kalıcı iskemideki nöroprotektif etkisi tam olarak açıklanamamıştır (13). Etil pirüvat ise antioksidan özelliği nedeni ile iskeminin hasara uğrattığı organ sistemindeki hemorajik hasarı ve endotoksik şoku kısmen azaltır (87).

Gıda katkı maddesi olarak da kullanılan EP kullanılarak birçok deneysel çalışma yapılmıştır (87). Çalışmalarda EP'nin basit bir molekül olmasına rağmen hayati organlar üzerinde önemli etkileri olduğu ve bu etkilerin bir çok patolojik olayda organları koruyucu yönde olduğu gösterilmiştir (82, 83). Bu çalışmalar ve farmakolojik özellikleri, EP'nin diğer organlar ve sistemler üzerindeki etkilerinin de araştırılmasına zemin oluşturmakla birlikte insanlar üzerinde kullanılabilmesi için daha birçok çalışma yapılması gerektiğini düşündürmektedir (87).

Örneğin yapılan bir çalışmada, EP'nin akut böbrek yetmezliği tedavisinde etkili olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada EP'nin böbrekte iskemi/reperfüzyon sonucunda oluşturulan yetmezliğin ortaya çıkardığı hemorajik ve endotoksik şok hasarını azalttığı gösterilmiştir. Bu durum EP'nin antioksidan etkisi ile alakalıdır. Çalışma sonuçları akut böbrek yetmezliğinde EP'nin tedavi edici bir etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Hatta bu etkisi böbrek yetmezliğinin ileri boyutlarında bile değişmemiştir (87). Xu ve arkadaşlarının yaptıkları başka bir çalışmada da benzer sonuçlar elde edilmiştir (108). Kaklıkkaya ve

arkadaşlarının sıçanlar üzerinde yaptıkları başka bir çalışmada ise, deneysel iskemi-reperfüzyon modelinde kullanılan EP'nin kan ve doku örneklerindeki malondialdehit (MDA) seviyeleri ve etkileri belirlenerek EP'nin antioksidan ve antiinflamatuvar bir ajan olduğu ileri sürülmektedir. Bu çalışmanın sonuçları da iskemi ve reperfüzyon sonucu oluşturulan akciğer hasarına karşı EP'nin koruyucu etkisi olduğunu desteklemektedir (82). Yapılan bir çalışmada ise EP'nin sistematik inflamasyon ve sepsislerden ölümleri önlediği rapor edilmiştir (13).

Piruvat, glikoz metabolizmasında orta ve güçlü bir ROS temizleyicisi gibi rol oynar. Oksidatif strese karşı pirüvatın koruyucu etkisinin olduğu nöronlarda dahil olmak üzere çeşitli dokularda gösterilmiştir (89, 90). Ancak bu etkinliğine rağmen henüz terapötik bir ajan olarak kullanılması sınırlıdır (91). Etil pirüvatın mezenterik iskemide, iskemi sonrası reperfüzyona bağlı oluşan epitelyal hasar ve oksidatif stresten koruyucu etkisi az da olsa rapor edilmiştir (13). Yapılan birçok deneysel çalışmada karaciğerde iskemi-reperfüzyon sonucu oluşturulan hasarda EP'nin etkilerine bakılmıştır. Bunun nedeni organ nakli, karaciğer travması veya çeşitli nedenlerden dolayı karaciğerin çıkarılması sonucu ortaya çıkan bulguların, karaciğerde oluşturulan deneysel iskemi-reperfüzyon modeli sonucu ortaya çıkan bulgulara benzer olmasıdır. Ayrıca ROS'un iskemi-reperfüzyon yaralanmasında önemli bir rol oynadığı ve EP'nin ROS üzerine etkisi olduğu da bilinmektedir. Nitekim Tsung ve arkadaşlarının sıçanlar üzerinde yaptıkları iskemi-reperfüzyon çalışmasında EP'nin ROS üzerine olan etkisine bakılmış ve iskemi-reperfüzyon sonucu oluşan hasarı önlediği gösterilmiştir (109). Yine fareler üzerinde yapılan bir başka çalışmada EP'nin antiinflamatuvar etkisi ve doku üzerinde etkili bir koruyuculuğu olduğu ve karaciğer tümörünün büyümesini baskıladığı gösterilmiştir (110). Taylor ve arkadaşlarının sıçanlar üzerinde yaptıkları çalışmada ise yine EP'nin ROS üzerine olan etkisinden yararlanılarak miyokard üzerindeki koruyucu etkisine bakılmıştır. Çalışma sonuçlarına göre EP'nin miyokard adenozin trifosfat (ATP) seviyelerini artırdığı, oksidatif stresi azalttığı ve miyokard infarktüsü hariç geçici iskemi-reperfüzyon modellerinde miyokard fonksiyonunu koruduğu gösterilmiştir (111).

Etil pirüvatın MSS üzerindeki etkilerini inceleyen çalışmalara bakıldığında, EP'nin yetişkin sıçanlarda serebral arter tıkanıklığı sonrasında nöroprotektif etkisinin olduğunu gösteren çalışmaların varlığı dikkati çekmektedir (13, 14, 84). Yu ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada, sıçanlar üzerinde orta serebral arter tıkanıklığıyla oluşturulan iskemide EP'nin iskemik hasarlarda güçlü bir koruyucu etkisi olduğu rapor edilmiştir (14). Shen ve



arkadaşlarının sıçanlar üzerine yaptıkları çalışmada EP'nin neonatal hipoksik iskemisi sonrası beyin dokusu kaybına karşı güçlü nöroprotektif etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (84). Choi ve arkadaşlarının yapmış olduğu benzer bir çalışmada ise EP'nin Parkinson hastalığı modellerinde dopaminerjik hücre ölümü üzerinde de koruyucu etkisi olduğunu gösterilmiştir (112). Tavşanlar üzerinde Wang ve arkadaşlarının yaptığı bir diğer çalışmada ise spinal kord iskemik hasarında EP'nin geçici iskemik omurilik hasarına karşı güçlü bir koruyuculuğu olduğu öne sürülmektedir (113). Bu çalışmalarda genel olarak EP'nin anti-inflamatuar etkisinin ve hücre ölümleri üzerinde inhibitör etkisinin olması esas alınmıştır.

Yapılan çalışmalarda pirüvatın sıçanlarda oluşturulan geçici genel beyin iskemisi sonrasında hipokampus CA1 bölgesinde nöron hasarlarına karşı koruma sağladığı gösterilmiştir (88). Etil pirüvat'ın hipokampus üzerindeki etkilerini irdeleyen çalışmalar incelendiğinde ise konuyla ilgili sınırlı sayıda çalışmanın olduğu görülmektedir. Cho ve arkadaşlarının fareler üzerinde yaptıkları bir çalışmada kainik asit üzerinde EP'in etkisinin olup olmadığı incelendi. Bilindiği üzere kainik asit, beyin ve omurilikte bulunan ve uyarıcı bir nöromedyatör olan glutamik asidin analogudur ve nöronal hücre ölümünü uyaran bir maddedir. Yapılan bu çalışmada intraserebroventriküler yoldan öncelikle kainik asit, kainik asit enjeksiyonundan 12 saat sonra da yine aynı yoldan EP, hipokampusun CA1 ve CA3 bölgelerine uygulanarak bu bölgelerdeki piramidal nöron ölümlerine bakıldı. Çalışma sonucunda EP'nin hipokampusdaki hücre ölümlerini azalttığı ve kainik asitin ortaya çıkardığı bellek bozukluğunu inhibe ettiği gösterildi (114). Muro ve Sutton'un sıçanlar üzerinde yaptığı bir diğer çalışmada ise, sıçanlara kafa travması sonrasında sodyum pirüvat (SP) ve EP uygulanarak muhtemel etkileri araştırıldı. Bu çalışmada sıçanlara hipokampusun kortikal kontüzyon yaralanması sonrasında SP ve EP uygulandı. Çalışma sonucunda hem SP hemde EP uygulanan gruplardaki hayvanların hafızalarında daha erken düzelmeler olduğu, hipokampusdaki ölü hücrelerin sayısında azalma olduğu ve buna bağlı olarak da nöronal doku kaybının azaldığı görüldü. Bu çalışma sonucunda SP ve EP'nin nöroprotektif etkilerinin yanı sıra EP'nin etkisinin daha önce başladığı da rapor edildi (115) Yine bir diğer çalışmada EP'nin anti inflammatuar etkisi sayesinde hipokampusda nöron ölümünü azalttığı bildirildi (86).

Yapılan çalışmalar incelendiğinde EP'nin nörogenesis üzerinde etkisi olabileceği de kuvvetle muhtemeldir. Bu nedenden dolayı bu çalışma planlanmıştır. Özellikle postnatal dönemde nörogenesisin hipokampus bölgesinde gerçekleştiği deneysel olarak da gösterildiğinden çalışma bölgesi olarak hipokampus seçilmiştir. Bilindiği üzere yakın

zamana kadar yetişkin memelilerinin MSS’de yeni nöronların oluşmadığı ya da hasarlı bölgelerde yenilenme olmadığı düşünülmekteydi (9). Ancak son zamanlarda yapılan çalışmalarda yetişkin MSS’nin bazı bölgelerinin yeni glia ve nöron üretme yeteneğinde olduğu ortaya kondu. Bu çalışmalar multipotent özellikleri tanımlanan sinir kök hücrelerinin insanları da içine alan çeşitli memeli türlerinde yaşam boyunca çeşitli sinir hücrelerine dönüştüğünü göstermektedir (10, 11).

Normal yetişkin beyinlerinin birçok yerindeki nöronlar hücre ölümü sonrasında yenilenmez. Ancak kendi kendini yenileyen kök hücreleri beynin farklı bölgelerinde gösterilmiştir. Bu bölgeler hipokampusun girus dentatusu ve lateral ventriküllerin subventriküler bölgesine yakın olan subependimal katmandır (12). Bu kısımlardaki kök hücreler bazı ilaçlar, çevresel etkenler, bazı psikolojik ve patolojik olaylar sonucunda uyarılarak yeni sinir hücreleri oluşumunu tetikler. Psikososyal stres (116), Alzheimer hastalığı ve Lityum (117), vitamin E eksikliği (118) ve iskemi (1) gibi faktörler nörogenezisi etkilemektedir. Bu etkenlerden bir tanesi de beyin iskemisidir. İskemik beyin hasarı hücresel ve moleküler yenilenme mekanizmalarını tetikleyerek iskemik bölgede nörogenezisin başlamasını sağlar (3).

Çeşitli nedenlere bağlı olarak meydana gelen beyin iskemisi, yetişkin nüfus içindeki en önemli ölüm ve sakatlanma nedenlerinden biridir. Hipokampus alanı iskemiyeye duyarlı bir bölgedir (77). Beyinde hipokampusun üç boyutlu konumu oldukça karmaşıktır. Türlerin çoğunda hipokampal oluşumun uzun eksen C şeklinde uzayan, uzamış bir yapıya sahiptir (23, 24). Hipokampus’un karmaşık yapısı ve beyinde bulunan bir çok bölge ile yakın ilişki içinde olması hipokampus fonksiyonunun tanımını da zorlaştırmaktadır (49). Tüm bu karmaşık yapısına ve fonksiyonuna rağmen çalışmalarda hipokampusun davranışlar üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğu da ifade edilmektedir (119, 120).

Bu nedenle çalışma süresince cerrahi müdahale sonrasında sıçanların davranışları da günlük olarak takip edilmiştir. Beyin iskemisi oluşturulan gruplarda, iskemi sonrasında yemek yeme bozukluğu, kaçınma, agresiflik ve saldırganlık gibi davranışla ilgili problemler ortaya çıkmıştır. Özellikle kaçınma, agresiflik ve saldırganlığın iskemi sonrasında 5 gün boyunca devam ettiği gözlenmiştir. Ayrıca yemek yeme davranışında da ilk 5 günde bozukluk olduğu gözlemlendi. Bu durum iskeminin davranış ve yemek yeme üzerine geçici bir süre olumsuz etkisinin olduğu şeklinde açıklanabilir. Bu durum da iskemi bölgesinde zarar gören hücrelerin, EP’nin nörogenezisi başlatarak hücre sayısını normale döndürdüğünü düşündürebileceği gibi, iskeminin de nörogenezisi başlatması

sonucu da olabileceği düşünülebilir. Zira iskeminin (1, 3) ve EP'nin (86, 113, 114) nörogenezis üzerinde etkisi olabileceği bilinmektedir. Cıvcıvler üzerinde yapılan bir çalışmada, değişik sürelerde uygulanan iskeminin öğrenme davranışı üzerine olan etkilerine bakıldı. Bu çalışmada iskemi sonrası erken dönemde motor fonksiyonlarda bozulmaların olabileceği, ancak bunun daha sonra düzelebileceği ileri sürülmektedir (61). Bu çalışmada elde edilen davranış ile ilgili bulgular, bizim çalışmamızda iskemiden 5 gün sonra azalan kaçınma, agresiflik ve saldırganlık bulguları normale dönmesini destekleyen bir bulgulardır.

Çalışmada hücre sayısı verilerinin elde edilmesinde stereolojik yöntemlerden optik disektör kullanıldı. Stereoloji, gerçekte üç boyutlu olan herhangi bir yapının iki boyutlu görüntülerinden yola çıkarak, onların üç boyutlu özellikleri ile ilgili sayısal verilerin elde edilmesini sağlayan bilim dalıdır (18). Stereolojik yöntemler kullanılarak yapılan çalışmalarda sayı, hacim, alan ve uzunluk gibi sayısal verilerin elde edilmesi mümkündür. Biyolojik yapılarla ilgili yapılan çalışmalarda eğer dokuyu elde etmek mümkün ise uygun histolojik yöntemler kullanılarak dokudan kesitler elde edilmesi, dokuların boyanarak ilgilenilen yapının ve sınırlarının görünebilir hale getirilmesi ile elde edilen kesitler üzerinde stereolojik çalışmaların yapılması mümkündür (18, 93). Günümüzde bu yöntemler kullanılarak birçok çalışma yapılmaktadır (61, 94). Çalışmada hipokampusdaki nöron sayılarının elde edilmesi için bilgisayar destekli stereoloji analiz sistemi kullanılmıştır. Analiz sisteminin kullanılması birey kaynaklı ölçüm hatalarının ortadan kaldırılmasını sağlayarak belirlenen sürede çalışmanın tamamlanmasını sağlar.

Çalışma sonuçları nöron sayıları bakımından değerlendirildiğinde önemli bulgulara ulaşılmıştır. Sonuçlar kontrol grubu ile iskemi ve kontrol grubu ile iskemi+EP grupları arasında anlamlı farklılıkların olduğunu ortaya koymuştur. Bu sonuçlar iskeminin nöron sayısında azalmaya neden olduğunu ancak EP'nin da bu azalmayı değiştirmedeğini göstermektedir. İskemi grubu ile iskemi+EP grubu karşılaştırıldığında ise iskemi+EP grubunun nöron sayısında artış olmasına rağmen bu artışın anlamlı olmadığı görülmüştür. Bu sonucu destekleyen bir diğer bulguda, kontrol grubu ile sham+EP grupları arasında anlamlı bir farklılığın bulunmamasıdır. Bu bulgular EP'nin iskemi ve nöron sayısı üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı şeklinde yorumlanabilir. Ayrıca iskemi grubu ile sham+EP ve iskemi+EP grubu ile sham+EP karşılaştırıldığında nöron sayısında anlamlı farklılıklar vardır. Bu sonuçlar EP'nin iskeminin oluşturduğu hücrel hasar üzerine herhangi bir etkisinin olmadığını göstermektedir.

İskemi ve nöron sayısı ilişkisini irdeleyen çalışmalar incelendiğinde farklı sonuçların ortaya çıktığı dikkati çekmektedir. Bazı çalışmalarda, iskeminin nörogenezisi tetikleyerek nöron sayısında artışa neden olduğu iddia edilmektedir. Sıçan beyninde oluşturulan deneysel iskemi modellerinde, iskeminin nöron sayısını arttırdığı ileri sürülerek başlıca girus dentatus ve subventriküler zon olmak üzere beynin bazı bölgelerinde nörogenezisin gerçekleştiği ve oluşan yeni nöronların hasarlı bölgelere göç edebileceği iddia edilmektedir. Örneğin Jiang ve arkadaşları orta serebral arter oklüzyonu yaparak gerçekleştirdikleri çalışmada yeni nöronların oluştuğundan bahsetmektedirler (12). Yine benzer bir çalışmada Jin ve arkadaşları, iskemi sonucu girus dentatusun subgranüler bölgesinde ve rostral subventriküler bölgede nöroproliferasyon oluştuğunu göstermişlerdir (3). Bununla birlikte çalışma sonuçlarımıza benzer şekilde iskeminin nöron sayısını azalttığını gösteren çalışmalarda mevcuttur. Örneğin Herguido ve arkadaşları yaptıkları çalışmada sıçanlarda nöron kaybı olduğunu tespit etmişlerdir. Bu çalışmalarda beyin iskemisi gibi hücre siklusunu başlatacak patolojilerin, postmitotik nöronlarda apoptozise yol açarak nöron sayısında azalmaya neden olduğu ileri sürülmektedir (78).

Kaynaklarda EP'nin hipokampus nöron sayısı üzerindeki etkilerini inceleyen çok az çalışmaya rastlanmaktadır. Bu çalışmaların bir kısmı çalışmamızda ortaya çıkan EP'nin iskemi üzerine herhangi bir etkisi olmadığı bulgusunu desteklememektedir. Bu çalışmalardan Cho ve arkadaşlarının fareler üzerinde yaptıkları çalışmada EP'nin hipokampusdaki hücre ölümlerini azalttığı bildirilmiştir (114). Muro ve Sutton'un sıçanlar üzerinde yaptığı bir diğer çalışmada EP uygulanan gruplardaki hayvanların hipokampusundaki ölü hücrelerin sayısında azalma olduğu ve buna bağlı olarak nöronal doku kaybının da azaldığı bildirilmiştir (115). Bir diğer çalışmada ise EP'nin hipokampusda nöron ölümünü azalttığı bildirilmektedir (86).

Çalışma sonuçlarımızdan iskeminin nöron sayısını azalttığı sonucu ortaya çıkmaktadır. Burada akla gelen en önemli sorulardan bir tanesi iskeminin hücre sayısını nasıl azalttığıdır. Bu sorunun cevabını sadece yaptığımız çalışma sonuçlarından yola çıkarak izah etmek mümkün değildir. Bununla birlikte yapılan çalışmalarda hücre siklusunu başlatacak patolojilerin, postmitotik nöronlarda apoptozise yol açarak nöron sayısında azalmaya neden olduğu ileri sürülmektedir ve bu patolojilerin en önemlilerinden birisi de beyin iskemisidir (78, 121, 122). Çalışmalar iskeminin postmitotik nöronlarda apoptozise yol açarak nöron sayısında azalmaya neden olduğunu göstermektedir.

Çalışmamızda da iskemi gruplarında nöron sayısı azalmasının postmitotik nöronlarda apoptozis sonucu ortaya çıktığı iddia edilebilir.

Çalışmamızda EP'nin çözünürlüğü için ringer laktat kullanılmıştır. Ringer laktat'ın nöron sayısı üzerinde herhangi bir etkisinin olup olmadığını anlaşılması için çalışmaya sham+ringer laktat grubu ilave edilerek diğer gruplarla karşılaştırmasına da bakıldı. Elde edilen bulgular sham+ringer laktat grubu ile sham+EP ve kontrol grupları arasında anlamlı bir ilişki olmadığını gösterdi. Bu sonuçlar ringer laktatın EP çözünürlüğünde güvenle kullanılabilceğini göstermektedir. Ancak, iskemi+EP ile sham+ringer laktat grupları arasında, iskemi+EP grubunun nöron sayısının sham+ringer laktat grubunun nöron sayısına göre belirgin bir azalma olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamsız bir ilişki bulunmuştur. Bu durum tarafımızdan tam olarak izah edilememiştir. Çünkü Sham+ringer laktat grubu ile kontrol grupları arasında anlamlı bir ilişkinin olmaması, iskemi+EP ile sham+ringer laktat grupları arasında anlamlı bir ilişkinin olmasını gerektirirdi. Bu sonuç kaynaklarla da desteklenememiştir.

Sonuç olarak tüm bulgular birlikte değerlendirildiğinde, iskeminin 16 haftalık sıçan hipokampusu nöron sayısını azalttığı, beklentimizin aksine EP'nin iskeminin oluşturduğu hücrel hasar üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığını ortaya koymuştur.

## 6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Yapılan çalışmadan çıkarılabilecek sonuçlar aşağıda verilmiştir.

1. İskemi sonrası erken dönemlerde motor fonksiyonlarda bozulmalar olmaktadır. Ancak daha sonra düzelmektedir.
2. İskemi 16 haftalık sıçan hipokampusunun nöron sayısını azaltmaktadır.
3. Etil piruvatın 16 haftalık sıçan hipokampusunda oluşturulan iskemi üzerinde herhangi bir etkisi yoktur.
4. Ringer laktat, EP çözünürlüğünde güvenle kullanılabilir.

Bu sonuçlar ışığında konuyla ilgili araştırmacılara şu öneriler yapılabilir. Çalışma sonuçlarımıza göre iskemi 16 haftalık sıçan hipokampusunda nöron sayısını azaltmaktadır. Etil piruvat ise iskemi sonrasında ortaya çıkabilecek patolojilerin tedavisinde kullanılmaya aday bir terapötik ajan olarak bilinmektedir. Ancak çalışma sonuçlarımız bu iddiayı desteklememektedir. Bunun için çalışmamızda elde ettiğimiz verilerin yanı sıra çalışma immünohistokimyasal, biyokimyasal, otoradyografik ve ultrastruktürel yöntemler kullanılarak detaylandırılmalı ve elde edilen bulgularla bizim çalışmamızda elde ettiğimiz bulgular karşılaştırılmalıdır. İlgili araştırmacılar için iskemi ve EP ilişkisinin bu yönüyle araştırılması, konuya farklı bakış açıları getirecektir.

Ayrıca klinik çalışmalarına geçmeden önce iskemi ve EP ilişkisini inceleyen deneysel çalışmaların sayısının artırılması gerekmektedir. Çünkü bu ilişkiyi inceleyen çok az sayıda deneysel çalışma mevcuttur. Bu nedenle iskemi konusu ile ilgili çalışan araştırmacılar için iskemi ve EP ilişkisi araştırılmaya değer bir konudur.

## 7. ÖZET

Çeşitli nedenlere bağlı olarak meydana gelen beyin iskemisi, yetişkin nüfus içerisindeki en önemli ölüm ve sakatlanma nedenlerindedir. İskemi üzerine birçok çalışma yapılmasına rağmen oluşan hasarın nasıl önleneceği konusunda henüz yeterli bir ilerleme sağlanamamıştır. Hipokampus, iskemiye duyarlı ve postnatal dönemde nörogenezisin gerçekleştiği bir bölgedir. Etil pirüvat (EP) antioksidan, antienflamatuar bir ajandır. Aynı zamanda nöroprotektif bir maddedir. Bu nedenle, beyin iskemisinde etil pirüvatın hipokampus nöron sayısı üzerine olabilecek muhtemel etkilerini araştırmak için bu çalışma planlanmıştır.

Çalışmada 16 haftalık, Sprague Dawley türü, 30 adet dişi sıçan kullanıldı. Sıçanlar kontrol (I. Grup), iskemi (II. Grup), iskemi + EP (III. Grup), sham+EP (IV. Grup) ve sham+ringer laktat (V. Grup) grupları olmak üzere beş gruba ayrıldı. I. Gruba herhangi bir uygulama yapılmadı. II. ve III. Gruplarda bulunan sıçanlara 30 dakika süre ile iskemi oluşturuldu. II. Gruba iskemi sonrası herhangi bir uygulama yapılmadı ve 10 gün boyunca takip edildi. III. Gruba ise iskemi yapıldığı günden itibaren on gün boyunca aynı saatte olmak üzere günde bir kez EP (40 mg/kg) intraperitoneal olarak uygulandı. IV. ve V. Gruplarda bulunan sıçanların boyun bölgelerine cilt kesisi yapıldı ve dikildi. IV. Gruba cerrahi müdahale yapıldığı günden itibaren on gün boyunca aynı saatte olmak üzere günde bir kez EP (40 mg/kg) intraperitoneal olarak uygulandı. V. Gruba cerrahi müdahale yapıldığı günden itibaren on gün boyunca aynı saatte olmak üzere günde bir kez ringer laktat (40 mg/kg) intraperitoneal olarak uygulandı. Deneyin 11. gününde tüm sıçanlar dekapite edilerek beyin dokuları çıkarıldı. Beyin dokuları rutin histolojik doku takibinden geçirilerek parafine gömüldü. Daha sonra sistematik rastgele örnekleme ile kesitler alındı, Cresyl fast violet ile boyandı ve optik parçalama yöntemiyle stereolojik analizleri yapıldı.

Çalışma sonuçları göre kontrol grubu ile iskemi ve kontrol grubu ile iskemi + EP grupları karşılaştırıldığında, iskemi grupları nöron sayılarında azalma olduğu ve bu azalmanın anlamlı olduğu görüldü. Bu sonuç sıçanlarda uygulanan iskeminin hipokampusun cornu ammonis (CA) bölgesinde nöron sayısını azalttığını göstermektedir. Kontrol grubu ile sham+EP grupları arasında nöron sayısı bakımından anlamlı bir farklılık olmamasına rağmen iskemi ile sham+EP ve iskemi +EP ile sham+EP grupları arasında nöron sayısı bakımından anlamlı farklılıklar vardır. Bu sonuçlar ise sıçanlarda uygulanan EP'nin hipokampus CA bölgesindeki nöron sayısı üzerinde anlamlı bir etkisinin olmadığını göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Sıçan, hipokampus, iskemi, etil pirüvat, stereoloji, optik disektör.

## 8. SUMMARY

### **“The Effect of Ethyl Pyruvate Administration on Rat Hippocampus Neuron Number After The Brain Ischemia”**

The cerebral ischemia which is caused by various reasons is one of the major causes of death and disability in the adult population. Although there are many studies on ischemia, satisfactory progress has not yet been made as for how the damage can be prevented. Hippocampus is ischemia-sensitive a region in which neurogenesis occurs in the postnatal period. Ethyl pyruvate (EP) is an antioxidant and antiinflammatory agent. At the same time, it is a neuroprotective agent. Therefore, this study was planned to determine study the possible effects of EP on the number of neurons in the hippocampus in the cerebral ischemia.

In the study, 30 female Sprague Dawley rats of 16-week-old were used. Rats, were divided into five groups, including control (Group I), ischemia (Group II), ischemia+EP (Group III), sham+EP (Group IV) and sham+ringer lactate (Group V). No intervention was performed to the group I. Ischemia, for 30 minutes performed for the groups II and III. Group II did not receive anything after the ischemia and followed for 10 days. Since the ischemia was performed, EP (40 mg / kg) was applied to the group III intraperitoneally once a day in the same time periods during the ten days' period. In the group IV and V, was performed incision and then suture to the rats' necks. Since the surgery of the group IV was carried out, EP (40 mg / kg) was applied to group intraperitoneally once a day in the same time periods during the ten days' period. Since the surgery of the group V was carried out, ringer lactate (40 mg / kg) was applied to group intraperitoneally once a day in the same time periods during the ten days' period. On the eleventh day of the experiment all the rats were decapitated and their brain tissues were removed. The brain tissues were embedded in paraffin through routine histology follow up. Then, with a systematic random sampling, sections were removed from the brain and stained with cresyl fast violet and their stereological analyses were performed with the optical fractionator method.

According to the results, there are reduction between control group and ischemia, and between the control group and ischemia+EP groups with respect to the number of neurons and these reduction are significant. And this shows that, ischemia involved in the rats reduced the number of neurons in the hippocampus cornu ammonis (CA). There was not any significant differences between the control group and sham+EP group with respect to number of neurons unlike significant differences between the ischemia and sham+EP and between the ischemia+EP and sham+EP in the number of neurons. These results show that the EP in the rats does not have any significant influence on the number of neurons in the hippocampus CA.

**Key Words:** Rat, hippocampus, ischemia, ethyl pyruvate (EP), stereology, optical disector.



## 9. KAYNAKLAR

1. Leker, RR., Shohami, E.: Cerebral ischemia and trauma-different etiologies yet similar mechanisms: neuroprotective opportunities. *Brain Res Brain Res Rev.*, 39(1): 55-73, 2002.
2. Horner, HC., Davies, HA., Brown, J., Sewart, MG.: Reduction in numerical synapse density in chick (*Gallus domesticus*) dorsal hippocampus following transient cerebral ischaemia. *Brain Research*, 735: 354–359, 1996.
3. Jin, K., Minami, M., Lan, JQ., Mao, XO., Bateur, S., Simon, RP., Greenberg, DA.: Neurogenesis in dentate subgranular zone and rostral subventricular zone after focal cerebral ischemia in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(8): 4710-5, 2001.
4. Collier, T.J., Quirk, G.J., Routtenberg, A.: Separable roles of hippocampal granule cells in forgetting and pyramidal cells in remembering spatial information. *Brain Res*, 409: 316–328, 1987.
5. Kailash, M. and Russel, J. R.: Melatonin maintains adult hippocampal neurogenesis and cognitive functions after irradiation. *Neurobiology*, 90: 60–68, 2010.
6. Çetin, K.: Formaldehid ile oluşturulan frontal korteks, hipokampus ve serebellum hücresel hasarına karşı melatoninin koruyucu etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Zonguldak Karaelmas Üniv. Sağlık Bilimleri Enst., Zonguldak 2005.
7. El-Falougy, H. and Benuska, J.: History, anatomical nomenclature, comparative anatomy and functions of the hippocampal formation. *Bratisl Lek Listy.*, 107(4): 103-6, 2006.
8. Hayman, LA., Fuller, GN., Cavazos, JE., Pflieger, MJ., Meyers, CA., Jackson, EF.: The hippocampus: normal anatomy and pathology. *AJR Am J Roentgenol*, 171(4): 1139-46, 1998.
9. Björklund, A. and Lindvall, O. : Cell replacement therapies for central nervous system disorders. *Nat. Neurosci*, 3: 537–544, 2000.
10. Temple, S. : The development of neural stem cells. *Nature* , 414: 112–117, 2001.
11. Nakatomi, H., Kuriu, T., Okabe, S., Yamamoto, S., Hatano, O., Kawahara, N., Tamura, A., Kirino, T., Nakafuku, M.: Regeneration of hippocampal pyramidal

neurons after ischemic brain injury by recruitment of endogenous neural progenitors. *Cell*. 110(4): 429-41, 2002.

12. Jiang, W., Gu, W., Brannström, T., Rosqvist, R., Wester, P.: Cortical neurogenesis in adult rats after transient middle cerebral artery occlusion, *Stroke*, 32(5): 1201-7, 2001.
13. Kim, JB., Yu, YM., Kim, SW., Lee, JK.: Anti-inflammatory mechanism is involved in ethyl pyruvate-mediated efficacious neuroprotection in the postischemic brain. *Brain Research*, 1060: 188 – 192, 2005.
14. Yu, YM., Kim, JB., Lee, KW., Kim, SY., Han, PL., Lee, JK.: Inhibition of the cerebral ischemic injury by ethyl pyruvate with a wide therapeutic window. *Stroke*, 36: 2238–2243, 2005.
15. Sterio, DC. The unbiased estimation of number and size of arbitrary particles using the disector. *J Microsc* , 134: 127–36, 1994.
16. Gundersen, HJG. and Jensen EB.: The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *J Microsc*, 147: 229–63, 1987.
17. West, MJ., Slomianka, L., Gundersen, HJ.: Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator. *Anat. Rec.*, 231(4): 482-97, 1991.
18. Howard, CV. and Reed, MG.: *Unbiased stereology: Three dimensional measurement in microscopy*. Oxford, Bios Scientific Publishers , 1998.
19. Gundersen, HJG.: Quantitative analysis of three-dimensional structures in neuroanatomy. In *Quantitative Neuroanatomy in Transmitter Research*. Ed. Agnati, L.F. and Fuxe, K., Basingstoke and London: MacMillan Press, 1985, pp 3-9.
20. Braendgaard, H. and Gundersen HJG.: The impact of recent stereological advances on quantitative studies of the nervous system. *Journal of Neuroscience Methods* ,18: 39-78,1986.
21. Pakkenberg, B. ve Gundersen, HJG.: Total number of neurons and glial cells in human brain nuclei estimated by the disector and the fractionator. *Journal of Microscopy*, 150 (pt 1): 1-20, 1988.
22. Konrad, C., Ukas, T., Nebel, C., Arolt, V., Toga, A.W., Narr, K.L.: Defining the human hippocampus in cerebral magnetic resonance images-An overview of current segmentation protocols. *NeuroImage*, 47: 1185–1195, 2009.
23. Amaral, DG. and Witter, MP.: Hippocampal formation. *The rat nervous system*. 2nd editor Paxinos, G., New York, Academic Press.,1995. pp. 443-494.

24. Csaba, L. and Tibor, H.: Extrinsic afferent systems to the dentate gyrus. *Prog Brain Res*, 163: 63–799, 2007.
25. Arthur, C., Guyton, M.D., John E. H.: *Textbook of Medical Physiology*, 11th ed, 2006.
26. Amaral, D.G. and Witter, M.P.: The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience*, 31: 571–591, 1989.
27. Omar, J.A. and Mayank, R. M.: The hippocampal rate code: anatomy, physiology and theory. *Trends Neurosci*, 32(6): 329-38, 2009.
28. Duvernoy, H.M.: *The Human Hippocampus: Functional Anatomy, Vascularization and Serial Sections with MRI*. Springer Verlag, Berlin Heidelberg, 2005.
29. Kiefer, C., Slotboom, J., Buri, C., Gralla, J., Remonda, L., Dierks, T., Strik, W.K., Schroth, G., Kalus, P.: Differentiating hippocampal subregions by means of quantitative magnetization transfer and relaxometry: preliminary results. *Neuroimage*, 23: 1093–1099, 2004.
30. Zilles, K. Graue und weiße Substanz des Hirnmantels.: In: Leonhard, H., Tillmann, B., Töndury, G., Zilles, K. (Eds.), *Anatomie des Menschen*. In Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1987, pp 382–471.
31. Dremencov, E., Gur, E., Lerer, B., Newman, M.E.: Effects of chronic antidepressants and electroconvulsive shock on serotonergic neurotransmission in the rat hippocampus. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 27(5): 729-39, 2003.
32. Totterdell, S. and Hayes, L.: Non-pyramidal hippocampal projection neurons: a light and electron microscopic study. *J Neurocytol*, 16(4): 477-85, 1987.
33. Hiroshi, T., Yutaka, Y., Fumikazu, S., Kevin, J. M., Hajime, F.: Roles of Semaphorin-6B and Plexin-A2 in Lamina-Restricted Projection of Hippocampal Mossy Fibers. *The Journal of Neuroscience*, 30(20): 7049 –7060, 2010.
34. Stephen S. Sternberg, M.D.: *Histology for pathologists*. Second edition, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia-New York, 1995, chapter 11, p 248.
35. Berry, M.M., Bannister, L.H., Standring, S.M.: *Nervous System*. Editörs, Williams, P.L., Bannister, L.H., Berry, M.M, Collins, P., Dyson, M., Dussek, J.E., Ferguson, M.W.J. 38th edition *Gray's Anatomy*, New York, Churchill Livingstone. 1995, pp 6-1124.
36. Meydan, S.: Testosteron hormonu uygulanan sıçanlarda hipokampus morfolojik yapısının immunohistokimyasal olarak incelenmesi, *Uzmanlık tezi*, Fırat Üniv., Sağlık Bilimleri Enst., Elazığ, 2008.

37. Burwell, R.D.: The parahippocampal region: corticocortical connectivity, *Ann NY Acad Sci.*, 911: 25–42, 2000.
38. Witter, M.P. and Moser, E.I.: Spatial representation and the architecture of the entorhinal cortex, *Trends. Neurosci*, 29: 671–678, 2006.
39. Balki, S.: Ghrelin leptin ve melatonin hormonlarının erkek sıçanlarda hipokampustaki katekolaminerjik nörotransmitter düzeylerine etkilerinin araştırılması, Doktora tezi, Fırat Üniv. Sağlık Bilimleri Enst., Elazığ 2008.
40. Dilberovic, F., Secerov, D., Tomic, V.: Morphological characteristics of the gyrus dentatus in some animal species and in man. *Anat Anz*, 161(3): 231-8, 1986.
41. Kaplan, S.: 4 ve 20 haftalık erkek ve dişi sıçanların hipokampusunda nöronal asimetri. Doktora tezi, Ondokuz Mayıs Üniv., Sağlık Bilimleri Enst., Samsun 1990.
42. Burman, MA., Star, MJ., Gewirtz, JC.: Dissociable effects of Hippocampus lesions on expression of fear and trace fear conditioning memories in rats. *Hippocampus*, 16(2): 103-13, 2006.
43. Seress, L.: Interspecies comparison of the hippocampal formation shows increased emphasis on the regio superior in the Ammon's horn of the human brain. *J Hirnforsch*, 29(3): 335–340, 1988.
44. O'Keefe, J. ve Nadel, L.: *The Hippocampus as a Cognitive Map*. Oxford: Clarendon Pres, 1978.
45. Eichenbaum, H., Cohen, NJ.: *From Conditioning to Conscious Recollection: Memory Systems of the Brain*. Oxford: Oxford University Pres, 2001.
46. O'Mara, S.: The subiculum: what it does, what it might do, and what neuroanatomy has yet to tell us. *J Anat.*, 207(3): 271-82, 2005.
47. Witter, MP. and Amaral DG.: Hippocampal Formation. In: Paxinos G, editors. *The Rat Nervous System*. Third Edition. China: Elsevier , 635-704, 2004.
48. Demirayak, M.: Neonatal term sıçanlarda oluşturulan hipoksik iskemik beyin hasarı modelinde intraperitoneal uygulanan valproik asit ve folik asidin beyin hasarına etkileri. Uzmanlık Tezi, Pamukkale Üniv. Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Pamukkale 2008.
49. Nolte, J.: *The Human Brain: An introduction to its functional anatomy*. 2nd edition Toronto, C V. Mosby Company, 1988.
50. Guyton, AC. and Hall, JE.: *Tıbbi Fizyoloji Ed. Çavuşoğlu H. 9. Baskı*, Nobel Tıp kitabevi, İstanbul, 1996, s 715-759.

51. Cutsuridis, V. and Wennekens, T.: Hippocampus, microcircuits and associative memory. *Neural Networks*, 22(8): 1120-8, 2009.
52. Treves, A. and Rolls, E.: Computational analysis of the role of the hippocampus in memory. *Hippocampus*, 4(3): 374-391, 1994.
53. Andersen, P., Morris, R., Amaral, D., Bliss, T., O'Keefe, J.: *The hippocampus Book*, Oxford, University press, 2007.
54. McHugh, SB., Niewoehner, B., Rawlins, JN., Bannerman, DM.: Dorsal hippocampal N-methyl-D-aspartate receptors underlie spatial working memory performance during non-matching to place testing on the T-maze. *Behavioural Brain Research*, 186: 41–47, 2008.
55. Tetsumori, Y.: A putative link of PUFA, GPR40 and adult-born hippocampal neurons for memory. *Progress in Neurobiology*, 84: 105–115, 2008.
56. Siesjo, BK.: Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. Part I: Pathophysiology. *J Neurosurg*, 77(2): 169-84, 1992.
57. Yılmaz, M.B.: Deneysel geçici fokal serebral iskemi uygulanan ratlarda quetiapine' in noronal apopitozisdeki nöron koruyucu etkisi, Uzmanlık Tezi, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Beyin ve Sinir Cerrahisi Anabilim Dalı, Ankara, 2009.
58. Caplan, LR.: *Stroke. A clinical approach*. 2nd ed. Boston: Butterworth-Heinemann., p 23–66, 1993.
59. Zemke, D., Smith, JL., Reeves, MJ., Majid, A.: Ischemia and ischemic tolerance in the brain: an overview. *Neurotoxicology*, 25(6): 895-904, 2004.
60. Markus, HS.: Cerebral perfusion and stroke. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 75: 353–361, 2004.
61. İşgen A.: Civcivlerde değişik sürelerle uygulanan iskeminin hipokampusun hacmi, toplam nöron sayısı ve öğrenme davranışı üzerine olan etkisinin stereolojik metotlarla araştırılması. Uzmanlık Tezi, Ondokuz Mayıs Üniv. Sağlık Bilimleri Enst., Samsun 2009.
62. Martin, RL., Lloyd, HG., Cowan ,AI.: The early events of oxygen and glucose deprivation: setting the scene for neuronal death?, *Trends Neurosci*, 17(6): 251-7, 1994.
63. Lipton, P.: Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Rev.*, 79(4): 1431-568, 1999.
64. Clarke, P G.: Developmental cell death, morphological diversity, and multiple mechanisms. *Anat. Embryol.*, 181: 195–213, 1990.

65. Newman, GC., Hospod, FE., Schissel, SL.: Ischemic brain slice glucose utilization: effects of slice thickness, acidosis and K<sup>+</sup>. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 11: 398–406, 1991.
66. Martin, LJ., Al-Abdulla, NA., Brambrink, AM., Kirsch, JR., Sieber, FE., Portera-Cailliau, C.: Neurodegeneration in excitotoxicity, global cerebral ischemia and target deprivation: a perspective on the contributions of apoptosis and necrosis. *Brain Res. Bull.*, 46: 281–309, 1998.
67. Narayanan, U., Chi, OZ., Liu, X., Weiss, HR.: Effect of AMPA on cerebral cortical oxygen balance of ischemic rat brain, *Neurochem. Res.* 25: 405–411, 2000.
68. Förstermann, U., Closs, EI., Pollock, JS., Nakane, M., Schwarz, P., Gath, I., Kleinert, H.: Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension*, 23(6): 1121–1131, 1994.
69. Kim, JB., Piao, CS., Lee, KW., Han, PL., Ahn, JI., Lee, YS., Lee, JK.: Delayed genomic responses to transient middle cerebral artery occlusion in the rat. *J Neurochem*, 89(5): 1271-82, 2004.
70. Bramlett, HM. and Dietrich, WD.: Pathophysiology of cerebral ischemia and brain trauma: similarities and differences. *J Cereb Blood Flow Metab.*, 24(2): 133-50, 2004.
71. Kirino, T.: Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. *Brain Res.*, 239(1): 57-69, 1982.
72. Pulsinelli, WA., Brierley, JB., Plum, F.: Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia. *Ann Neurol.*, 11(5): 491– 498, 1982.
73. Zou, B., Li, Y., Deng, P., Xu, ZC.: Alterations of potassium currents in ischemia-vulnerable and ischemia-resistant neurons in the hippocampus after ischemia. *Brain Res.*, 1033: 78-89, 2005.
74. Petit, CK. and Pulsinelli, WA.: Delayed neuronal recovery and neuronal death in rat hippocampus following severe cerebral ischemia: possible relationship to abnormalities in neuronal processes. *J Cereb Blood Flow Metab*, 4: 194–205, 1984.
75. Liu, KF., Li, F., Tatlisumak, T., Garcia, JH., Sotak, CH., Fisher, M., Fenstermacher, JD.: Regional variations in the apparent diffusion coefficient and the intracellular distribution of water in rat brain during acute focal ischemia. *Stroke*, 32: 1897–1905, 2001.
76. Kovalenko, T., Osadchenko, I., Nikonenko, A., Lushnikova, I., Voronin, K., Nikonenko, I., Muller, D., Skibo, G.: Ischemia-induced modifications in hippocampal CA1 stratum radiatum excitatory synapses. *Hippocampus*, 16: 814–825, 2006.

77. Nikonenko, AG., Radenovic, L., Andjus, PR., Skibo, GG.: Structural features of ischemic damage in the hippocampus. *The Anatomical Record*, 292: 1914–1921, 2009.
78. Herguido, MJ., Carceller, F., Roda, JM., Avendano, C.: Hippocampal cell loss in transient global cerebral ischemia in rats: a critical assessment. *Neuroscience*, 93(1): 71-80, 1999.
79. Cramer, SC. and Chopp, M.: Recovery recapitulates ontogeny. *Trends Neurosci.*, 23(6): 265-71, 2000.
80. Smith, ML., Auer, RN., Siesjö, BK.: The density and distribution of ischemic brain injury in the rat following 2-10 min of forebrain ischemia. *Acta Neuropathol* ,64(4): 319-32, 1984.
81. Block, F.: Global ischemia and behavioural deficits. *Progress in Neurobiology Vol.*, 58: pp 279–295, 1999.
82. Kaklıkkaya, İ., Menteşe, Ü., Koramaz, İ., Altun, G., Menteşe, A., Çakıroğlu, Y., Özcan F.: Deneysel iskemi reperfüzyon modelinde, etil pirüvat uygulamasının sonuçları. *Turkish J Thorac Cardiovasc Surg*, 18(4): 310-314, 2010.
83. Fink MP.: Ethyl pyruvate: a novel anti-inflammatory agent. *J Intern Med.*, 261(4): 349-62, 2007.
84. Shen, H., Hu, X., Liu, C., Wang, S., Zhang, W., Gao, H., Stetler, RA., Gao, Y., Chen, J.: Ethyl pyruvate protects against hypoxic-ischemic brain injury via anti-cell death and anti-inflammatory mechanisms. *Neurobiology of Disease*, 37(3): 711–722, 2010.
85. Kao, KK. and Fink, MP.: The biochemical basis for the anti-inflammatory and cytoprotective actions of ethyl pyruvate and related compounds. *Biochemical Pharmacology* 80: 151–159, 2010.
86. Kim, SW., Jeong, JY., Kim, HJ., Seo, JS., Han, PL., Yoon, SH., Lee, JK.: Combination treatment with ethyl pyruvate and aspirin enhances neuroprotection in the postischemic brain. *Neurotox Res*, 17: 39–49, 2010.
87. Reade, MC. ve Fink, MP.: Bench-to-bedside review: Amelioration of acute renal impairment using ethyl pyruvate. *Crit Care*, 9(6): 556-60, 2005.
88. Lee, JY., Kim, YH., Koh JY.: Protection by pyruvate against transient forebrain ischemia in rats. *J. Neurosci*, 21(20): RC171, 2001.
89. Dobsak, P., Courderot-Masuyer, C., ZelleR, M., Vergely, C., Laubriet, A., Assem, M., Eicher, J.C., Teyssier, J.R., Wolf, J.E., Rochette, L.: Antioxidative properties of pyruvate and protection of the ischemic rat heart during cardioplegia. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 34: 651–659, 1999.

90. O'Donnell-Tormey, J., Nathan, C.F., Lanks, K.: Secretion of pyruvate .An antioxidant defense of mammalian cells. *J. Exp. Med.*, 165: 500–514, 1987.
91. Vonkorff, RW.: Pyruvate-C14, purity and stability. *Anal. Biochem.* 8: 171– 178, 1964.
92. Ünal, B., Aslan, H., Canan, S., Şahin, B., Kaplan, S.: Biyolojik ortamlardaki objelerin sayımı yapılırken kullanılan eski (tarafalı) metotların önemli hata kaynakları ve çözüm önerileri. *T Klin Tıp Bilimleri*, 22: 1–6, 2002a.
93. Mayhew, TM. and Gundersen, HJ.: If you assume, you can make an ass out of u and me': a decade of the disector for stereological counting of particles in 3D space. *J Anat.*, 188 ( Pt 1): 1-15, 1996.
94. Uçar, Ş.: Civcivlere değişik sürelerle uygulanan iskeminin beyincik purkinje ve granüler hücre sayısı ile öğrenme davranışı üzerine etkisinin araştırılması: stereolojik bir çalışma. *Uzmanlık Tezi, Ondokuz Mayıs Üniv. Sağlık Bilimleri Enst. Samsun 2009.*
95. Odacı, E., Yıldırım, Ş.,Bahadır, A., Canan, S., Şahin, B., Baş, O., Bilgiç, S., Kaplan, S.: Yeni stereolojik yöntemlerin olası hata kaynakları ve çözüm yolları. *T Klin. Tıp Bilimleri*, 24: 78-87, 2004.
96. Canan, S.,Şahin, B., Ünal, B.,Aslan, H.: Parçacıkların toplam sayısının hesaplanması için bir metot :parçalama. *TKlin Tıp Bilimleri*, 22(S): 30-46, 2002.
97. West, MJ.: Stereological methods for estimating the total number of neurons and synapses: issues of precision and bias. *Trends Neurosci* , 22: 51–61, 1999.
98. Gundersen, HJG., Jensen, EBV., Kieu, K., Nielsen, J.: The efficiency of systematic sampling in stereology-reconsidered. *J Microsc*, 193: 199–211, 1999.
99. West, MJ.: New stereological methods for counting neurons. *Neurobiol Aging*, 14: 275-85, 1993.
100. Ünal, B., Canan, S., Aslan, H., Şahin, B., Çataloluk, O., Kaplan, S.: Doku örneklerindeki obje sayılarının hesaplanmasında tarafsız stereolojik metotlar: fiziksel disektör. *T Klin Tıp Bilimleri*, 22: 15–24, 2002b.
101. Gundersen, HJG.: Notes on the estimation of the numerical density of arbitrary particles: The edge effect. *J Microscopy*, 111: 219–223, 1977.
102. De Groot, DM. ve Bierman, EP.: The complex-shaped perforated synapse, a problem in quantitative stereology of the brain. *J Microsc.*, 131: 355-60, 1983.
103. Gundersen, HJG.: Stereology of arbitrary particles: A review of unbiased number and size estimators and the presentation of some new ones in memory of William R Thomson. *J Microsc.*, 143: 3–45, 1986.



104. Schmitz, C. and Hof, PR.: Design-Based Stereology in Brain Aging Research. *Frontiers in Neuroscience*, Chapter 4, 2007.
105. Lowe J. Techniques in neuropathology. In: Bancroft JD, Stevens A, editors. *Theory and practice of histological techniques*. New York: Churchill Livingstone. 341-383, 1996.
106. Piao, CS., Kim, JB., Han, PL. Lee JK.: Dynamic expression of p38 beta MAPK in neurons and astrocytes after transient focal ischemia. *Brain Res.*, 976: 120–124, 2003.
107. Lister, JP., Blatt, GJ., DeBassio, WA., Kemper, TL., Tonkiss, J., Galler, JR., Rosene, DL.: Effect of prenatal protein malnutrition on numbers of neurons in the principal cell layers of the adult rat hippocampal formation. *Hippocampus*, 15(3): 393-403, 2005.
108. Xu, XH., Chen, Q., Chen, Y., Lv, LX., Zhu, CQ., Dai, HL., Qian, JQ.: Effect of ethyl pyruvate on expression of inflammatory factors and mitogen-activated protein kinase proteins in renal ischemic/reperfusion injury in BABL/c mice. *Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue*. 22(12): 750-3, 2010.
109. Tsung, A., Kaizu, T., Nakao, A., Shao, L., Bucher, B., Fink, MP., Murase, N., Geller, DA.: Ethyl pyruvate ameliorates liver ischemia-reperfusion injury by decreasing hepatic necrosis and apoptosis. *Transplantation*, 79(2): 196-204, 2005.
110. Liang, X., Chavez, AR., Schapiro, NE., Loughran, P., Thorne, SH., Amoscato, AA., Zeh, HJ., Beer-Stolz, D., Lotze, MT., de Vera ME.: Ethyl pyruvate administration inhibits hepatic tumor growth. *J Leukoc Biol.*, 86(3): 599-607, 2009.
111. Taylor, MD., Grand, TJ., Cohen, JE., Hsu, V., Liao, GP., Zentko, S., Berry, MF., Gardner, TJ., Woo, YJ.: Ethyl pyruvate enhances ATP levels, reduces oxidative stress and preserves cardiac function in a rat model of off-pump coronary bypass. *Heart Lung Circ.*, 14(1): 25-31, 2005.
112. Choi, JS., Lee, MS., Jeong, JW.: Ethyl pyruvate has a neuroprotective effect through activation of extracellular signal-regulated kinase in Parkinson's disease model. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 394: 854–858, 2010.
113. Wang, Q., Ding, Q., Zhou, Y., Gou, X., Hou, L., Chen, S., Zhu, Z., Xiong, L.: Ethyl pyruvate attenuates spinal cord ischemic injury with a wide therapeutic window through inhibiting high-mobility group box 1 release in rabbits. *Anesthesiology*, 110(6): 1279-86, 2009.
114. Cho, IH., Kim, SW., Kim, JB., Kim, TK., Lee, KW., Han, PL., Lee, JK.: Ethyl pyruvate attenuates kainic acid-induced neuronal cell death in the mouse hippocampus. *J Neurosci Res*. 84(7): 1505-11, 2006.

115. Moro, N., Sutton, RL.: Beneficial effects of sodium or ethyl pyruvate after traumatic brain injury in the rat. *Experimental Neurology*, 225: 391–401, 2010.
116. Gould, E., McEwen, BS., Tanapat, P., Galea, LA., Fuchs, E.: Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation. *J Neurosci*, 17(7): 2492-8, 1997.
117. Fiorentini, A., Rosi, MC., Grossi, C., Luccarini, I., Casamenti, F.: Lithium improves hippocampal neurogenesis, neuropathology and cognitive functions in APP mutant mice. *PLoS One*, 5(12): 14382, 2010.
118. Ciaroni, S., Cuppini, R., Cecchini, T., Feri, P., Ambrogini, P., Cuppini, C., Del Grande, P.: Neurogenesis in the adult rat dentate gyrus is enhanced by vitamin E deficiency. *J Comp Neurol* , 411: 495–502, 1999.
119. Hossain, M., Chetana, M., Devi, PU.: Late effect of prenatal irradiation on the hippocampal histology and brain weight in adult mice. *Int J Dev Neurosci*, 23(4): 307-13, 2005.
120. Bayer, S.A., Altman, J., Russo, R.J., Zhang, X.: Timetables of neuropatterns in the rat. *Neurotoxicology*, 14: 83–144,1993.
121. Kirino, T.: Delayed neuronal death. *Neuropathology*, 20: 95–7, 2000.
122. Katchanov, J., Harms, C., Gertz, K., Hauck, L., Waeber, C., Hirt, L., Priller, J., Harsdorf, R., Brück, W., Hörtnagl, H., Dirnagl, U., Bhide, PG., Endres, M.: mild Cerebral ischemia induces loss of cyclin-dependent kinase inhibitors and activation of cell cycle machinery before delayed neuronal cell death. *The Journal of Neuroscience*, 21(14): 5045–53, 2001.

## ÖZGEÇMİŞ

1978 yılında Trabzon'un Çaykara ilçesi, Ataköy beldesinde doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Ataköy'de tamamladı. 1998 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi, Psikiyatri Servisinde, Hemşire olarak çalışmaya başladı. 1998 yılında girdiği Karadeniz Teknik Üniversitesi, Trabzon Sağlık Yüksekokulu, Hemşirelik Bölümünden 2002 yılında mezun oldu. 2009 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı yüksek lisans programına kaydoldu. Halen yüksek lisans öğrenimine devam etmekte olan Ayşe İKİNCİ'nin yabancı dili İngilizce'dir.